

Morfometría Geométrica y sus Nuevas Aplicaciones en Ecología y Biología Evolutiva. Parte 2

Geometric Morphometric and its New Applications in Ecology and Evolutionary Biology. Part 2

Amado Villalobos-Leiva¹ & Hugo A. Benítez²

VILLALOBOS-LEIVA, A. & BENÍTEZ, H. A. Morfometría geométrica y sus nuevas aplicaciones en ecología y biología evolutiva. Parte 2. *Int. J. Morphol.*, 38(6):1818-1836, 2020.

RESUMEN: La presente revisión entrega una visión actualizada del estudio de la morfometría geométrica y sus aplicaciones más actuales en ecología y biología evolutiva, metodología con una amplia variación en los últimos 5 años de su primera versión en *International Journal of Morphology*. La Morfometría geométrica es una herramienta que permite evaluar las variaciones morfológicas con factores subyacentes, siendo una herramienta más sensible que la morfometría tradicional, lo que permite detectar mínimos cambios de variación morfológica. Lo que la ha vuelto una herramienta notable para responder preguntas de biología comparada centradas en caracteres anatómicos. En sus comienzos fue una herramienta usada principalmente para responder preguntas taxonómicas, y para diferenciar a nivel de individuos, poblaciones o especies. No obstante, en los últimos años la cantidad de preguntas y problemáticas en las que se aplica, ha diversificado considerablemente, pasando a ser una herramienta muy precisa para responder preguntas de variación morfológica en contextos ecológicos y evolutivos. Ya ha pasado casi media década desde la última revisión del método, por lo que éste trabajo tiene como objetivo analizar los cambios metodológicos y los nuevos enfoques usados en Morfometría geométrica, y presentar una pequeña guía introductoria a éstos nuevos métodos, sus usos y aplicaciones.

PALABRAS CLAVE: Morfometría geométrica; Integración; Modularidad; Asimetría fluctuante; Covariación de la forma; Morfometría geométrica 3D.

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la biología, los investigadores se han valido de la morfología para realizar descripciones y observaciones de la naturaleza y la vida. Y éstas observaciones, en base a diferencias y similitudes han servido para realizar aproximaciones de relación entre grupos, poblaciones e incluso especies, siendo la base de la taxonomía clásica. No obstante, y a pesar de las descripciones detalladas, la morfología no podía ser sujeta a un análisis cuantitativo fuerte, limitándose sólo a mediciones lineales de las estructuras. Ya a comienzos de la década de 1930, y con el desarrollo de nuevas técnicas estadísticas multivariadas (Toro-Ibacache *et al.*, 2010), el enfoque pasó a ser conocido como “morfometría tradicional” (MT) o “morfometría multivariada” (Marcus, 1990; Rohlf & Marcus, 1993; Adams *et al.*, 2004). No obstante, esta aproximación tenía sus limitantes, al no obtener una visualización gráfica del cambio de la forma. No fue hasta que Kendall (1977) sentaría las bases de la metodología que prestaría solución a los vacíos de la morfometría tradicional, definiendo a la forma

como “Toda información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación”. Es así como la morfometría tradicional comenzó a centrarse en la verdadera “forma de las estructuras” al adoptar nuevas técnicas adicionales, enfoque que pasaría a ser conocido como “Morfometría geométrica” (MG).

La MG es el estudio de la covariación de la forma con factores geométricos subyacentes, y se utiliza para determinar la “forma pura” (Shape) en un individuo o estructura, mediante puntos discretos en el espacio y bien definidos (Landmarks) (Zelditch *et al.*, 2004). Este tipo de análisis no se ve afectado por el tamaño del individuo, así como tampoco por su rotación ni escala, por lo que la forma del objeto en estudio no se describe en términos de sus dimensiones, sino de la relación espacial entre sus partes (Toro-Ibacache *et al.*; Zelditch *et al.*). Esto constituye una diferencia fundamental con la MT, la que entrega una “forma total” (Form) (Marcus; Rohlf & Marcus; Adams *et al.*;

¹ Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

² Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile.

Zelditch *et al.*), y que no permite la recuperación de la forma en estudio. Lo anterior se debe a que las matrices que contienen la información, basadas en datos unidimensionales, sólo pueden entregar una representación abstracta de la estructura. La forma resultante en la MG, Shape en inglés, puede entregar importante información, como la adaptación a las presiones ambientales y reproductivas (Kaliontzopoulou *et al.*, 2010; Weaver & Gunz, 2018), así como también los rasgos que son más bien de carácter plesiomórficos y que permiten estimar grado de similitud entre individuos de distintos grupos o localidades (Fernández-Mazuecos *et al.*, 2013; Kaliontzopoulou *et al.*). Esto hace que la MG sea una herramienta útil y sencilla para evaluar similitudes y diferencias de carácter morfológico y ecológico entre individuos, grupos de una misma especie, entre especies distintas, poblaciones, etc. (Benítez & Püschel, 2014; Toro-Ibacache *et al.*). Lo último permite realizar estudios de delimitación de especie y variaciones interespecíficas (Zúñiga-Reinoso & Benítez, 2015).

Al igual que como ocurre con los nuevos enfoques para estudio de problemáticas biológicas, la MG ha incrementado su uso de forma exponencial en los últimos 10 años para responder preguntas de orden biológica en distintas áreas, en especial en biología integrativa. Así mismo, ha sufrido constantes cambios y actualizaciones en su metodología, haciendo al enfoque más preciso y capaz de resolver problemáticas cada vez más complejas (Benítez & Püschel, 2014; Toro-Ibacache *et al.*). Por ejemplo, en el pasado quedó el uso de los partial warps (Pw) y relative warps (rw), los cuales eran usados como valores de componentes principales de la deformación de la grilla de forma (Thin plate spline), en análisis estadísticos exploratorios (Rohlf & Marcus; Toro-Ibacache *et al.*). No obstante, y a pesar de que las grillas de transformación son una herramienta muy útil para la visualización de los cambios de la forma, no necesariamente son fiables dependiendo de los algoritmos matemáticos asociados (como Pw y rw), señalando el cambio en las regiones más alejadas de los landmarks, ya que esta transformación responde en mayor medida como resultado del algoritmo de transformación y carece de sentido biológico (Klingenberg, 2013b). Así mismo, estudios recientes (Wärmländer *et al.*, 2019) indican que, a pesar que lo que se creía anteriormente, los landmarks Tipo 1 son menos informativos que los Landmarks Tipo 3, en especial para recuperar información de la forma usando enfoques 3D.

Es por esta razón, y entendiendo la importancia del uso de las nuevas metodologías que corrigen los errores estadísticos metodológicos de la MG, es que se realiza esta revisión, para señalar las actualizaciones más recientes en MG, así como para indicar las nuevas metodologías, sus usos y las problemáticas que hoy en día intentan responder.

Revisión Bibliográfica. Para la revisión se realizó una búsqueda sistemática en los buscadores Scopus, Web of Science y Science Direct. Se utilizaron las palabras clave: Geometric Morphometrics, Fluctuating Asymmetry, Morphological Integration y Partial Least Squares. Además, como criterios de exclusión se consideraron únicamente los artículos científicos publicados en revistas desde el año 2010 en adelante, descartando revisiones bibliográficas y libros, y que con tuvieran al menos una de las siguientes palabras clave: “Geometric Morphometrics”, Evolution, Morphology, Morphometry, “Anatomy and histology”, y “Biological evolution”.

Se seleccionaron 65 artículos, los cuales fueron analizados para extraer la información de: Modelo de estudio, Método de análisis utilizado, Pregunta o Caso de estudio, y el Tipo de problemática (Tabla I). Y se graficó en el software GraphPad Prism V.5 la frecuencia de uso de metodologías (Fig. 1) y la frecuencia de temáticas de estudio (Fig. 2) desde el año 2010 al 2018.

Considerando que las temáticas más frecuentes actualmente para el uso de la MG son las evolutivas y ecológicas, distinguiéndose principalmente los métodos de: Integración y Modularidad, Asimetría Fluctuante, y Covariación de la forma (2B-PLS), es que en este trabajo nos centramos en ahondar en las metodologías de estas problemáticas. Por lo demás, y a pesar de que estas metodologías están cobrando importante notoriedad en las últimas décadas, no hay mucha bibliografía práctica que explique el uso y aplicaciones de los métodos, y en especial es relevante la falta de bibliografía en español, que pueda servir como un punto de inicio para los investigadores jóvenes que comienzan a profundizar en la MG.

Software. La morfometría geométrica desde sus inicios ha pasado por diferentes transiciones desde el punto de vista de software computacionales, donde en sus inicios la serie TPS por el profesor James Rohlf el cual bajo el alero de Stony Brook University y la web (<https://life.bio.sunysb.edu/morph/>) por décadas actualizado las múltiples opciones de TPS para el público en morfometría en general con la desventaja que solo servía para algunos sistemas operativos (debía ser utilizado en Mac con emuladores de Windows). Luego del tiempo y fines de la década del 90 otros softwares que integraban morfometría 3D fueron apareciendo contemporáneos a la serie TPS (Morpheus, Morphologica, Landmark editor entre otros). Chris Klingenberg académico de la Universidad de Manchester en Reino Unido, crea un software basado en la plataforma java denominado MorphoJ (Klingenberg, 2011) el cual integra muchos de los métodos que la serie TPS tiene por separados en un solo programa de fácil manejo y compatible con todos los siste-

Tabla I. Resumen de los trabajos analizados, metodologías usadas, caso de estudio y tipo de problemática. Nota 1: Eco= Ecología, DS= Dimorfismo Sexual, Alo= Alométrico, Evo= evolutivo.

n°	Año	Modelo	2D	3D	rw	PW	GPA	PCA	CS	CVA	PLS	FA	SW	RV	CR	CCA	Pregunta/Caso de estudio	Tpo problemática
			Método															
1	2010	canívoros y primates	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Efecto de la modularidad en la disparidad craneal	Descriptivo
2	2011	Cráneos Humanos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Comparación entre escaner laser 3D y digitizador 3D	Metodológico
3	2011	<i>Syneuria</i> sp (Lepidoptera)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Dimorfismo sexual	DS-Descriptivo
4	2012	perfil nasal humano	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Definir el perfil nasal según MG	Descriptivo
5	2013	Perro Mapache	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Variación de la forma en una población salvaje	Eco-Descriptivo
6	2013	<i>Linaria</i> sect. <i>Versicolares</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Evolución de los rasgos florales que restringen el acceso a polinizadores	Evo- Descriptivo
7	2013	Cráneos humanos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	variación morfométrica y dimorfismo sexual	DS-Descriptivo
8	2013	espeque de ratón de casa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	variación modular a nivel celular	Descriptivo
9	2013	<i>Ctenomys bicolor</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Validación de especie	Taxonómico
10	2013	<i>Ceroglossus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Dimorfismo sexual de tamaño en relación a la proporción de sexos	DS-Descriptivo
11	2013	<i>Bombus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Estudio sistemático	Taxonómico
12	2013	Felinos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	relación entre integración funcional y desempeño mecánico	Biomecánico
13	2013	<i>Crocodyra goliath (musanhuas)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Delimitación de especies	Taxonómico
14	2013	<i>Hyla plicata</i> (rana)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Variación morfológica altitudinal	Eco-Descriptivo
15	2013	<i>Ceroglossus chilensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Efecto del ambiente en la Asimetría fluctuante y dimorfismo sexual	Eco-Descriptivo
16	2013	Caballo doméstico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Dimorfismo sexual del hemixosis	DS-Descriptivo
17	2013	<i>Ceroglossus chilensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Asimetría fluctuante	Eco-Descriptivo
18	2013	Cráneos de Aves	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Comparar métodos para integrar filogenias y MG	Metodológico
19	2014	Comp. Craneo facial y molares humanos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Variación de la modularidad con la edad	Alo-Descriptivo
20	2014	<i>Diatroica virgifea</i> (Coleoptera)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Integración morfológica y modularidad	Evo-Descriptivo
21	2014	mamíferos caninos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Patrones de integración evolutiva en el esqueleto apendicular	Evo- Descriptivo
22	2014	Topillo (<i>Microtus</i>)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Origen de la organización modular de la dentición derivada	Evo- Descriptivo
23	2014	puñales de flecha de piedra	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Covariación de la forma de flechas líticas como procesos culturales adaptativos	Evo- Descriptivo
24	2014	<i>Agriopsis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Asociación entre variables ambientales y variación de la forma	Eco-Descriptivo
25	2014	Articulación de la cadera humana	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Evaluar la integración funcional de la articulación de la cadera	Evo- Biomecánico
26	2015	<i>Lutomyia umbratilis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Evaluación del tamaño y forma alar entre poblaciones	Eco-Descriptivo
27	2015	<i>Varanus spp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Análisis de la variación y relación con el rendimiento estructural y ecología alimentaria	Eco-Biomecánico
28	2015	<i>Amia calva</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Describir el patrón y la modularidad de los canales de la línea lateral sensorial y su integración con los huesos craneales de soporte	Evo-Descriptivo
29	2015	<i>Culex spp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Discriminación de especies	Taxonómico
30	2015	<i>Ochlerotatus scapularis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Descripción de la variabilidad morfológica	Descriptivo
31	2016	<i>Odontaspis spp</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Inferir delimitación entre 2 spp y morfós intermedios dulcecáucolas y marinos	Taxonómico
32	2016	<i>Varanus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	efecto de las vistas (Dorsal, ventral y lateral) influye en la variación de la forma inerspecifica. Comparar metodologías 2D y 3D	Metodológico
33	2016	Dentadura humana	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Investigar el efecto de la alometría sobre la forma de los contornos de la corona inferior dm2 (dm2) y M1 (M1) y examinar si la trayectoria y magnitud de la escala alométrica se comparan entre los	Alo-Descriptivo
34	2016	Datos simulados	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Evaluación de las propiedades del coeficiente RY	Metodológico

35	2016	<i>Aedes flaviventris</i>		1				1	Evaluar Dimorfismo sexual proponer un sis de análisis de libre acceso para ayudar en la estandarización de los estudio de micro tomografías (Micro-CT) computarizadas en el rñón de lab.	DS- Descriptiv o
36	2017	<i>Mus musculus</i>	1	1	1		1		Evaluar la variación morfológica en las estructuras más conspicuas de los aparatos de captura de presas.	Metodológico Biomec- Descriptiv o
37	2017	ciempiés geoflomorfo	1	1	1	1	1	1	relación entre diversidad craneal y desproporciones orofaciales con una menor fuerza de integración de los módulos craneales y por la desviación del patrón de covariación en comparación con los bos.	Eco- Descriptiv o
38	2017	<i>Canis lupus x C. lupus familiaris</i>			1			1	¿Qué procesos evolutivos impulsan la evolución fenotípica de los cráneos y mandíbulas en Ceratopsia? ¿Cuál es el grado de integración morfológica entre el cráneo y la mandíbula inferior, y entre el hocico y el diente de sierra entre los cladós? Finalmente, ¿hay algún cambio en la tasa de evolución morfológica de la filogenia ceratopsiana?	Evolutivo
39	2017	<i>Dinosaurios ceratopsidos</i>	1	1	1	1	1	1	Análisis del efecto de la integración craneal en la morfología endocraneal	Descriptiv o
40	2017	<i>Hominidos</i>	1	1	1	1	1	1	relación entre las diferencias morfológicas en la forma de las arcadas entre homínidos vivos, con la covarianza de la mandíbula superior e inferior, y el pre maxilar y el maxilar	Evo- Descriptiv o
41	2017	<i>Hominidos</i>	1	1	1	1	1	1		
42	2017	<i>Microsteraeria compereana (Desmidiáles)</i> <i>algas verdes)</i>	1	1	1	1	1	1	Determinar si las emicélabas están o no realmente integradas respecto a la covariación de los datos de forma	Descriptiv o
43	2017	<i>maníferos</i>	1	1	1	1	1	1	Documentación de la expresión morfológica del Zicoma en mamíferos para mejorar la comprensión del efecto de éste en la región postorbital	Descriptiv o
44	2017	<i>Coleoptera: Chrysomelinae</i>	1	1	1	1	1	1	Análisis de la variación morfológica y funcional de las alas posteriores	Biomecánico
45	2017	<i>Felidae</i>	1	1	1	1	1	1	Determinar si las interacciones de desarrollo son una primera influencia para la modularidad vertebral. Analizar la existencia de variación de integración a lo largo de la columna	Evoevo
46	2017	<i>Natrix spp</i>	1	1	1	1	1	1	Evaluación del grado de integración de los huesos funcionales y conectados en comparación de los desconectados, e impacto del desarrollo y función en la integración morfológica. Evaluación del efecto de la alometría en la integración morfológica del cráneo	Evoevo- Alometría
47	2017	<i>Hominidos</i>	1	1	1	1	1	1	proporcionar información morfológica detallada sobre las vértebras cervicales subaxiales	Descriptiv o
48	2018	<i>Hominidos</i>	1	1	1	1	1	1	Enfoque de MG para visualizar y comparar gradientes de selección entre taxa los vectores de diferenciación asociados y los gradientes de selección desde simulaciones neutrales	Metodológico
49	2018	<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	Evaluar la razón de la diferenciación de rostros entre europeos y chinos Han	Evo- Descriptiv o
50	2018	<i>Barbus balcanicus</i>	1	1	1	1	1	1	Comparar y visualizar la variación general de tamaño y forma tamaño sexual y dimorfismo de forma de diferentes localidades fragmentadas	Eco- Descriptiv o
51	2018	<i>Natrix helvetica - Vipera berus</i>	1	1	1	1	1	1	Evaluar el grado de dimorfismo sexual en tamaño y forma, junto con el impacto relativo de la alometría y las dimensiones corporales generales en la forma de la cabeza.	DS- Descriptiv o
52	2018	<i>grupo bisfovedatum</i>	1	1	1	1	1	1	Investigar la existencia de variación expresiva e integración en la forma de las partes de penetración de la genitalia y los parámetros a través que los especímenes de esos especímenes difieren a lo largo de la vida.	Evoevo- Descriptiv o
53	2018	Bífaces gahagan (punta de flecha de piedra)	1	1	1	1	1	1	Comparación de la morfología ente las bífaces comparando dos sitios de muestreo	Eco- Descriptiv o
54	2018	<i>Gobiox marmoratus</i>	1	1	1	1	1	1	Efecto del extoparásitismo en el morfospacio de larvas de peces morfológica craneal en 2 especies de caimanes, enfocándose en aquellas áreas relevantes a la sistematía ca. Relación entre la dieta y cambios Descriptivos durante la ontogenia	Descriptiv o
55	2018	<i>Cañman latinstris - C. yacare</i>	1	1	1	1	1	1		Taxonómico

56	2018	Forma de huevo	1	1	1	1	1	1	Proponer una nueva metodología para cuantificar los patrones de variación de la forma de huevo utilizando morfometría geométrica de puntos de referencia tridimensionales capturados en cáscaras de huevo reconstruidas digitalmente y demostrar su rendimiento en la captura de la variación de la forma a múltiples niveles biológicos.	Metodológico
57	2018	<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	Probar la hipótesis de que los esqueletos tempranos de humanos en Chile poseen una morfología craneal distinta a la de lo esqueletos posteriores	Evo-Descriptivo
58	2018	<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	Comprobar el tamaño de la caja torácica en relación a la latitud de hábitat, así como la correlación entre el tamaño de las costillas y la latitud. Analizar si esta relación es común entre las poblaciones adaptadas al frío	Eco-Descriptivo
59	2018	<i>Stagnicola caperata</i>	1	1	1	1	1	1	Investigar la afinidad taxonómica comparando las poblaciones con los topotipos.	Taxonómico
60	2018	<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	Investigar la variación de tamaño y forma de los premolares humanos entre indígenas australianos y australianos de ascendencia europea, y analizar las diferencias entre sexo y ancestría.	Evo-Descriptivo
61	2018	<i>Cercopithecus</i>	1	1	1	1	1	1	Presentación de un método para visualizar las similitudes y diferencias de las trayectorias ontogenéticas craneales entre los tax a un método para reconstruir trayectorias ontogenéticas ancestrales (contexto filogenético).	Metodológico-Evo-Devo
62	2018	<i>Rattus praetor</i>	1	1	1	1	1	1	Comprobación de la señal filogenética en las trayectorias ontogenéticas.	Taxonómico
63	2018	<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1	1	1	Delimitación de spp crípticas usando morfometría de los rasgos dentales	Metodológico
64	2018	<i>Clibanarius signatus</i>	1	1	1	1	1	1	presentar una técnica precisa basada en puntos de referencia para reconstruir la forma tridimensional de las superficies entesales humanas, para investigar si la forma de las entesis humanas está relacionada con su tamaño. También se evaluaron los efectos de la edad a la muerte y la longitud de los huesos en las formas de entesas	Eco-Descriptivo
65	2018	<i>Strepsirrhinos</i>	1	1	1	1	1	1	Análisis de la variación morfológica interpoplacional del caparazón	Biomec-Evolutivo
									Investigar la relación entre el comportamiento de agarre y la morfología de las extremidades anteriores en strepsirrhinos en un contexto filogenético	

mas operativos. No obstante, en los últimos 10 años de investigación en el área y dentro de las nuevas aplicaciones en morfometría geométrica, el uso de R como software ha adquirido la fuerza suficiente para implementar todas las herramientas necesarias que una investigación en morfometría geométrica necesita desde la digitalización 2D o 3D hasta sus análisis correspondientes, por su versatilidad en la variedad y combinación de sus paquetes.

R es un entorno de programación libre que se utiliza para el procesamiento y análisis estadístico de datos entre otros análisis utilizando el lenguaje S. La variedad de software en morfometría geométrica no es muy amplia, no obstante, una buena combinación de software entre MorphoJ para principiantes y R más avanzados podría ser una buena recomendación.

Aprender R ciertamente necesita de práctica, y uso diario, entrenamiento que entrega una curva de aprendizaje notoriamente empinada. Depende las necesidades usando R no es necesario comprender el arte de la programación para poder realizar análisis morfométricos en R, no obstante, se necesita aprender algunos conceptos básicos y cómo manipular los archivos en R.

Zelditch *et al.* (2012) indica que la ventaja de aprender los conceptos básicos de R es que la curva de aprendizaje para la morfometría geométrica es rápida y versátil debido a que los paquetes disponibles hoy en día han sido implementados con el cuidado necesario en sus guías de usuario que suelen ser muy simple seguir, es así como el Dr. Dean Adams y su equipo liberan el paquete morfométrico "geomorph" (Adams & Otárola-Castillo, 2013), además de la implementación de un foro de google (<https://groups.google.com/forum/#!forum/geomorph-r-package>) libre para que cualquier usuario de geomorph puede hacer preguntas, y su equipo, o cualquier usuario experimentado puede ayudar a la comunidad morfometría a responder sus preguntas y de la misma forma motivar al uso de R para análisis morfométricos.

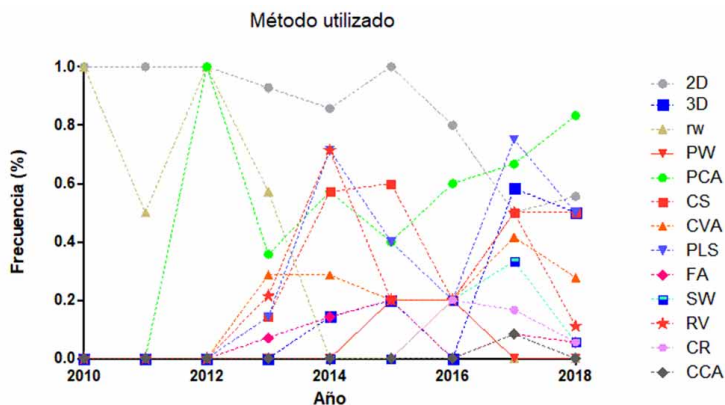


Fig. 1. Frecuencia porcentual de los métodos usados desde 2010 a 2018. rw= relative warp, PW= partial warp, PCA= análisis de componentes principales, CS= tamaño del centroide, CVA= análisis de variables canónicas, PLS= mínimos cuadrados parciales, FA= asimetría fluctuante, SW= singular warp, RV= Coeficiente de Escoufier, CR= tasa de covarianza, CCA= análisis de correlación canónica.

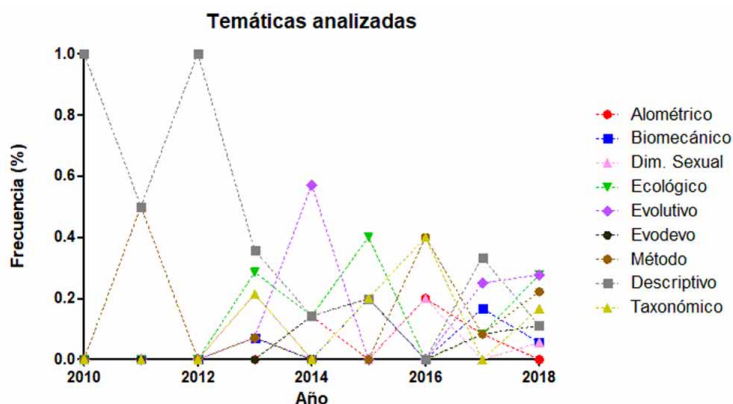


Fig. 2. Frecuencia Porcentual de las temáticas analizadas con MG desde 2010 a 2018. Nótese que las problemáticas evolutivas y ecológicas suman alrededor del 60 % de las evaluadas durante el año 2018.

MÉTODOS

En la primera parte de este review, publicado por Benítez & Puschel (2014) se tocaron los temas básicos de la morfometría geométrica con una somera incursión en las técnicas morfométricas para estudios en ecología y evolución, las cuales en esta versión serán explicadas con mayor profundidad.

Integración Morfológica y Modularidad. Se conoce como integración morfológica (IM) al fenómeno de la variación morfológica coordinada entre rasgos funcionales y del desarrollo de los organismos (Benítez & Puschel, 2014; Klingenberg, 2013b). A través de sus aspectos genéticos y del desarrollo, la IM está estrechamente relacionada con las mismas limitaciones evolutivas y del desarrollo (Futuyma, 2010;

Klingenberg, 2013b). En la última década, esta temática ha ganado particular protagonismo, en especial por el interés de los investigadores en responder preguntas complejas, que relacionan la variación morfológica con aspectos funcionales, del desarrollo u evolutivos, entre otros (Andjelkovic *et al.*, 2017; Bardua *et al.*, 2019; Bonneau *et al.*, 2014; Curth *et al.*, 2017; Klingenberg, 2013a; Labonne *et al.*, 2014; Maiorino *et al.*, 2017; Neustupa, 2017; Randau & Goswami, 2017; Stefanello *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2019; Zollikofer *et al.*, 2017).

A cada nivel de IM hace referencia de una forma u otra a la covariación entre las partes o rasgos, pero el origen de esta variación, así como el contexto conceptual y el enfoque de la investigación difieren de un nivel a otro (Klingenberg, 2008, 2013a). Klingenberg (2014) analiza el estudio de la IM en varios niveles desde un nivel estático que incluye integración tanto en función, desarrollo, genético y ambiental, como a niveles ontogenéticos y evolutivos, para esto se ha utilizado una variedad de métodos morfométricos los cuales han cuantificado la forma de medir los niveles de integración de distintas maneras. Un método común es la cuantificación de la varianza de los eigenvalues en un PCA (Young 2006), o analizar los patrones de covariación entre partes utilizando un partial least-squares analysis (PLS). Además de estos "métodos estándar" para analizar los niveles de integración morfológica, algunos métodos morfométricos están diseñados específicamente para comparar patrones de integración en diferentes matrices de covarianza (análisis de coordenadas principales (PCoA)), una tarea que es especialmente relevante para comparaciones en diferentes niveles (Gonzalez *et al.*, 2011).

Un primer trabajo que compara y evalúa la integración en múltiples niveles desde el punto de vista estático, desarrollo y evolutivo fue el trabajo publicado por Klingenberg *et al.* (2013a) el cual evalúa principalmente aspectos de integración y modularidad evolutiva en la diversificación del cráneo de Aves. Bonneau *et al.*, integra la morfometría 3D con la integración funcional, estudiando la articulación de la cadera en homínidos respecto a la postura bípeda. Para reducir el efecto de la orientación tridimensional en la covariación, los autores evaluaron los patrones de covariación entre sus respectivos valo-

res tridimensionales de cada estructura, los cuales fueron cuantificados usando el coeficiente de RV de Escoufier como los métodos de PLS. Desde otro punto de vista, Watanabe *et al.* integra patrones ecomorfológicos con la diversificación evolutiva y la integración morfométrica en cráneos de reptiles principalmente Squamata (lagartos y serpientes), encontrando que, a pesar de sus tendencias evolutivas dispares, los lagartos y las serpientes comparten un patrón común de integración de rasgos, con las correlaciones más altas en el occipital, la articulación de la mandíbula y el paladar. Por lo tanto, Watanabe *et al.* concluye que los fenotipos altamente diversos, ejemplificados por lagartos y serpientes, pueden surgir de la selección diferencial que actúa sobre patrones conservados de integración fenotípica.

Cabe destacar que la forma en la cual se cuantifica la integración morfológica ha pasado por serias revisiones desde su punto de vista metodológico. Tanto los análisis de coeficiente de RV como de PLS están basados en la matriz de covarianza, aunque ambos procesos son distintos y responden de forma diferente la pregunta de covariación. El coeficiente de RV representa la cantidad total de la covarianza, escalada por la cantidad de variación entre dos sets de variables (Klingenberg, 2009; Adams, 2016). Se han utilizado pruebas de permutación para evaluar la significación estadística del coeficiente de RV, es decir, las observaciones en los dos conjuntos se permutan aleatoriamente para simular la hipótesis nula de independencia completa. En cuanto al análisis de PLS, este calcula las combinaciones lineales de covarianza maximizada utilizando el método de descomposición del valor singular para maximizar la representación de baja dimensión de la estructura de covarianza entre bloques. El análisis del coeficiente de RV y el análisis de PLS son dos métodos complementarios para explorar patrones de covarianza, ya que el primero trabaja en la covarianza total entre dos matrices en relación con la varianza de cada matriz, mientras que el segundo trabaja en dos de los ejes de covarianza máxima.

Es necesario destacar que la IM no es uniforme a través de todo el organismo, sino que tiende a concentrarse en ciertos complejos de partes que están estrechamente integradas de forma interna, pero que son independientes de otros complejos (Klingenberg, 2013b), y la integración entre éstos es relativamente débil (Adams, 2016). A estos complejos se les denomina módulos, por lo tanto, se entiende como Modularidad a la división de sistemas del desarrollo en componentes parcialmente disociados que se encuentran integrados a partir de distintos niveles de organización biológica (Adams, 2016; Klingenberg, 2008).

Modularidad. La modularidad describe el caso en el que los patrones de covariación de los rasgos están desigual-

mente dispersos entre estos. Un módulo se puede definir como una unidad morfológica dentro de la cual existe una alta integración de varias y/o fuertes interacciones, pero que a la vez poseen cierto grado de independencia de esas unidades (Benítez & Püschel, 2014; Klingenberg, 2008).

La modularidad se encuentra en la organización de redes biológicas en diferentes contextos, desde la regulación genética hasta las redes alimentarias en los ecosistemas (Klingenberg, 2010). Los estudios de integración morfológica y modularidad difieren de los análisis de redes en otros contextos, porque las interacciones responsables de la integración no son directamente observables y, en cambio, deben inferirse a partir de los patrones de covariación entre rasgos. Debido a esta razón, la modularidad ha sido temática de particular relevancia en la última década, en especial en estudios de evolución del desarrollo, donde varios autores argumentan que proporciona la flexibilidad suficiente para que diferentes rasgos evolucionen más fácilmente bajo demandas funcionales diferentes y/o contrastantes (Andjelkovic *et al.*; Asahara, 2013; Goswami & Polly, 2010; Lehoux & Cloutier, 2015; Maga *et al.*, 2017; Maiorino *et al.*; Randau & Goswami, 2017, 2018; Simons *et al.*, 2018; Stefanello *et al.*; Tamagnini *et al.*, 2018; Zollikofer *et al.*). Por consiguiente, la delimitación de módulos a partir de datos sobre patrones de covariación es una preocupación clave para la evolución del desarrollo de la forma (Klingenberg, 2010). La modularidad, debido a la escasa integración entre los módulos, puede mitigar los efectos de las limitaciones que se aplicarían si la variación estuviera plenamente integrada. Felice *et al.* (2018) proponen que la magnitud, patrón y relación de rasgos que describen tanto la IM como la modularidad, reflejan interacciones genéticas, de desarrollo y funcionales, que dan forma a los procesos evolutivos al regular la capacidad de evolución y restricciones de ésta. Esto debido a la disparidad morfológica (diversidad) que se puede observar en escalas temporales macroevolutivas. Por lo tanto, la IM y la modularidad han sido descritas como las influencias fundamentales en la evolución morfológica y en la generación de biodiversidad. Específicamente, se sugiere que la fragmentación de las relaciones entre los rasgos, en módulos semiautónomos promueve la capacidad evolutiva al liberar conjuntos de rasgos con presiones de selección divergentes de las restricciones de su covariación, impuestas por la pleiotropía genética o la canalización del desarrollo (Felice *et al.*). Efectivamente, los autores evidenciaron que el patrón de disparidad morfológica respondía a un patrón de movimiento Browniano, siendo la varianza morfológica proporcional al tiempo y a la tasa de mutación (Felsenstein, 1985).

Por otra parte, para sets de datos morfométricos, las hipótesis de modularidad han sido comúnmente evaluadas

con el uso del coeficiente de RV, que es un estadístico de asociación utilizado en una amplia variedad de campos (Klingenberg, 2009). No obstante, Adams (2016) utilizando datos simulados, demuestra que el coeficiente de RV es afectado negativamente por los atributos de los datos (tamaño muestral y número de variables), por lo que no caracteriza la covarianza de las estructuras entre los sets de variables (Fig. 3). En las simulaciones, se puede observar como en los sets de datos con bajo tamaño muestral produce valores de RV altos, y viceversa (Fig. 3A). La razón de este pa-

trón es debido a que el denominador del coeficiente de RV (Fig. 4B), contiene tanto a la variación dentro de los módulos, como además la variación de todos los rasgos, los cuales se escalan con el tamaño muestral (Klingenberg, 2009). Así mismo, se evaluó el efecto del número de variables, y se encontró que el valor del coeficiente de RV también depende altamente de esto (Fig. 3B). Específicamente, se observó el valor del coeficiente de RV es directamente proporcional a la cantidad de variables examinadas. Para solucionar estos inconvenientes, Adams (2016) propone el test denominado covariance ratio (CR), para cuantificar la modularidad y demostrar que no se ve afectada por el tamaño de la muestra o el número de variables y además, complementado por un test estadístico estandarizado desarrollado por Adams & Collyer (2019) denominado (Covariance Ratio Effect Sizes: ZCR) para medir el grado de modularidad y estandarizar el efecto del tamaño entre conjuntos de variables y poder hacer una comparación estadística esta herramienta publicada a fines del 2019 se basada en el análisis de CR (Adams, 2016) para comparar la intensidad de la señal modular en los conjuntos de datos, así como para evaluar los patrones de la señal modular según la definición de hipótesis de modularidad alternativas para el mismo set de datos.

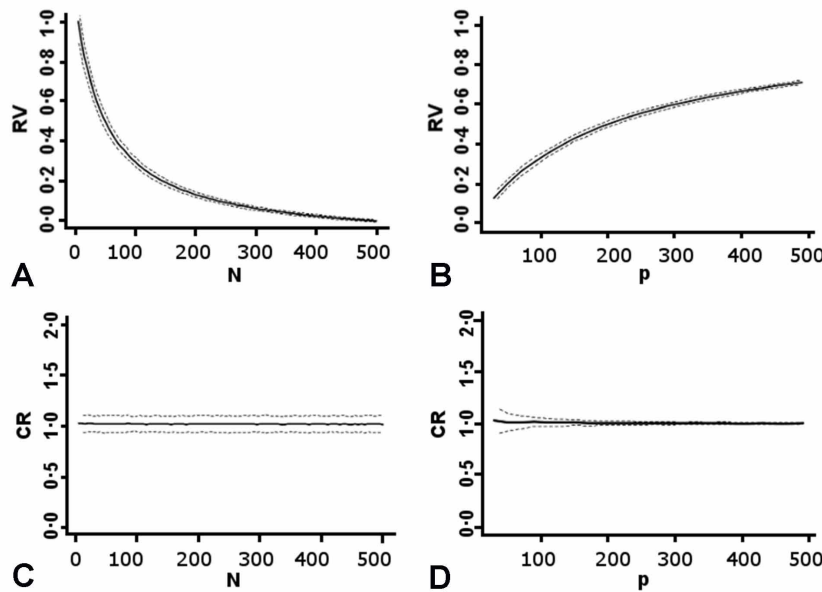


Fig. 3. Evaluación de los coeficientes de RV y CR bajo la hipótesis de asociación aleatoria de las variables (sin modularidad ni estructuración). (a) Valores de RV a distintos tamaños muestrales para datos simulados, (b) Valores de RV para datos simulados a distinta cantidad de variables. (c) Valores de CR a distintos tamaños muestrales para datos simulados, (d) Valores de CR para datos simulados a distinta cantidad de variables (Adams, 2016).

$$\begin{array}{ll}
 \text{A} & S = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{bmatrix} \\
 \text{B} & RV = \frac{\text{traza}(S_{12}S_{21})}{\sqrt{\text{traza}(S_{11}S_{11})\text{traza}(S_{22}S_{22})}} \\
 \text{C} & S = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{bmatrix} \\
 \text{D} & CR = \sqrt{\frac{\text{traza}(S_{12}S_{21})}{\sqrt{\text{traza}(S_{11}^*S_{11}^*)\text{traza}(S_{22}^*S_{22}^*)}}}
 \end{array}$$

Fig. 4. A) Matriz de covarianza para el coeficiente de RV, donde los bloques diagonales S1 y S2 corresponden a las matrices de covarianza de los dos conjuntos de variables, mientras que el bloque fuera de la diagonal S12 es la matriz de covarianzas entre las variables de los dos conjuntos (la matriz S21 es la transposición de S12). B) Ecuación para el coeficiente RV de Escoufier. C) Matriz de covarianza para el coeficiente de tasa de covarianza (CR), donde los bloques diagonales S11 y S22 corresponden a las matrices de covarianza dentro de cada módulo, mientras que S12 y S21 describen la covarianza entre módulos. D) Ecuación para el coeficiente de covariación CR, donde S*11 y S*22 representan las matrices de covariación dentro de cada módulo respectivo, reemplazando los elementos nulos por ceros (Klingenberg, 2009; Adams).

A diferencia del coeficiente de RV, el CR usa sólo los pares de covarianza entre las variables, para cuantificar la estructura modular (Fig. 4D). Para estimar la relación de la covarianza, se obtienen variables en cada uno de los dos módulos (Y1 e Y2) para las N muestras. Las matrices de datos pueden entonces concatenarse en una única matriz (Y), a partir de la cual se construye la matriz de covarianza global (Fig. 4C), donde S11 y S22 son las matrices de covarianza dentro de los módulos Y1 e Y2 respectivamente, y S12 y S21 describen la covariación entre módulos. Así, al reemplazar con ceros los elementos diagonales de las matrices S11 y S22 (S*11 y S*22 respectivamente), obtenemos la ecuación para calcular el coeficiente CR (Fig. 6D). Al revisar la ecuación de CR, se puede apreciar que éste representa la tasa de covariación total entre los módulos re-

lativos al total de la covariación dentro de los módulos. Específicamente, el numerador se obtiene a partir de la matriz de covarianza entre módulos (S12), y describe la suma total de la covarianza cuadrada entre Y1 e Y2. Por el contrario, el denominador se obtiene de la matriz de covarianza dentro de cada módulo (S11 y S22), por lo que describe la suma total del cuadrado de la covariación en cada dimensión del rasgo. Debido a que el CR describe la covariación entre módulos en relación con la covariación dentro de los módulos, es apropiado para evaluar pruebas de modularidad, en lugar de simplemente describir la covariación entre módulos. Así, el coeficiente de CR puede considerarse como una herramienta analítica complementaria, útil para diferentes propósitos. Empíricamente, el coeficiente de CR va desde cero a valores positivos, siendo directamente proporcional al grado de covariación entre módulos. En cuanto al desempeño de CR respecto a los datos simulados, se observó que el valor de CR esperado se mantiene constante a medida que aumenta el tamaño muestral (Fig. 3C). Así mismo, se observó que a medida que aumenta el número de variables, el coeficiente de CR alcanza la asíntota rápidamente (Fig. 3D). Por lo tanto, y a diferencia del coeficiente de RV, la hipótesis de covarianza nula de asociaciones aleatorias de variables, independiente de la relación, muestra un valor esperado constante ($CR = 1.0$) bajo distintos tamaños muestrales o cantidad de variables analizadas.

Como ejemplo de trabajos que evalúen modularidad con el coeficiente de CR, es el trabajo de Randau & Goswami (2017), en el cual analizan la hipótesis del desarrollo de módulos en las vértebras de félidos, con tal de determinar cómo las interacciones del desarrollo son la principal influencia en la modularidad vertebral. Además, analizaron la magnitud tanto de la integración como de la disparidad intravertebral, para evaluar si el nivel de integración varía a lo largo de la columna vertebral y, de ser así, si la integración y la disparidad están asociadas. Para esto utilizaron landmarks 3D en 19 de las 27 vértebras presacrales en nueve especies de félidos, los cuales fueron sometidos a análisis de GPA individuales para cada vértebra. Para recuperar la información de la forma, utilizaron un digitalizador MicroScrib® G2X de inmersión. Se hipotetizó que las vértebras estaban compuestas por dos módulos: “el centro” y la “espinas neural”. Se evaluó el grado de modularidad y la significancia de esos modelos usando tanto el método del coeficiente de RV como el de CR. Para analizar las distintas especies, y sin eliminar de todo el efecto de la señal filogenética (que puede determinar la fuerza de la modularidad), se realizó una corrección para agrupar las distintas especies en un mismo análisis, mediante una matriz combinada de varianza-covarianza (VCV) para cada vértebra, y luego se evaluó esta VCV con el uso del análisis de CR. La matriz de VCV fue calculada mediante una función de covarianza en R. Es importante señalar que ésta es

una nueva utilización para el coeficiente de CR, el cual aún no ha sido testeado mediante simulación de datos. No obstante, los resultados de modularidad tanto con o sin el uso de la matriz de VCV, fueron similares, por lo tanto, no existe alguna razón obvia para pensar que las propiedades del método CR no sean válidas para este caso.

Los resultados del trabajo, confirmaron la hipótesis del desarrollo modular de las vértebras, mostrando dos módulos en las vértebras más presacrales (Fig. 5). Las excepciones se centran en los límites entre las regiones tradicionales y funcionales, lo que sugiere que la modularidad intervertebral puede reflejar una modularidad a mayor escala en la columna de los félidos. Además, las autoras demostraron que la integración

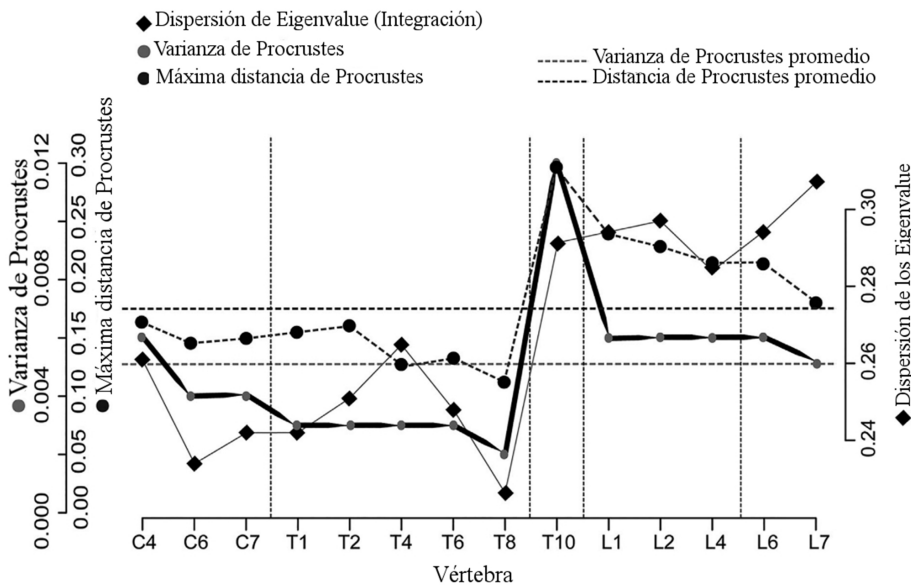


Fig. 5. Diagrama que muestra la distribución de la disparidad morfológica entre especies (como varianza de Procrustes y distancia máxima de Procrustes) y la dispersión de valores propios (es decir, la integración morfológica) a través de las vértebras C4 a L7, calculada utilizando 16 puntos landmarks homólogos. Las líneas verticales discontinuas ilustran los límites morfológicos y funcionales de la columna vertebral presacra, mientras que las líneas discontinuas horizontales representan la varianza media de Procrustes (gris) y la distancia media de Procrustes (negro) (Randau & Goswami, 2017).

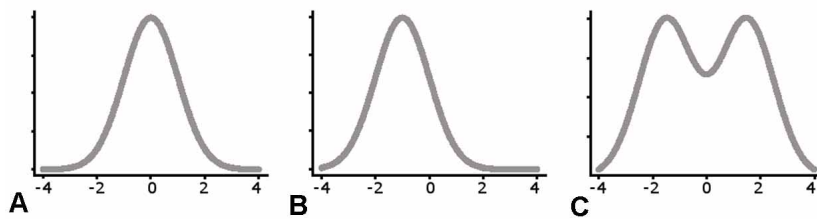


Fig. 6. Gráficos de frecuencia para las diferencias entre lados derecho e izquierdo de acuerdo a los principales tipos de asimetría. a) Asimetría Fluctuante “pura”. Las diferencias derecho-izquierdo siguen una distribución acampanada con una media de cero (ausencia de asimetría direccional); b) Asimetría Direccional y simétrica. Las diferencias derecho-izquierdo están distribuidas a alrededor de una media distinta de cero, indicando asimetría direccional. La dispersión de las diferencias individuales derecha-izquierda alrededor de la media, es asimetría fluctuante. c) Antisimetría. La distribución de las diferencias derecha-izquierda es bimodal, indicando que la mayoría de los individuos son claramente asimétricos, pero pueden estar sesgados hacia la derecha o a la izquierda. Las unidades de los ejes del gráfico son arbitrarias (Palmer & Strobeck 1986).

general y la disparidad son mayores en las vértebras posteriores, proporcionando así un ejemplo empírico de integración que potencialmente promueve mayores respuestas morfológicas a la selección.

Asimetría Fluctuante. Si consideramos que toda respuesta fenotípica es producto de la interacción entre el genoma y el ambiente, entonces podemos suponer que, en ciertas ocasiones, es el ambiente el que determina la variabilidad morfológica de ciertos rasgos o individuos. En la mayor parte de los casos, los organismos presentan un plan corporal consistente en la repetición de estructuras en diferentes posiciones u orientaciones unas de otras (Palmer & Strobeck, 1986). A esto se le conoce como simetría (Klingenberg, 2015). En la naturaleza podemos encontrar varios tipos de simetría, siendo la simetría radial (como la presente en algunas flores, cnidarios y equinodermos), y la simetría bilateral las más comunes en la naturaleza, siendo esta última la más extendida entre los animales. Este tipo de simetría se caracteriza por la capacidad de distinguir un lado derecho e izquierdo a través de un plano medio del cuerpo, haciendo que estos lados sean una imagen espejo una de otra. Esta reflexión a través del plano medio del cuerpo, es importante para la simetría bilateral, y puede ser usada para caracterizarla (Benítez *et al.*, 2011b).

Matemáticamente, un objeto es simétrico si al realizar transformaciones sobre éste, la forma del objeto permanece sin cambios. Por ejemplo, la reflexión sobre el plano medio, deja a las estructuras simétricamente bilaterales inalteradas. De forma similar, la rotación sobre el eje, de un objeto de simetría radial, dejaría inalterada la forma del objeto o estructura.

Al ser ambos lados (derecho e izquierdo) configurados por los mismos genes, podemos esperar que bajo condiciones idóneas del desarrollo, ambos lados sean idénticos uno del otro (Benítez & Püschel, 2014; Klingenberg, 2015). De lo contrario, al detectar asimetría en la forma de estructuras u organismos, entonces podemos estar ante la presencia de algún factor o condición que produce alteraciones en la estabilidad del desarrollo (Polak, 2003). Los patrones de asimetría son la manifestación observable de procesos biológicos, pero no son procesos biológicos en sí (Klingenberg, 2015). Es decir, son la consecuencia de un proceso biológico. Inferir procesos biológicos desde patrones de asimetría es complejo, y por lo general requiere de evidencia adicional. Tradicionalmente, tres tipos de asimetrías pueden distinguirse en una población, acorde a la distribución de las diferencias entre los lados derecho e izquierdo: asimetría direccional, asimetría fluctuante y antisimetría (Fig. 6). Estos tipos de asimetría difieren en sus propiedades estadísticas, así como por sus orígenes e implicancias biológicas (Palmer & Strobeck, 1986).

La asimetría direccional puede ser cuantificada por las diferencias promedio entre los lados derecho e izquierdo. Esta diferencia entre los lados puede ser grande o pequeña, pero el promedio de las diferencias entre los lados derecho e izquierdo debe diferir de cero. El mejor ejemplo de asimetría direccional es la disposición de los órganos internos en la mayoría de los animales, incluidos los humanos, donde el corazón está en el lado izquierdo, el intestino está enrollado de manera constante y asimétrica, y otros órganos como los pulmones o el hígado también son asimétricos de manera consistente. La disposición en espejo de todos los órganos internos, *situs inversus*, es rara en humanos y la heterotaxia, o *situs ambiguus*, es también una condición rara en humanos donde sólo algunos pero no todos los órganos internos ocurren en la orientación de la imagen en espejo y se asocia con malformaciones y causa morbilidad o mortalidad graves en personas afectadas (Sutherland & Ware, 2009).

La asimetría direccional requiere diferencias sistemáticas de desarrollo entre el lado izquierdo y el derecho. Tales diferencias han sido investigadas extensamente para las asimetrías direccionales conspicuas de los órganos internos que existen en la mayoría de las fila de los animales bilaterales, y se ha encontrado una variedad de mecanismos moleculares que pueden establecer una distinción inicial

entre los lados izquierdo y derecho y transmitir esta información a los órganos en desarrollo (Coutelis *et al.*, 2014; Namigai *et al.*, 2014; Vandenberg & Levin, 2013). Algunos de los mecanismos y genes involucrados en la producción de la asimetría direccional de los órganos internos parecen estar muy conservados, lo que sugiere que la asimetría izquierda-derecha es una característica ancestral de los animales bilaterales (Coutelis *et al.*; Namigai *et al.*; Pélabon *et al.*, 2006; Vandenberg & Levin). La posible importancia funcional y adaptativa de la asimetría direccional no está clara (Namigai *et al.*; Pélabon *et al.*) y es concebible, por ejemplo, que los bajos niveles de asimetría direccional de muchas estructuras externas sea una consecuencia no adaptativa de las limitaciones del desarrollo relacionadas con la asimetría direccional conspicua de los órganos internos. Benítez *et al.* (2014b) demuestra en un estudio con escarabajos invasores que los niveles de simetría direccional además pueden ser heredables o pasar de generaciones siendo esta característica conspicua de dichas poblaciones.

En el caso de la antisimetría, por el contrario, la mayoría de los individuos de una población son asimétricos, pero difieren en la dirección de la asimetría. Así, la población es-

tará conformada por una mezcla de afines al “lado derecho” y afines al “lado izquierdo” (Klingenberg, 2015). Y como resultado de esta mezcla, la distribución de las frecuencias de las diferencias derecha-izquierda puede ser bimodal (Fig. 7c). En algunos casos, cuando la antisimetría es débil, con pequeñas variaciones de simetría, puede que no se observe un claro patrón bimodal. Por lo que parecería razonable prever una transición gradual entre la asimetría fluctuante y la antisimetría. Para poder definir de forma correcta a la antisimetría, se requiere de algún tipo de correlación negativa o retroalimentación entre los valores de los rasgos de los lados derecho e izquierdo (Klingenberg, 2015). Mientras que tal correlación es inexistente en la asimetría fluctuante. La antisimetría está altamente extendida en la naturaleza, tanto en animales como en plantas, pudiéndose observar por ejemplo en las tenazas de algunas especies de cangrejo, o en la forma de algunas orquídeas.

La asimetría fluctuante (FA) a diferencia de la asimetría direccional y la antisimetría, denota pequeñas diferencias ente los lados derecho e izquierdo, debido a imprecisiones aleatorias ocurridas durante los procesos de desarrollo (Klingenberg, 2015). Si se espera que un rasgo morfológico

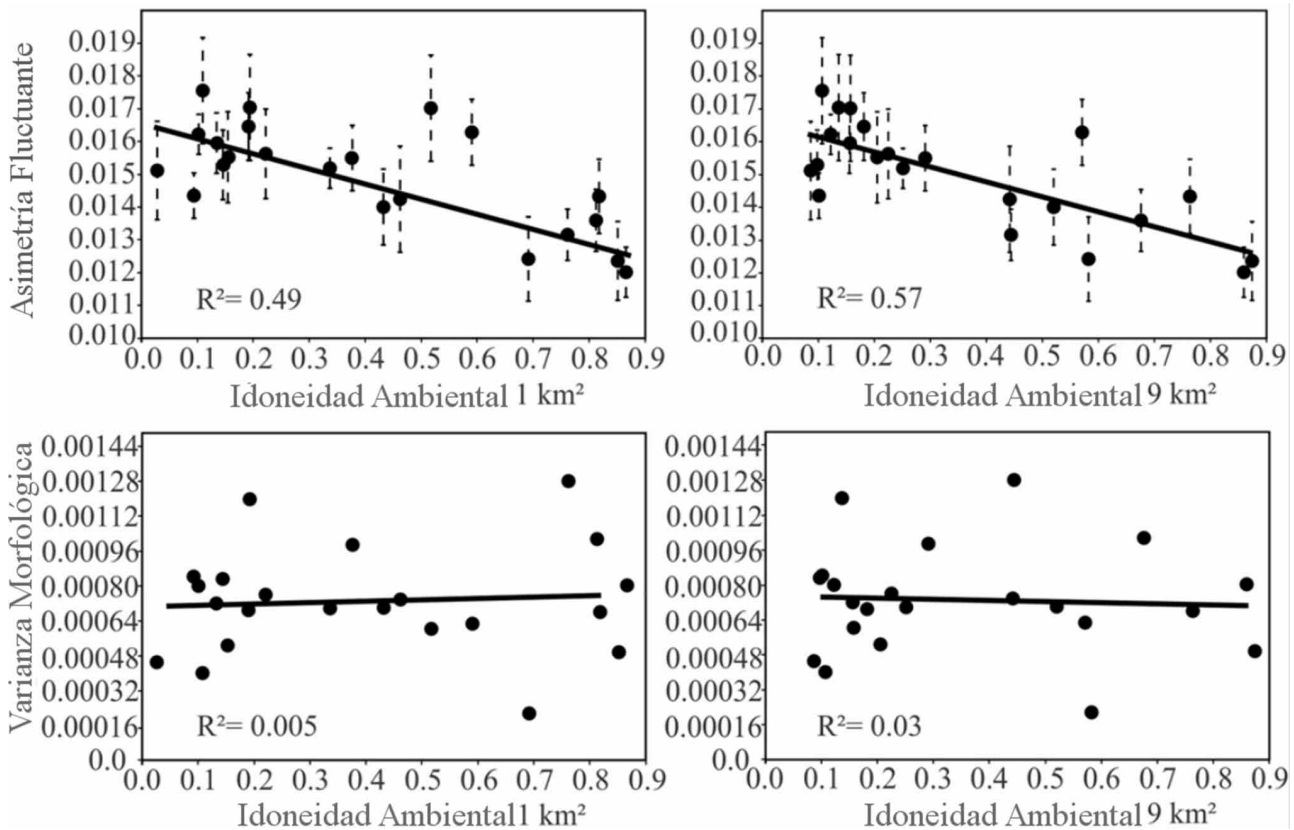


Fig. 7. La relación entre asimetría fluctuante, variabilidad morfológica e idoneidad ambiental. Las gráficas de dispersión muestran la relación entre la asimetría fluctuante y la idoneidad ambiental en dos escalas espaciales (arriba) y la relación entre la varianza morfológica y la idoneidad ambiental (abajo). Las barras discontinuas representan el error estándar. Se muestra el valor del coeficiente de determinación (Maestri *et al.*, 2015).

se exprese, en promedio, de una manera particular bajo el control de un genoma particular, bajo condiciones ambientales particulares, y para el lado del cuerpo en cuestión, un rasgo real se desviará generalmente en mayor o menor medida de esta expectativa (o "fenotipo ideal" (Nijhout & Davidowitz, 2003)). Estas desviaciones existen porque los procesos de desarrollo no son totalmente deterministas, sino que tienen un componente inherente de variación aleatoria (Klingenberg, 2015). A este componente aleatorio o residual, es a lo que se le conoce como asimetría fluctuante. Un problema práctico con este razonamiento es que el fenotipo objetivo normalmente no se conoce, pero debe ser estimado. Si el fenotipo ideal se estima por el promedio de cada lado de una población de organismos genéticamente homogéneos desarrollados en un mismo ambiente, entonces la asimetría fluctuante puede obtenerse como la diferencia entre la asimetría de cada individuo y el promedio de la asimetría direccional (Polak). En otras palabras, la asimetría fluctuante es la variación individual de las diferencias izquierda-derecha de los valores de los rasgos (Klingenberg, 2015; Van Valen, 1962). Algunos autores han sugerido que esta debería ser una distribución normal y que las pruebas de kurtosis podrían ser útiles para distinguir entre asimetría fluctuante y antisimetría o para hacer inferencias sobre procesos biológicos subyacentes (Van Dongen *et al.*, 2003; Palmer & Strobeck, 2003) explican que una distribución normal de las diferencias izquierda-derecha surge si las desviaciones del fenotipo objetivo son el resultado de muchos pequeños efectos aleatorios que son aditivos e independientes entre sí. Esta es una traducción biológica del teorema del límite central de la estadística. Si bien es plausible que las fluctuaciones del desarrollo sean aleatorias en sus direcciones, es dudoso que sean aditivas e independientes, porque los procesos no lineales (no aditivos) y la interdependencia mutua son características prominentes de los procesos del desarrollo (Klingenberg, 2003).

Muchos estudios han utilizado la asimetría fluctuante como medida de la inestabilidad del desarrollo (Benítez *et al.*, 2013a, 2018; Bravi & Benítez, 2013; Maestri *et al.*) y han tratado de correlacionarla con medidas de exposición al estrés u otras condiciones adversas, endogamia o hibridación, o fitness. La inestabilidad del desarrollo es la cantidad de variación entre estructuras para las cuales se espera el mismo fenotipo objetivo: es el resultado de la imprecisión de los procesos de desarrollo y, por lo tanto, una medida de la regulación del desarrollo. Debido a que los lados derecho e izquierdo del mismo organismo comparten el mismo genoma y por lo general casi el mismo ambiente, se puede esperar que los órganos del lado izquierdo y del lado derecho compartan el mismo fenotipo objetivo (asumiendo que no hay asimetría direccional) y por lo tanto difieren sólo por la inestabilidad del desarrollo (Klingenberg, 2015). La mayoría de estos estudios evalúan a la FA con el uso de la MG. Esto debido a la

necesidad de contar con una herramienta específica, de gran poder, que sea capaz de detectar los mínimos cambios de la forma entre los lados derecho e izquierdo, y que ésta pueda detectar o determinar la varianza a nivel de la inestabilidad del desarrollo, ya que la FA es un parámetro que tiene un fuerte contexto de en la evolución del desarrollo. La estabilidad del desarrollo es la capacidad del sistema de desarrollo para lograr un fenotipo cercano al objetivo a pesar de las fluctuaciones en los procesos de desarrollo (Polak). Por ende, lo que se busca evaluar con el uso de la MG es el efecto del desarrollo sobre la forma (shape) del individuo, siendo las variaciones una respuesta del organismo a la inestabilidad del desarrollo. Otro tipo diferente de aplicación de la FA, también con el uso mayoritario de la MG, es la utilización de la FA para inferir el origen del desarrollo de la integración dentro y entre estructuras morfológicas (Debat *et al.*, 2009; Klingenberg, 2008; Klingenberg *et al.*, 2002; Lehoux & Cloutier; Maestri *et al.*).

En resumen, el uso de la morfometría geométrica en estudios de FA ha proporcionado nuevos métodos para el estudio de cuestiones que ya se habían abordado en estudios de asimetría fluctuante con morfometría tradicional, con el uso de mediciones lineales, como las mediciones de longitud, y ha abierto nuevas direcciones de investigación que abordan cuestiones relativas a temas como la integración morfológica.

Como ejemplo de trabajos con éstos enfoques, tenemos el realizado por Maestri *et al.*, en el cual los autores analizan la idoneidad de especies a determinados hábitats, para con fines de conservación, predecir la supervivencia de una especie a largo plazo. Para esto, los autores analizaron la FA como una medida de estrés del desarrollo, que a su vez la utilizan como indicador indirecto del desempeño de un individuo en diferentes regiones. Por lo cual, pusieron a prueba la congruencia de la idoneidad de distintas áreas geográficas (determinadas por modelos de nicho ecológico), con los marcadores morfológicos que reflejan estrés ambiental y varianza morfológica, en la especie de roedor endémico de Brasil *Akodon cursor*.

Las mediciones de FA fueron realizadas para cada individuo de forma particular. Para esto, 1° se hizo un reflejo de cada una de las configuraciones originales de los landmarks a su imagen espejo, generando una copia reflejada de cada configuración; 2° usando Procrustes fit, se generó un promedio de las configuraciones originales y reflejadas para cada espécimen, lo cual es una configuración perfectamente simétrica; y 3° la asimetría de la forma se calculó para cada individuo, como la desviación de la configuración original de los landmarks del consenso simétrico. Además, de cada individuo se obtuvo un valor, expresado en unidades de distancia de Procrustes, que refleja la cantidad de asimetría indivi-

dual. Y se utilizó este valor individual de los individuos de una misma población, para obtener un valor promedio de FA de todos los individuos dentro de una población. Y como medida de varianza morfológica, utilizaron la disparidad morfológica dentro de cada población.

Para medir la variabilidad en la idoneidad de hábitat, se correlacionaron los valores promedio de FA y varianza morfológica (dentro de una población), con los valores de idoneidad de hábitat generados a partir de modelamientos de nicho. Además, se realizaron pruebas de autocorrelación espacial para determinar si las variables de forma estaban correlacionadas en el espacio, lo podría haber generado sesgos en los análisis al violar los principios de independencia entre muestras.

Como resultado, los autores obtuvieron que existe una significativa relación entre los niveles de idoneidad y los niveles de FA, los que indica que en aquellas áreas menos adecuadas, los individuos experimentan numerosas perturbaciones durante el desarrollo ontogenético del cráneo. Así mismo, no encontraron asociación entre la varianza morfológica y la idoneidad del hábitat (Fig. 7). Estos resultados confirman las predicciones de que, en ambientes con menor idoneidad, el estrés en el desarrollo aumenta.

Otro ejemplo de trabajo que utiliza la FA, es el de Benítez *et al.* (2018), en el cual los autores utilizan a la FA como bio-indicador del desarrollo de la estabilidad en la forma de individuos de escarabajos carábidos de la especie *Pterostichus melas melas*, en múltiples poblaciones de dos producciones agrícolas diferentes: Perennes y anuales. Para obtener datos de forma, los investigadores utilizaron imágenes 2D de la zona ventral del cuerpo de los escarabajos. Se utilizaron 16 landmarks considerando los lados derecho e izquierdo, y se obtuvieron las coordenadas de forma mediante un completo ajuste de Procrustes. Con tal de medir la simetría, la reflexión fue eliminada mediante la inclusión de la imagen espejo y la imagen original, de todas las configuraciones analizadas y simultáneamente realizando la superposición de todas ellas. Se analizó el error de la FA digitalizando dos veces cada individuo, y analizando la varianza de los CS para detectar posibles diferencias, mientras que se realizó un análisis de Procrustes ANOVA para analizar las diferencias de la forma. Estos análisis fueron realizados entre sexos de forma separada, con tal de analizar la influencia del dimorfismo sexual sobre la asimetría de la forma. Los patrones principales de la variación de la forma fueron analizados mediante un análisis de PCA, calculado a partir de la matriz de covarianza del promedio poblacional del componente

simétrico de forma. Para analizar la relación entre la forma y los niveles de FA se realizó una regresión multivariante que incluyó sus respectivas elipses de confianza (90 %) por grupo, utilizando la forma y las puntuaciones de FA, y se realizó un análisis de permutación de 10.000 iteraciones. Para analizar la correlación entre los datos climáticos y la forma, se realizó un análisis de PLS utilizando la temperatura y las precipitaciones como covariables. Como resultado, los investigadores obtuvieron que las regresiones (valores de la FA VS Forma) y PLS, mostraron que los carábidos que habitaban el agroecosistema perenne parecen haberse adaptado a nivel fenotípico, a la fuerte influencia antropogénica (es decir, las prácticas de Plan de Manejo Integrado de Inocuidad de Sustancias Químicas), mientras que los carábidos que habitan los agroecosistemas anuales experimentan ambientes más inestables y sus fenotipos parecen haber sido cambiados en fechas más recientes (Figs. 8 y 9).

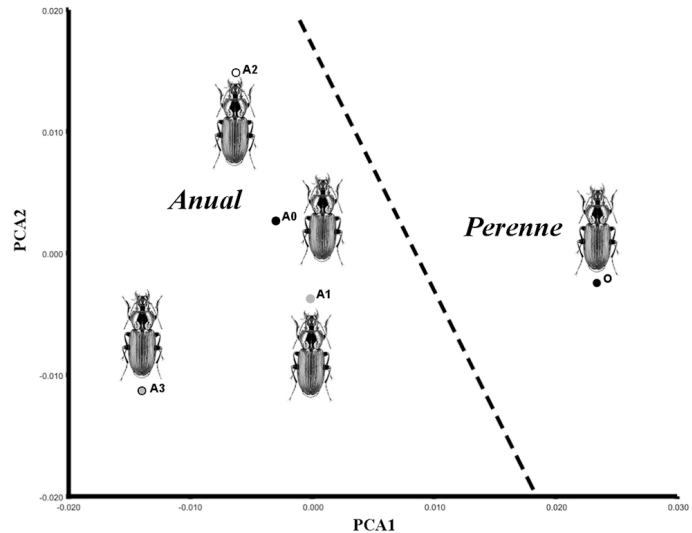


Fig. 8. Análisis de los componentes principales de la forma media del cuerpo en *Pterostichus melas melas*. Los dos primeros componentes principales (PCs) se utilizan para mostrar la mayor parte de la variación de forma. (Edit. Benítez *et al.* 2018).

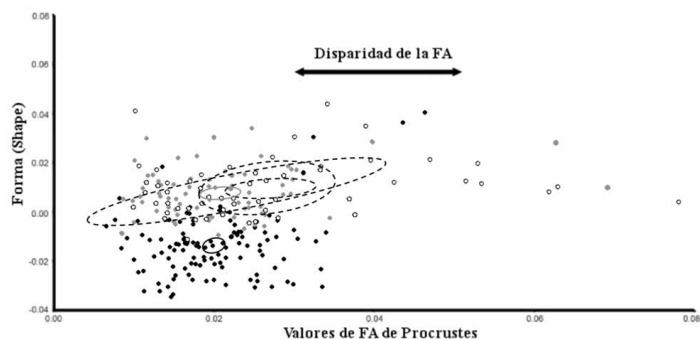


Fig. 9. Análisis de regresión multivariante de la forma en Procrustes FA. Los diferentes colores representan las diferentes poblaciones bajo estudio (Rojo= Perenne; Verde= Anual; Azul= Control; Negro= Control de Museo). Las elipses de confianza del 90 % se calcularon para la media de cada población. (Edit. Benítez *et al.* 2018).

Covariación de la forma con variables ecológicas: 2B-PLS. Mientras que los estudios de integración miden la covariación de la forma entre distintas partes o lados de una estructura, en los estudios que utilizan la metodología de Two-Block Partial Least Squares (Cuadrados Mínimos parciales de 2 Bloques – 2B-PLS) analizan la covariación entre dos sets de variables: morfológica y ecológica-ambientales. Este método difiere del análisis de regresión en que los dos conjuntos de variables se tratan simétricamente en lugar de utilizar un conjunto de variables (variables independientes) para predecir la variación en el otro conjunto de variables (variables dependientes). Aunque el método tiene similitudes con el conocido método de análisis de correlación canónica (CCA), es diferente y se utiliza para responder a una pregunta un tanto diferente (Rohlf & Corti, 2000). Una de las ventajas de los 2B-PLS sobre los CCA, es que pueden ser aplicados en morfometría, donde una de las variables puede ser variables de forma. La fuente más directa de las variables de forma es utilizar las coordenadas x, y (o x, y, z para los datos tridimensionales) de las coordenadas de las ubicaciones de los landmarks morfológicos después de que hayan sido alineados a su forma media, mediante el uso de un análisis de PGA. La ventaja de los datos obtenidos mediante PGA, de los datos obtenidos por morfometría tradicional, es que en éstos se elimina el efecto de la variación ajena a la forma (tamaño, rotación, traslación, etc).

El método 2B-PLS se utiliza para explorar el patrón de covariación entre dos conjuntos de variables. Si se divide una matriz Y de datos n X p, por columnas en Y1 y Y2 (con columnas p1 y p2, respectivamente), entonces 2B-PLS construye pares de variables que son combinaciones lineales de las variables dentro de cada uno de los dos conjuntos. Las combinaciones lineales se construyen de manera que las nuevas variables representen en la medida de lo posible la covariación entre los dos conjuntos de variables originales. Se espera que estas nuevas variables sean útiles para describir cualquier patrón de covariación que exista entre los dos conjuntos de variables originales (Rohlf & Corti). Éste tipo de método presta una herramienta precisa para evaluar, por ejemplo, el impacto de la geografía y el ambiente en la variabilidad fenotípica (Benítez *et al.*, 2014a; Cardini *et al.*, 2007; Ismail, 2018), o como la variabilidad morfológica se correlaciona se relaciona con la variabilidad en el comportamiento (Fabre *et al.*, 2018) o como se relaciona la forma con los aspectos funcionales (Polychronis & Halazonetis, 2014; Randau & Goswami, 2018).

Un ejemplo de un estudio que utiliza este enfoque, es el trabajo de Ismail, en el que analiza la forma del escudo del cangrejo ermitaño *Clibanarius signatus*, el cual habita varios hábitats intermareales del mar rojo, como costas rocas y manglares de marismas litorales, en este estudio el

autor analizó la variación de la forma del escudo entre tres poblaciones de *C. signatus*. Para medir el efecto de las variables ambientales sobre los cambios fenotípicos, utilizó un análisis de 2B-PLS para examinar la covariación entre dos conjuntos de variables (forma de escudo entre poblaciones usando las coordenadas de Procrustes) y variables ambientales. Las variables ambientales se resumieron en 6 variables que representan variaciones de la concha (en las que habita) y en las condiciones climáticas: (1) longitud de la concha; (2) peso de la concha; (3) longitud del opérculo de la concha; (4) grado de protección costera; (5) tipo de sustrato y (6) tipo de vegetación. El autor utilizó una prueba de Mantel (10.000 permutaciones aleatorias) para evaluar si la variación del escudo está relacionada con la distancia geográfica entre los sitios de estudio, utilizando distancias geográficas en línea recta entre los sitios de muestreo. Además, comparó la matriz de distancia de Procrustes entre todos los individuos en cada sitio, con la matriz de distancia geográfica entre los tres sitios de muestreo y calculó su correlación de momento de producto. La primera matriz consiste en la distancia de Procrustes, mientras que la segunda matriz representa la distancia geográfica (Km). Los resultados mostraron una fuerte asociación entre la variación de la forma del escudo y la longitud de la concha, la longitud del opérculo de la concha y el peso de la concha, así como baja a débil asociación con la protección de la costa, el tipo de sustrato y el tipo de vegetación. La relación entre la forma del escudo y la distancia geográfica fue insignificante (Fig. 10). Esto sugiere que la relación entre la forma del escudo y la concha podría ser resultado de la plasticidad fenotípica de la especie.

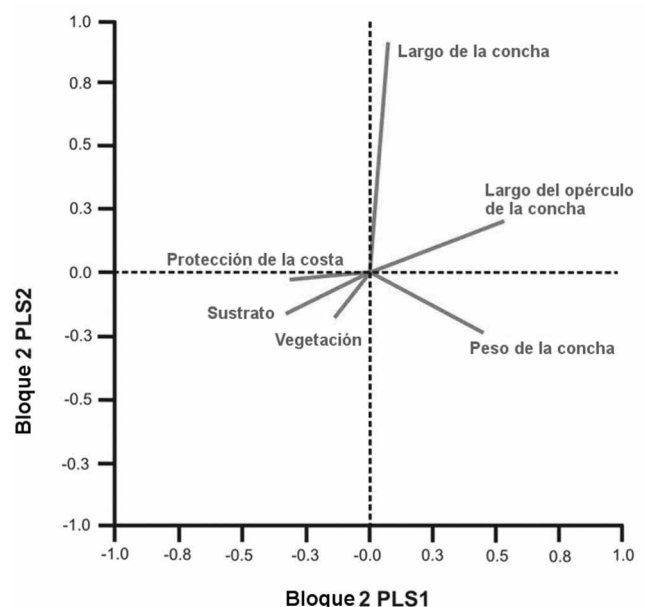


Fig. 10. Análisis de 2B-PLS para la forma del escudo de *C. signatus* y las condiciones ambientales (Ismail, 2018).

Otro trabajo de la misma línea, es el trabajo de Fabre *et al.*, pero en este caso los autores analizaron la covariación de la forma de los huesos largos de las extremidades anteriores con el comportamiento de agarre en los primates estrepsirrinos. Para esto los autores trabajaron con variables de forma obtenidas mediante el uso de semilandmarks 3D de desplazamiento, para cuantificar las formas y curvaturas de cada uno de los huesos largos de las extremidades anteriores en 22 especies de primates estrepsirrinos. Luego, mediante el uso de 2B-PLS analizaron la covariación entre la forma de los huesos largos y la conducta de agarre. Debido a que las especies comparten una historia evolutiva, no pueden ser tratadas como datos independientes. Para esto se corrigió el análisis cuantificando el grado de coevolución entre la forma media de cada especie para cada hueso largo

y el comportamiento de agarre, teniendo en cuenta la filogenia mediante un algoritmo de mínimos cuadrados parciales generalizados bajo un modelo de evolución de movimiento Browniano. Los valores de PLS evolutivos se calcularon a partir de los dos bloques de datos filogenéticamente corregidos, y se evaluó la correlación evolutiva entre los dos bloques de los valores de PLS (rPLS). Se evaluó la significancia de la correlación PLS utilizando permutaciones filogenéticas, donde la forma o los valores de comportamiento de agarre para todas las especies para un bloque se permutaban en los tips de la filogenia. Los valores de correlación así derivados, se obtuvieron a partir de los conjuntos de datos permutables y pueden compararse con el valor observado. Como resultado, los autores encontraron existe una señal filogenética débil, aunque significativa, en el compor-

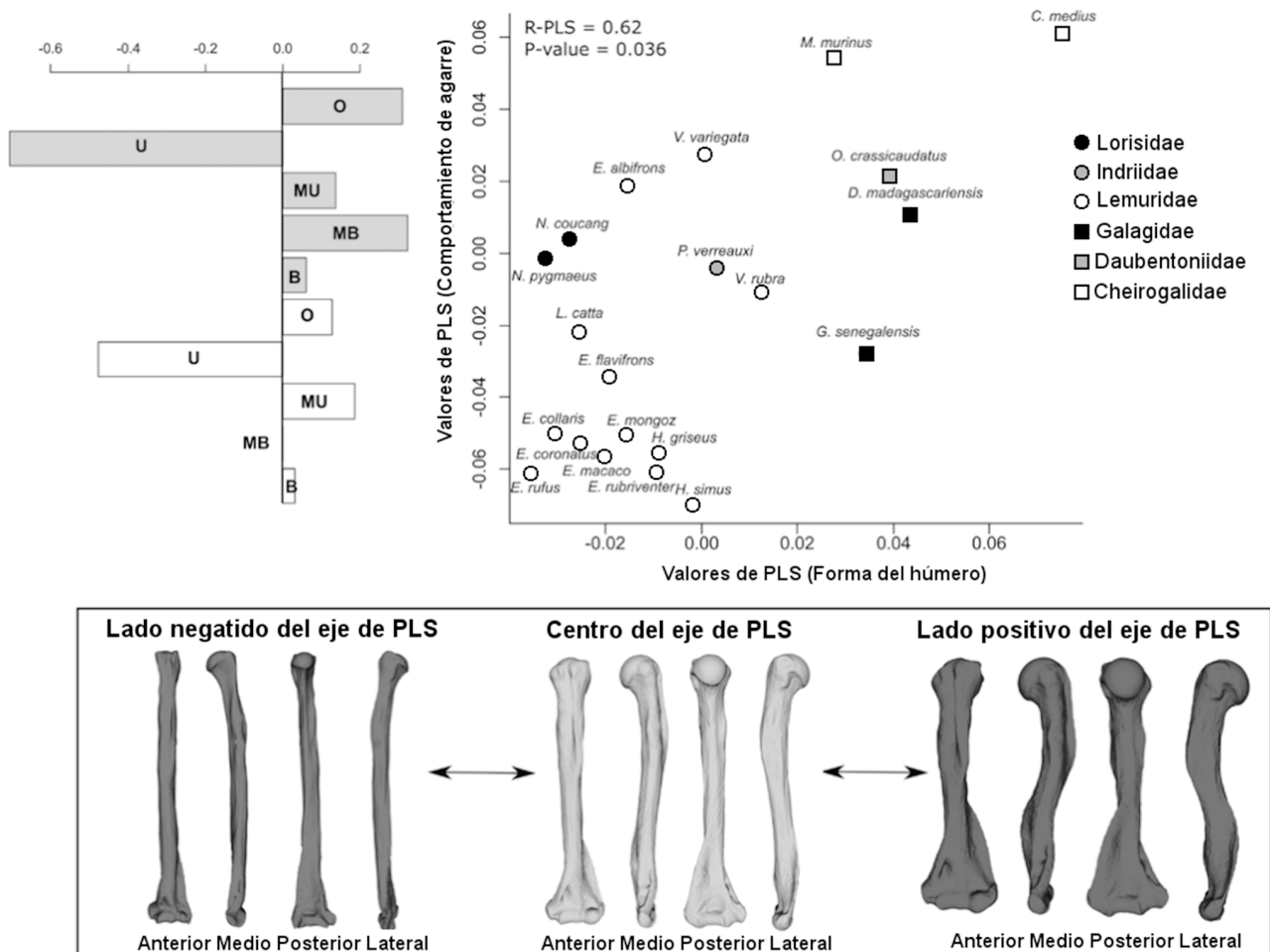


Fig. 11. Resultados del análisis de 2B-PLS entre la forma del húmero y el comportamiento de agarre para el análisis realizado en el conjunto de datos. Diagrama de dispersión de los primeros ejes PLS que describen la coevolución entre la forma del húmero y el comportamiento de agarre. Los círculos y cuadrados representan la familia a la que pertenece cada especie. Las formas humerales (lado izquierdo) asociadas a cada mínimo y máximo de coevolución se ilustran en los extremos derecho e izquierdo, respectivamente, mientras que al centro se representa la forma intermedia, en la parte inferior de la gráfica de dispersión. Las cargas de comportamiento de agarre asociadas con la covariación de la forma humeral están representadas por el diagrama de barras a la izquierda del diagrama de dispersión. Los comportamientos utilizados para agarrar objetos grandes se representan en gris y los utilizados para agarrar objetos pequeños en blanco. Abreviaturas: O, oral; U, unimanual; MU, bucal-unimanual; MB, bucal-bimanual; B, bimanual (Fabre *et al.*, 2018).

tamiento de agarre y la forma del cúbito y el radio, y una señal filogenética moderada y significativa en la forma del húmero. Además encontraron que existe una marcada coevolución entre el comportamiento de agarre y la forma

del húmero (Fig. 11) y el radio (Fig. 12). Este hallazgo sugiere una asociación funcional entre el agarre y la forma de la extremidad anterior, lo que a su vez sugiere que la forma ósea limita o facilita el comportamiento de agarre.

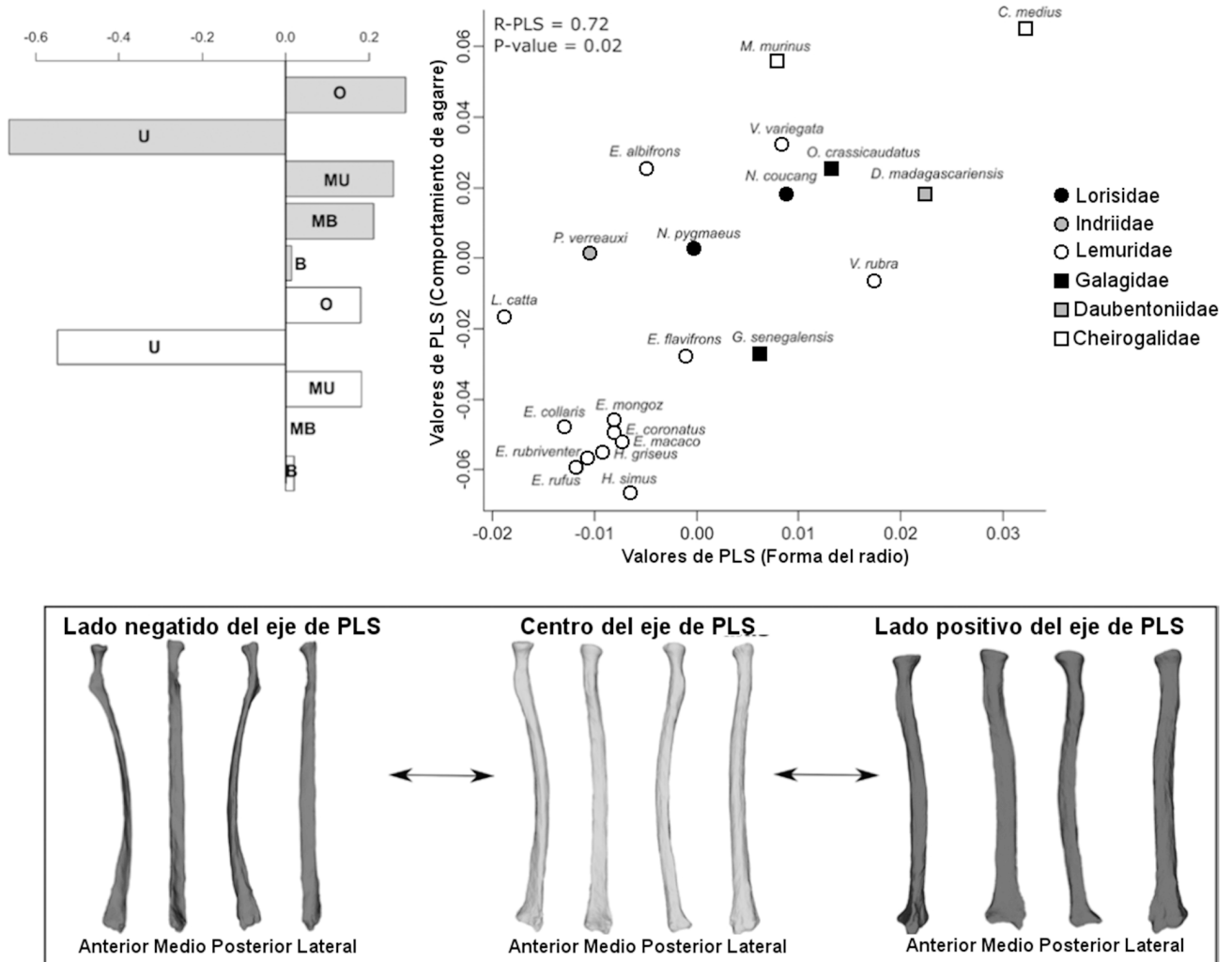


Fig. 12. Resultados del análisis de 2B-PLS entre la forma del radio y el comportamiento de agarre para el análisis realizado en el conjunto de datos. Diagrama de dispersión de los primeros ejes PLS que describen la coevolución entre la forma del radio y el comportamiento de agarre. Los círculos y cuadrados representan la familia a la que pertenece cada especie. Las formas humerales (lado izquierdo) asociadas a cada mínimo y máximo de coevolución se ilustran en los extremos derecho e izquierdo, respectivamente, mientras que al centro se representa la forma intermedia, en la parte inferior de la gráfica de dispersión. Las cargas de comportamiento de agarre asociadas con la covariación de la forma humeral están representadas por el diagrama de barras a la izquierda del diagrama de dispersión. Los comportamientos utilizados para agarrar objetos grandes se representan en gris y los utilizados para agarrar objetos pequeños en blanco. Abreviaturas: O, oral; U, unimanual; MU, bucal-unimanual; MB, bucal-bimanual; B, bimanual (Fabre *et al.*, 2018)

DISCUSIÓN

Ya desde sus inicios, a fines de la década de los 70's, la MG ha sido una valiosa herramienta que ha entregado información mucho más precisa que la MT, particularmente

por su base matemática más robusta, lo que ha permitido realizar estudios más complejos con preguntas más sofisticadas.

En las últimas décadas, el uso cada vez más masivo de MG ha propiciado que más investigadores realicen actualizaciones de los métodos usados, correcciones matemáticas de los índices, recomendaciones o nuevos enfoques metodológicos (Adams, 2016; Openshaw *et al.*, 2016; Maga *et al.*; Attard *et al.*, 2018; Felice *et al.*; Karakostis *et al.*, 2018; Palci & Lee, 2018; Simons *et al.*; Weaver & Gunz), lo que ha permitido un crecimiento exponencial de preguntas y problemáticas que se intentan resolver con MG, desde la variación del espacio morfológico en un contexto de biología del desarrollo (Maestri *et al.*; Fernandez Blanco *et al.*, 2018; Simons *et al.*), hasta la asociación de la variación en un contexto macroevolutivo (Adams & Collyer; Maiorino *et al.*; Randau & Goswami, 2018; Taverne *et al.*, 2018).

El objetivo de muchos estudios morfométricos es encontrar y explorar las relaciones entre diferentes conjuntos de variables. Por ejemplo, los estudios de alometría analizan la asociación entre el tamaño y la forma en una muestra de especímenes, los estudios ecomorfológicos caracterizan las relaciones entre datos ecológicos y morfológicos, y los análisis de la selección natural pueden investigar los efectos de la morfología en la adecuación biológica de los organismos (Klingenberg, 2010). El incremento de estudios metodológicos que han incorporado la morfometría geométrica, ha permitido utilizar varias estrategias para estudiar la covarianza entre conjuntos de variables dependiendo de la naturaleza específica de la relación entre ellas y de los objetivos del análisis. Dentro de este paradigma de comprender las relaciones entre covariables y la forma geométrica de los organismos es que estudios asociados a procesos del desarrollo morfológico adquirieron fuerza en los últimos años con metodologías directas como el estudio de la integración, modularidad y principalmente patrones de simetría llevando a la MG a estudiar la inferencia de la variación morfológica en sus procesos de desarrollo. Es importante destacar, que estos procesos generalmente se expresan en patrones de covarianza entre rasgos, por ejemplo, asociaciones de cambios adaptativos, que resultan de la variación en el proceso de desarrollo. Si el proceso no varía en absoluto, es decir, si se desarrolla exactamente de la misma manera en todos los individuos, entonces significa que no habrá ninguna información de variación en los rasgos morfológicos, por lo tanto enfoque por lo tanto fallaría (Klingenberg, 2010).

Es importante entender estos avances metodológicos como una forma de depuración y refinamiento de los resultados, eliminando efectos algorítmicos en éstos, para estar más relacionados a un trasfondo biológico (Adams, 2016; Klingenberg, 2013b). Así mismo, existe la necesidad de realizar estudios de forma en un contexto evolutivo, analizando las variaciones morfológicas en un contexto filogenético, para responder preguntas con componentes multidimensionales

(Cardini & Elton, 2008; Fernandez Blanco *et al.*; Maiorino *et al.*; Morningstar *et al.*, 2018; Simons *et al.*).

Los métodos morfométricos para visualizar tendencias macroevolutivas en datos multidimensionales, recientemente han comenzado a dar resultados, luego de años de controversia en su uso (Adams & Collyer). Uno de los patrones más importantes a calcular en evolución fenotípica, es el grado de señal filogenética el cual solo después de los últimos años de extensiva investigación se pueden cuantificar de manera confiable y además de caracterizar patrones de covariación, tanto dentro de fenotipos multivariados como entre fenotipos multivariados y otras variables (Adams & Collyer).

Finalmente, el objetivo del presente artículo fue realizar una revisión en las últimas actualizaciones en la MG, con tal de entregar una nueva perspectiva, ampliando el conocimiento en los usos metodológicos de esta herramienta para responder nuevas interrogantes cada vez más complejas, tanto en contextos ecomorfológico como morfoevolutivos. Sin duda, este campo está en un proceso de aumento metodológico exponencial lo que genera de forma imperativa la necesidad de comprender las nuevas metodologías. Por lo tanto, con este trabajo pretendemos ser un primer punto de partida para aquellos investigadores que se están iniciando en la MG, y que así, en un futuro, esta se pueda seguir expandiendo para facilitar las respuestas a preguntas cada vez más complejas y sofisticadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Proyecto Fondecyt de Iniciación N° 11180366 por el financiamiento del este manuscrito, además AVL agradece al programa CONICYTPCHA/ doctorado nacional 2018-21180921 por el apoyo y revisión de las versiones anteriores a esta última.

VILLALOBOS-LEIVA, A. & BENÍTEZ, H. A. Geometric morphometric and its new applications in ecology and evolutionary biology. Part 2. *Int. J. Morphol.*, 38(6):1818-1836, 2020.

SUMMARY: This study provides an updated vision of the study of Geometric Morphometrics and its most recent application in ecology and evolutionary biology, covering a wide variation in methodology occurring in the last 5 years since the first version published in the International Journal of Morphology. Geometric Morphometrics is a tool that allows evaluating morphological variations with underlying factors, with a higher sensitivity than traditional morphology, so that minimum changes of morphological variation can be detected. Therefore, it has turned into an outstanding tool to answer questions of comparative biology focused on anatomic characters. At the beginning, it was a tool mainly used to answer taxonomic questions and for differentiation at

individual, population or species level. However, in the last years, the number of questions and problematic on which it is applied, has diversified considerably, turning it into a very accurate tool to answer questions of morphological variation in ecologic and evolutionary contexts. Almost half a decade has elapsed since the last revision of the method, so this work is intended to analyze the methodological changes and the new approaches used in Geometric Morphometrics, including a brief introductory guideline to these new methods, their uses and applications.

KEY WORDS: Geometric morphometrics; Integration; Modularity; Fluctuating asymmetry; Shape covariation; 3D Geometric morphometrics.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. C. & Collyer, M. L. Comparing the strength of modular signal, and evaluating alternative modular hypotheses, using covariance ratio effect sizes with morphometric data. *Evolution*, 73(12):2352-67, 2019.
- Adams, D. C. & Otárola-Castillo, E. Geomorph: An R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods Ecol. Evol.*, 4(4):393-9, 2013.
- Adams, D. C. Evaluating modularity in morphometric data: challenges with the RV coefficient and a new test measure. *Methods Ecol. Evol.*, 7(5):565-72, 2016.
- Adams, D. C.; Rohlf, F. J. & Slice, D. Geometric morphometrics: ten years of progress following the «revolution». *Ital. J. Zool.*, 71(1):5-16, 2004.
- Andjelkovic, M.; Tomovic, L. & Ivanovic, A. Morphological integration of the kinetic skull in Natrix snakes. *J. Zool.*, 303(3):188-98, 2017.
- Asahara, M. Shape variation in the skull and lower carnassial in a wild population of raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Zool. Sci.*, 30(3):205-10, 2013.
- Attard, M. R. G.; Sherratt, E.; McDonald, P.; Young, I.; Vidal-García, M. & Wroe, S. A new, three-dimensional geometric morphometric approach to assess egg shape. *PeerJ*, 6:e5052, 2018.
- Bardua, C.; Wilkinson, M.; Gower, D. J.; Sherratt, E. & Goswami, A. Morphological evolution and modularity of the caecilian skull. *BMC Evol. Biol.*, 19(1):1-23, 2019.
- Benítez, H. A. & Parra, L. E. Fluctuating asymmetry: a morpho-functional tool to measure development stability. *Int. J. Morphol.*, 29(4):1459-69, 2011b.
- Benítez, H. A. & Püschel, T. A. Modelling shape variance: geometric morphometric applications in evolutionary biology. *Int. J. Morphol.*, 32(3):998-1008, 2014.
- Benítez, H. A.; Lemic, D.; Bazok, R.; Bravi, R.; Buketa, M. & Püschel, T. Morphological integration and modularity in *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) hind wings. *Zool. Anz.*, 253(6):461-8, 2014b.
- Benítez, H. A.; Lemic, D.; Bazok, R.; Gallardo-Araya, C. M. & Mikac, K. M. Evolutionary directional asymmetry and shape variation in *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae): an example using hind wings. *Biol. J. Linn. Soc.*, 111(1):110-8, 2013a.
- Benítez, H. A.; Lemic, D.; Püschel, T. A.; Viric Gasparic, H.; Kos, T.; Baric, B.; Bazok, R. & Pajac Zivkovic, I. Fluctuating asymmetry indicates levels of disturbance between agricultural productions: An example in Croatian population of *Pterostichus melas melas* (Coleoptera: Carabidae). *Zool. Anz.*, 276:42-9, 2018.
- Benítez, H. A.; Parra, L.; Sepúlveda, E. & Sanzana, M. Geometric Perspectives of Sexual Dimorphism in the Wing Shape of Lepidoptera?: the Case of *Synneuria* sp. (Lepidoptera: Geometridae). *J. Entomol. Res. Soc.*, 13(1):53-60, 2011a.
- Benítez, H. A.; Püschel, T.; Lemic, D.; Cacija, M.; Kozina, A. & Bazok, R. Ecomorphological variation of the wireworm cephalic capsule: studying the interaction of environment and geometric shape. *PLoS One*, 9(7):e102059, 2014a.
- Benítez, H. A.; Sanzana, M.; Jerez, V.; Parra, L. E.; Hernández, C. E. & Canales-Aguirre, C. B. Sexual shape and size dimorphism in carabid beetles of the genus *Ceroglossus*: is geometric body size similar between sexes due to sex ratio? *Zool. Sci.*, 30(4):289-95, 2013b.
- Bonneau, N.; Baylac, M.; Gagey, O. & Tardieu, C. Functional integrative analysis of the human hip joint: The three-dimensional orientation of the acetabulum and its relation with the orientation of the femoral neck. *J. Hum. Evol.*, 69:55-69, 2014.
- Bravi, R. & Benítez, H. A. Left e right asymmetries and shape analysis on *Ceroglossus chilensis* (Coleoptera: Carabidae). *Acta Oecol.*, 52:57-62, 2013.
- Cardini, A. & Elton, S. Does the skull carry a phylogenetic signal? Evolution and modularity in the guenons. *Biol. J. Linn. Soc.*, 93(4):813-34, 2008.
- Cardini, A.; Jansson, A. U. & Elton, S. A geometric morphometric approach to the study of ecogeographical and clinal variation in vervet monkeys. *J. Biogeogr.*, 34(10):1663-78, 2007.
- Coutelis, J. B.; González-Morales, N.; Géminard, C. & Noselli, S. Diversity and convergence in the mechanisms establishing L/R asymmetry in metazoa. *EMBO Rep.*, 15(9):926-37, 2014.
- Curth, S.; Fischer, M. S. & Kupczik, K. Patterns of integration in the canine skull: an inside view into the relationship of the skull modules of domestic dogs and wolves. *Zoology (Jena)*, 125:1-9, 2017.
- Debat, V.; Debelle, A. & Dworkin, I. Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: Joint effects of mutations and developmental temperature. *Evolution*, 63(11):2864-76, 2009.
- Fabre, A. C.; Peckre, L.; Pouydebat, E. & Wall, C. E. Does the shape of forelimb long bones co-vary with grasping behaviour in strepsirrhine primates? *Biol. J. Linn. Soc.*, 127(3):649-60, 2018.
- Felice, R. N.; Randau, M. & Goswami, A. A fly in a tube: Macroevolutionary expectations for integrated phenotypes. *Evolution*, 72(12):2580-94, 2018.
- Felsenstein, J. Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.*, 125(1):1-15, 1985.
- Fernandez Blanco, M. V.; Cassini, G.H. & Bona, P. Skull ontogeny of extant caimans: a three-dimensional geometric morphometric approach. *Zoology*, 129:69-81, 2018.
- Fernández-Mazuecos, M.; Blanco-Pastor, J. L.; Gómez, J. M. & Vargas, P. Corolla morphology influences diversification rates in bifid toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). *Ann. Bot.*, 112(9):1705-22, 2013.
- Futuyma, D. J. Evolutionary constraint and ecological consequences. *Evolution*, 64(7):1865-84, 2010.
- Gonzalez, P. N.; Hallgrímsson, B. & Oyhenart, E. E. Developmental plasticity in covariance structure of the skull: Effects of prenatal stress. *J. Anat.*, 218(2):243-57, 2011.
- Goswami, A. & Polly, P. D. The influence of modularity on cranial morphological disparity in carnivora and primates (Mammalia). *PLoS One*, 5(3):e9517, 2010.
- Ismail, T. G. E. Effect of geographic location and sexual dimorphism on shield shape of the Red Sea hermit crab *Clibanarius signatus* using geometric morphometric approach. *Can. J. Zool.*, 96(7):667-79, 2018.
- Kaliontzopoulou, A.; Carretero, M. A. & Llorente, G. A. Intraspecific ecomorphological variation: linear and geometric morphometrics reveal habitat-related patterns within *Podarcis bocagei* wall lizards. *J. Evol. Biol.*, 23(6):1234-44, 2010.
- Karakostis, F. A.; Hotz, G.; Scherf, H.; Wahl, J. & Harvati, K. A repeatable geometric morphometric approach to the analysis of hand theseal three-dimensional form. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 166(1):246-60, 2018.
- Kendall, D. G. The diffusion of shape. *Adv. Appl. Probab.*, 9(3):428-30, 1977.
- Klingenberg, C. P. *A Developmental Perspective on Developmental Instability: Theory, Models and Mechanisms*. En: Polak, M. (Ed.). *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York, Oxford University Press, 2003. pp.14-34.,
- Klingenberg, C. P. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: Concepts, methods, and applications. *Symmetry*, 7(2):843-934, 2015.
- Klingenberg, C. P. Cranial integration and modularity: insights into evolution and development from morphometric data. *Hystrix Ital. J. Mamm.*, 24(1):43-58, 2013a.
- Klingenberg, C. P. Evolution and development of shape: Integrating quantitative approaches. *Nat. Rev. Genet.*, 11(9):623-35, 2010.
- Klingenberg, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.*, 11(2):353-7, 2011.
- Klingenberg, C. P. Morphological integration and developmental modularity. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 39:115-32, 2008.
- Klingenberg, C. P. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol. Dev.*, 11(4):405-21, 2009.

- Klingenberg, C. P. Visualizations in geometric morphometrics: How to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix Ital. J. Mamm.*, 24(1):15-24, 2013b.
- Klingenberg, C. P.; Barluenga, M. & Meyer, A. Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56(10):1909-20, 2002.
- Labonne, G.; Navarro, N.; Laffont, R.; Chateau-Smith, C. & Montuire, S. Developmental integration in a functional unit: deciphering processes from adult dental morphology. *Evol. Dev.*, 16(4):224-32, 2014.
- Lehoux, C. & Cloutier, R. Building blocks of a fish head: Developmental and variational modularity in a complex system. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 324(7):614-28, 2015.
- Maestri, R.; Fornel, R.; Galiano, D. & de Freitas, T. R. O. Niche suitability affects development: skull asymmetry increases in less suitable areas. *PLoS One*, 10(4):e0122412, 2015.
- Maga, A. M.; Tustison, N. J. & Avants, B. B. A population level atlas of *Mus musculus* craniofacial skeleton and automated image-based shape analysis. *J. Anat.*, 231(3):433-43, 2017.
- Maiorino, L.; Farke, A. A.; Kotsakis, T. & Piras, P. Macroevolutionary patterns in cranial and lower jaw shape of *Ceratopsian dinosaurs* (Dinosauria, Ornithischia): phylogeny, morphological integration, and evolutionary rates. *Evol. Ecol. Res.*, 18:123-67, 2017.
- Marcus, L. F. *Traditional Morphometrics*. En: Rohlf, F. J. & Bookstein, F. L. (Eds.). *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Michigan, The University of Michigan Museum of Zoology, 1990. pp.77-122.
- Morningstar, C. R.; Inoue, K.; Lang, B. K. & Berg, D. J. A comprehensive status, phylogenetic, and anatomical review of *Stagnicola caperata* (Say, 1829) in the south-west United States. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.*, 28(3):527-34, 2018.
- Namigai, E. K. O.; Kenny, N. J. & Shimeld, S. M. Right across the tree of life: The evolution of left-right asymmetry in the Bilateria. *Genesis*, 52(6):458-70, 2014.
- Neustupa, J. Asymmetry and integration of cellular morphology in *Micrasterias compereana*. *BMC Biol.*, 17(1):1, 2017.
- Nijhout, H. F. & Davidowitz, G. *Developmental Perspectives on Phenotypic Variation, Canalization, and Fluctuating Asymmetry*. En: Polak, M. (Ed.). *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York, Oxford University Press, 2003. pp.3-13.
- Openshaw, G. H.; D'Amore, D. C.; Vidal-García, M. & Keogh, J. S. Combining geometric morphometric analyses of multiple 2D observation views improves interpretation of evolutionary allometry and shape diversification in monitor lizard (*Varanus*) crania. *Biol. J. Linn. Soc.*, 2016. DOI: <https://www.doi.org/10.1111/bj.12899>
- Palci, A. & Lee, M.S.Y. Geometric morphometrics, homology and cladistics: review and recommendations. *Cladistics*, 35(2):230-42, 2019.
- Palmer, A. & Strobeck, C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 17:391-421, 1986.
- Palmer, A. R. & Strobeck, C. *Fluctuating Asymmetry Analyses Revisited*. En: Polak, M. (Ed.). *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York, Oxford University Press, 2003. pp.279-319.
- Pélabon, C.; Hansen, T. F.; Carter, A. J. R. & Houle, D. Response of fluctuating and directional asymmetry to selection on wing shape in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.*, 19(3):764-76, 2006.
- Polak, M. *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York, Oxford University Press, 2003.
- Polychronis, G. & Halazonetis, D. J. Shape covariation between the craniofacial complex and first molars in humans. *J. Anat.*, 225(2):220-31, 2014.
- Randau, M. & Goswami, A. Shape covariation (or the lack thereof) between vertebrae and other skeletal traits in felids: the whole is not always greater than the sum of parts. *Evol. Biol.*, 45(2):196-210, 2018.
- Randau, M. & Goswami, A. Unravelling intravertebral integration, modularity and disparity in Felidae (Mammalia). *Evol. Dev.*, 19(2):85-95, 2017.
- Ren, J.; Bai, M.; Yang, X. K.; Zhang, R. Z. & Ge, S. Q. Geometric morphometrics analysis of the hind wing of leaf beetles: proximal and distal parts are separate modules. *Zookeys*, (685):131-49, 2017.
- Rohlf, F. J. & Corti, M. Use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Syst. Biol.*, 49(4):740-53, 2000.
- Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. A revolution morphometrics. *Trends Ecol. Evol.*, 8(4):129-32, 1993.
- Simons, E. A.; Frost, S. R. & Singleton, M. Ontogeny and phylogeny of the cercopithecine cranium: A geometric morphometric approach to comparing shape change trajectories. *J. Hum. Evol.*, 124:40-51, 2018.
- Stefanello, F.; Bugs, C.; Stenert, C.; Maltchik, L.; Guilbert, E.; Ricardo, J. & Ribeiro, J. R. I. Integration and modularity in the male genitalia and parameres of *Belostoma* species of bifoveolatum group sensu Lauck, 1962 (Insecta, Heteroptera, Belostomatidae). *Zool. Anz.*, 272:45-64, 2018.
- Sutherland, M. J. & Ware, S. M. Disorders of left-right asymmetry: Heterotaxy and situs inversus. *Am. J. Med. Genet. Part C Sem. Med. Genet.*, 151(4):307-17, 2009.
- Tamagnini, D.; Stephenson, J.; Brown, R. P. & Meloro, C. Geometric morphometric analyses of sexual dimorphism and allometry in two sympatric snakes: *Natrix helvetica* (Natricidae) and *Vipera berus* (Viperidae). *Zoology*, 129:25-34, 2018.
- Taverne, M.; Herbin, A. F. M.; Herrel, A.; Peigné, S.; Lacroux, C.; Lowie, A.; Pagès, F.; Theil, J. C. & Böhmer, C. Convergence in the functional properties of forelimb muscles in carnivores?: adaptations to an arboreal lifestyle? *Biol. J. Linn. Soc.*, 125:1-14, 2018.
- Toro-Ibache, M. V.; Manriquez-Soto, G. & Suazo-Galdames, I. Geometric morphometry and the biologic shapes study: from the descriptive morphology to the quantitative morphology. *Int. J. Morphol.*, 28(4):977-90, 2010.
- Van Dongen, S.; Lens, L. & Molenberghs, G. *Recent Developments and Shortcomings in the Analysis of Individual Asymmetry: A Review and Introduction of a Bayesian Statistical Approach*. En: Polak, M. (Ed.). *Developmental Instability: Causes and Consequences*. New York, Oxford University Press, 2003. pp.320-42.
- Van Valen, L. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*, 16(2):125-42, 1962.
- Vandenberg, L. N. & Levin, M. A unified model for left-right asymmetry? Comparison and synthesis of molecular models of embryonic laterality. *Dev. Biol.*, 379(1):1-15, 2013.
- Wärmländer, S. K. T. S.; Garvin, H.; Guyomarc'h, P.; Petaros, A. & Sholts, S. B. Landmark Typology in Applied Morphometrics Studies: What's the Point? *Anat. Rec.*, 302(7):1144-53, 2019.
- Watanabe, A.; Fabre, A. C.; Felice, R. N.; Maisano, J. A.; Müller, J.; Herrel, A. & Goswami, A. Ecomorphological diversification in squamates from conserved pattern of cranial integration. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 116(29):14688-97, 2019.
- Weaver, T. D. & Gunz, P. Using geometric morphometric visualizations of directional selection gradients to investigate morphological differentiation. *Evolution*, 72(4):838-50, 2018.
- Zelditch, M. L. & Swiderski, D. L. *A Practical Companion to Geometric Morphometrics for Biologists: Running analyses in freely-available software*. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier, 2012.
- Zelditch, M.; Swiderski, D. L.; Sheets, H. D. & Fink, W. L. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. New York, Elsevier Academic Press, 2004.
- Zollikofer, C. P. E.; Biévenu, T. & Ponce de León, M. S. Effects of cranial integration on hominid endocranial shape. *J. Anat.*, 230:85-105, 2017.
- Zúñiga-Reinoso, Á. & Benítez, H. A. The overrated use of the morphological cryptic species concept: An example with *Nyctelia darkbeetles* (Coleoptera: Tenebrionidae) using geometric morphometrics. *Zool. Anz.*, 255:47-53, 2015.

Dirección para correspondencia:

Hugo A. Benítez

Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule

Universidad Católica del Maule

Parque Científico Tecnológico

Avenida San Miguel 3605

Talca - CHILE

Email: hbenitez@ucm.cl

Recibido : 09-04-2020

Aceptado: 07-06-2020