



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FES IZTACALA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Determinación del sexo en la lagartija vivípara, *Barisia imbricata*.

(REPTILIA: ANGUIDAE).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Cadena Velázquez Alejandro

TUTOR PRINCIPAL: DR. MARTIN MARTÍNEZ TORRES. Fes, Iztacala

COMITÉ TUTOR:

Dra. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA. Ciencias Atmosféricas, CU

Dr. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS. Fes, Iztacala

Cd. Mx. A SEPTIEMBRE DEL 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FES IZTACALA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Determinación del sexo en la lagartija vivípara, *Barisia imbricata*.

(REPTILIA: ANGUIDAE).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Cadena Velázquez Alejandro

TUTOR PRINCIPAL: DR. MARTIN MARTÍNEZ TORRES. Fes, Iztacala

COMITÉ TUTOR:

Dra. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA. Ciencias Atmosféricas, CU

Dr. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS. Fes, Iztacala

MÉXICO, Cd. Mx. A SEPTIEMBRE DEL 2017



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de marzo de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CADENA VELAZQUEZ ALEJANDRO**, con número de cuenta 3404060837, con la tesis titulada "**Determinación del sexo en la lagartija vivípara *Barisia imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE)**", realizada bajo la dirección del **DR. MARTIN MARTINEZ TORRES**:

Presidente: DR. ANDRÉS GARCÍA AGUAYO
Vocal: DRA. MARIA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN
Secretario: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS
Suplente: DR. ALEXANDRE REMY ROBERT HENRI CHARRUAU PIERRE
Suplente: DR. MANUEL FERIA ORTÍZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de agosto de 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primera instancia quiero agradecer **al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por su apoyo, por desarrollarme tanto académica como culturalmente y sobre todo por ser la mayor casa de estudios la cual me acogió tanto en mis estudios de licenciatura como Maestría.

Al apoyo recibido de la beca **CONACYT** con numero 623109 ya que sin ella no habría podido seguir adelante para solventar mis gastos y permitirme así terminar mi posgrado.

A mi tutor principal el **DR. MARTIN MARTÍNEZ TORRES** por sus múltiples enseñanzas, apoyo, el compartir su tiempo, paciencia, sabiduría y experiencia. Es un profesor al cual admiro por ser tan entregado a su profesión pero sobre todo le quiero agradecer por que sin él esta tesis no se habría podido llevar acabo.

A mi comité tutor la **Dra. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA** y el **Dr. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS** por su apoyo en cuanto sus observaciones y mejoras al proyecto y escrito de la tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis compañeros de laboratorio Norma Berenice Cruz Cano, Yabin Castro Camacho, Uriel Sánchez Rivera, Eduardo Loya Zurita y José Ariel Olvera Ramos, con los cuales compartí muchos momentos divertidos, experiencias y enseñanzas tanto dentro del laboratorio como fuera, les agradezco su amistad y solidaridad la cual se brinda dentro del laboratorio de Biología del Desarrollo y la Reproducción de Fes-Iztacala, UNAM.

A la Maestra **Carmen Álvarez Rodríguez** por ser tan buena profesora, por apoyarme con los experimentos de cultivo de linfocitos de la tesis, por sus enseñanzas y por brindarme su amistad.

A la profesora **Juanita Alba Luis Díaz** por ser tan linda conmigo a pesar de no ser su alumno, por facilitarme material, su computadora e impresora cuando las necesite y poder así cumplir con la finalización de este posgrado.

Al laboratorio de microscopia de la FESI por prestarme sus microscopios y cámara para obtener los resultados cromosómicos de la tesis.

DEDICATORIA

Quiero dedicarle esta tesis a mi hija **Janine Danae Cadena Espinosa** por ser mi motor para seguir adelante en todos mis proyectos y metas que me he planteado, hacerme tan feliz con su presencia y alegría quiero decirle que gracias a ella he logrado conseguir todos mis objetivos.

A mis padres **Norma Velázquez Santillán y Carlos Octavio Cadena Montero** por su incondicional apoyo y amor que me brindan siempre, por la guía y ayuda constante que me han dado durante toda mi vida. Gracias por inculcarme los valores en sus diferentes formas.

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN

1. Diferenciación Sexual en Reptiles

1.1 Determinación del sexo

1.1.2 Determinación del sexo cromosómico

1.1.2. 1 Testudinos

1.1.2.2 Archosaurios

1.1.2.3 Ofidios

1.1.2.4 Saurios

1.1.3 Determinación del sexo ambiental

1.1.3.1 Testudinos y Archosaurios

1.1.3.2 Saurios

2. Mecanismos que controlan la Diferenciación Sexual

2.1 Mecanismos que controlan la diferenciación de la gónada

2.2 Mecanismos que controlan la diferenciación de los conductos

2.3 Mecanismos que controlan la diferenciación de los genitales externos

2.4 Diferenciación fenotípica y de comportamiento

3. Efecto del calentamiento global sobre el ratio sexual en reptiles

4. OBJETO DE ESTUDIO

5. JUSTIFICACIÓN

6. OBJETIVOS

6.1 General

6.2 Particular

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. Cromosómico

7.1.1 Cultivo de linfocitos

7.1.2 Preparación de los frotis

7.2 Ambiental

7.2.1. Establecimiento de la etapa de desarrollo embrionario y sexado de los críos

7.3. Estadísticos

8. RESULTADOS

8.1. Cromosómico

8.2. Ambiental

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

9.1 Cromosómico

9.2 Ambiental

10. CONCLUSIONES

11. PERSPECTIVAS

12. LITERATURA CITADA

RESUMEN

Los reptiles presentan dos estrategias fundamentales para la determinación del sexo, la primera es por medio de cromosomas sexuales (DSC) donde la designación del sexo es por uno de los parentales al aportar genes que determinan el sexo en el momento de la fecundación. La segunda estrategia es la determinación del sexo por las condiciones del ambiente donde la temperatura (DST) es el principal factor y a diferencia de la estrategia anterior, el sexo es determinado durante el desarrollo embrionario durante el periodo sensible a la temperatura (PST). La DST se presenta en todos los cocodrilianos, en algunas tortugas y saurios. Diversos estudios en saurios sometidos o restricción de la termorregulación mostraron que temperaturas por arriba de las operativas causan un sesgo en la proporción sexual. Por ejemplo Robert y Thomson (2001) y Wapstra (2004) determinaron que en dos especies de saurios vivíparos con oportunidad limitada de termorregulación producen predominantemente machos y que este sesgo podría llevarlos a su extinción. Estas investigaciones muestran que el calentamiento global puede modificar la proporción sexual de la camada. *Barisia imbricata* es una lagartija vivípara, habita en climas templados de elevadas altitudes del eje neovolcánico transversal. El desarrollo gonadal inicia en el estadio 33 del desarrollo embrionario y la diferenciación histológica testicular y ovárica es evidente en el estadio 38. El objetivo del presente trabajo fue establecer cuál es el mecanismo de determinación del sexo en *Barisia imbricata* y determinar si la restricción de la termorregulación a una temperatura operativa elevada sesga el sexo de la camada. Se realizaron cultivos de linfocitos a partir de muestras de sangre de hembras y machos, se capturaron imágenes de las metafases y se realizó el cariotipo de ambos sexos. Por otro lado, a un grupo de hembras gestantes se les restringió la termorregulación durante el periodo crítico de diferenciación sexual a una temperatura de 32°C. Además, se determinó el radio sexual de hembras de una población natural capturadas después del estadio 38 y de hembras que se les permitió termoregular libremente en semicautiverio durante el periodo crítico. Una vez superado la etapa 38 todas las hembras se mantuvieron en terrarios individuales y se determinó el radio sexual de cada camada mediante la observación de los conductos reproductores. Hembras y machos de *Barisia imbricata* poseen cromosomas $2n=48$ y carecen de cromosomas sexuales heteromórficos. Una situación similar se observa en dos especies de la misma familia Anguillidae (*Ophiodes intermedius* y *O. striatus*). La restricción de la termorregulación no causó ningún sesgo en la proporción sexual de la camada (171 hembras vs 167 machos) de la misma manera que en la población silvestre y las mantenidas en semicautiverio. Estas observaciones en primera instancia no nos permiten concluir que la determinación del sexo no es por medio de la temperatura, ya que se necesita trabajar con rangos más amplios de temperatura para concluir que utilizan o no este mecanismo, como se ha observado en otras especies de saurios vivíparos. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de que *Barisia imbricata* posea genes en ciertos cromosomas que determinen al momento de la fecundación la diferenciación ovárica o testicular. Sin embargo, que debido al tamaño de las secuencias estos no sean distinguibles por diferencia de tamaño y/o posición del centrómero. Finalmente, también es posible que esta especie se encuentre aclimatada a esta temperatura extrema o haya evolucionado conforme al calentamiento global.

ABSTRACT

The reptiles have two fundamental mechanisms for sex determination: the first is through sexual chromosomes (DSC), so that one of the parental assigns genes that determine the sex at time of the fecundation. The second strategy is the determination of sex by environmental conditions (DST), so the temperature is the main factor in this mechanism sex is determined during the embryonic development in the sensitive period of temperature (PST). DST is present in all crocodylians, some turtles and lizards. Several researches in saurios with restriction of thermoregulation say that temperature more high to operative generate a slant in the sexual ratio. For example, Robert and Thomson (2001) determined in two species to vivipara lizards produced predominantly males at limited thermoregulation and this slant to sex ratio can bring them to extinction. These researches say that global warming can to sexual ratio to offspring. *Barisia imbricata* is a vivipara lizard, originary from the neovolcanic transversal axis, which inhabits in low temperature weathers with high altitude. The gonadal development starts in the stage 33 of the embryonic development and testicular and ovary histological differentiation happens in the stage 38. The main objective of this project is to establish the mechanism for sex determination in *Barisia imbricata* and determine if the restriction on the thermoregulation to high temperature operative slants sex ratio to the offspring. For that, lymphocytes were cultivars with blood of female and male. Some photos were taken of the metaphases and a karyotype on both sex took place. On the other hand, one group of pregnant females was submitted to restricted temperature in the critic phase for sex differentiation to a temperature of 32 °C. Beside of that, sex ratio for female in a nature population was determined before stage 38 and also observed females at a free thermoregulation in semi captivity during critical phases. Before stage 38 all females state in individual terrarium and determined to ratio sexual to spring for look reproduction conductors. The karyotype of both females and males is a diploid number of $2n=48$ and don't have sex chromosomes heteromorphics; which matches with two saurios on the same Anguidae's family (*Ophiodes intermedius* y *O. striatus*). The thermoregulation restriction doesn't slant sex ratio (171 female vs 167 males) this situation is same in feel population and semi captivity. This observation not concludes that sex determination isn't for temperature, is necessary more studies with different temperatures for knew if use this mechanism or not. But, do not discard the possibility that *Barisia imbricata* possess genes in particular chromosomes relationship whit ovarian and testicular differential in the moment to fecundation, even it is not distinguishable for differences of size or position to centromere. Finally, it is possible that this specie is acclimatized to this extreme temperature or it was evolved according to global warming.

1. INTRODUCCIÓN

Los reptiles son el grupo de vertebrados que llevó a cabo la innovación del huevo cleidóico la cual, les permitió su radiación y amplia evolución en el medio terrestre (Martínez-Torres, 2003).

Con el surgimiento de la membrana amniótica podemos dividir a los vertebrados en amniotas y anamniotas (Luckett, 1977). Además este clado, ha desarrollado a lo largo de la evolución diversas estrategias reproductoras, de tal manera que actualmente hay especies ovíparas, vivíparas y partenogenéticas (Lance y col., 2003).

Otra característica distintiva de los reptiles que influye de manera determinante en diferentes aspectos de su historia de vida es que son los únicos amniotas ectotérmicos, motivo por lo cual necesitan de fuentes externas de calor para elevar la temperatura de sus cuerpos, como los rayos del sol o la temperatura del ambiente y/o del sustrato (Huey y Slatkin, 1976; Zug y col., 2001).

Así, la temperatura ambiental es de suma importancia, debido a que ésta es determinante en muchos de sus procesos de historia de vida: como determinante de la tasa de crecimiento, edad a la que se alcanza el tamaño corporal para la madurez sexual, tasa de supervivencia, éxito reproductivo (Woolrich y col, 2006), cópula, duración de la gestación en especies vivíparas, determinación del sexo de la descendencia (Pieau, 1999) y la expresión de genes que participan en la diferenciación embrionaria de estructuras típicas del fenotipo sexual (gónadas, conductos y genitales externos) (Shoemaker y Crews, 2009).

1. Diferenciación Sexual en Reptiles

La diferenciación sexual es el proceso que ocurre durante el desarrollo embrionario y la vida posnatal que permite distinguir fenotípicamente a los dos sexos. Es uno de los fenómenos biológicos de mayor

trascendencia, ya que su principal propósito es el desarrollo de características anatómicas, fisiológicas y de comportamiento específicas de cada sexo, necesarias para la reproducción (Shine, 1989).

La cantidad de crías y el sexo de la camada son estrategias trascendentes para la permanencia de la especie. La proporción de hembras y machos que nacen en una camada permite el balance adecuado para mantener a las poblaciones. Sí es perturbado pondría en riesgo a la población e incluso llevarlos a su extinción (Miller y col., 2004).

El proceso de diferenciación sexual se puede resumir en cinco etapas, las cuales se dan en tiempo y espacios específicos a lo largo del desarrollo:

- I) Determinación del sexo.
 - II) Diferenciación gonadal.
 - III) Diferenciación de conductos.
 - IV) Diferenciación de genitales externos.
 - V) Dimorfismo sexual (diferenciación fenotípica, cuando se presenta en la especie) y de comportamiento.
-
- } Durante el desarrollo embrionario
- ← Durante el desarrollo embrionario y vida posnatal.

1.1 Determinación del sexo

La determinación del sexo es el mecanismo mediante el cual se desencadena la cascada de eventos para que un organismo sea hembra o macho (Ferguson-Smith, 2007), ya sea en el momento de la fecundación para las especies con determinación del sexo cromosómico (DSC) o durante el desarrollo embrionario para las

especies con determinación del sexo ambiental (DSA, muy frecuentemente la temperatura es la que determina el sexo -DST-) (Ezaz y col., 2009).

Estos dos mecanismos los podemos observar en diversas especies de tortugas y saurios; en cambio en todos los ofidios hasta ahora estudiados el sexo es establecido cromosómicamente y en todos los crocodylianos por la temperatura.

1.1.2 Determinación del sexo cromosómico

Cuando la determinación del sexo es cromosómica, uno de los parentales es el responsable de asignar el sexo a su prole al aportar, al momento de la fecundación genes que regulan la diferenciación ovárica o testicular.

En los saurios existen dos sistemas de cromosomas sexuales, el primero es el sistema XX/XY en donde los machos son el sexo heterogamético, mientras que el sexo homogamético corresponde a las hembras (Ezaz, y col., 2006). El segundo es el sistema ZZ/ZW donde las hembras son las heterogaméticas, y los machos los homogaméticos (Ferguson-Smith, 2007).

1.1.2.1 Testudinos

En tortugas se ha realizado el cariotipo de 155 especies de las 254 existentes y en ellas se ha observado que los cromosomas sexuales son del tipo macrocromosomas (Ferguson-Smith, 2007).

Algunas especies de este clado presentan la modalidad XX/XY por ejemplo en Chelidae: *Chelodina longicollis* y Geoemididae: *Siebenrockiella crassicollis*, mientras que otras tienen el sistema ZZ/ZW, observándose el cromosoma Z generalmente en la posición número 5 (*Pangshura smithii*, *Apalone spinifera*, *Peludiscus sinensis* y *Emydura macquarii*) y en *Trachemys scripta* en el cromosoma 6 (Ferguson-Smith, 2007).

1.1.2.3 Ofidios

En todas las serpientes estudiadas, hasta el momento, la determinación del sexo es cromosómica (Matsuda y col., 2005). Se ha observado en diversas especies de colúbridos, viperidos y elapidos que su sistema es del tipo heterogamético y que el cromosoma Z se encuentra, generalmente, en posición 5 como en las tortugas (Ohno, 1967; Graves y Shetty, 2000). En la familia Colubridae los cromosomas son distinguibles por la posición del centrómero y en Viperidae y Elapidae el cromosoma W es más pequeño que el Z sin embargo, en los Boidos los cromosomas Z y W son morfológicamente indistinguibles (Ferguson-Smith, 2007).

1.1.2.4 Saurios.

Se ha obtenido el cariotipo de aproximadamente 913 especies de saurios de las cuales 181 tienen cromosomas sexuales. En el 64 % de las especies que se les ha realizado su cariotipo, los machos son los heterogaméticos, (por ejemplo en las familias Iguanidae, Scincidae, Pigopodidae) y en el 36 % restante las hembras son las heterogaméticas, (como en las familias Varanidae, Agamidae y Lacertidae) (Ferguson-Smith, 2007) (Figura, 1). Además, se ha observado que el 23% de las especies presentan subtipos de cromosomas sexuales ($X_1X_2...Y_1Y_2...$, $Z_1Z_2...W_1W_2...$), como en las familias Iguanidae y lacertidae (Ezaz y col., 2009). La familia Anguidae (grupo al que pertenece nuestra especie de estudio) sólo se han realizado el cariotipo a dos especies (*Ophiodes intermedius* y *Ophiodes striatus*) (Becak y col., 1972; Hernando, 2002).

Un caso muy peculiar es el que se observa en el scincido *Bassiana duperreyi*. Este saurio presenta cromosomas sexuales, sin embargo, la temperatura puede sobreponerse al cariotipo sexual. Además, en esta lagartija se ha encontrado que también el tamaño del huevo participa en la determinación del sexo, huevos grandes producen hembras, mientras que huevos pequeños machos, pero solo si la temperatura de incubación es baja. También se ha observado que los huevos más

pequeños presentan mayor concentración de dehidrotestosterona y por ello son más propensos a producir machos (Radder y col., 2009).

1.1.3 Determinación del sexo ambiental (DST)

6

Hace más de cincuenta años se creía que todos los vertebrados amniotas presentaban determinación de sexo cromosómico (Bull, 1980; Ewert y Nelson, 1991; Janzen y Paukstis, 1991 y Crews, 1994). Sin embargo, en 1966 Madeleine-Charnier, descubrió por primera vez en el saurio ovíparo *Agama agama* que la temperatura de incubación de los huevos determinaba el sexo. De igual manera en un principio se pensó que la DST era exclusiva de especies ovíparas, pero (Robert y Thompson, 2001) descubrieron en *Eulamprus tympanum* que esta estrategia también se presenta en especies vivíparas.

En todos los reptiles tanto ovíparos y vivíparos con DST la determinación del sexo ocurre durante el periodo sensible a la temperatura (PST). El PST es el lapso de tiempo en el cual la temperatura establece el sexo de la gónada de los embriones al desencadenar la transcripción de los genes que participan en la diferenciación gonadal (Shoemaker y Crews, 2009). Esta etapa se ha documentado en muchas especies de reptiles con DST y diferentes autores están de acuerdo que en los testudinos ocurre en el tercio medio de la gestación (*Chelydra serpentina*: Yntema, 1979; *Caretta caretta*: Yntema y Mrosovsky, 1982; *Trachemys scripta*: Wibbels y col., 1991).

En las especies ovíparas con DST, el sexo se establece por la temperatura a la cual se encuentren incubando los huevos, y en las especies vivíparas depende de la temperatura en la que se encuentren las crías en el útero. En este último la temperatura de las crías va a depender de las posibilidades de termorregulación de la hembra durante el periodo crítico o sensible.

1.1.3.1 Testudinos y Archosaurios

Se ha observado que en algunas especies de tortugas las temperaturas altas (30°C o más) producen hembras como en *Lepidochelys olivácea*, *Trachemys scripta* y *Chrysemys picta* (Pieau, 1978; Wibbels, 1998). (Ver cuadro 2). En cambio en la mayoría de los crocodylianos las temperaturas altas (mayores a 30 °C), determinan a machos y las bajas (30 °C o menores), dan hembras (como en el cocodrilo de las marismas *Crocodylus palustris*: Lang y col., 1989) y el aligador americano *Alligator mississippiensis* (Western y Sinclair, 2001) (ver cuadro 2). Sin embargo, esto no parece ser una regla para todos los cocodrilos y tortugas, si no que puede variar entre las especies, por ejemplo en la tortuga *Chelydra serpentina* las temperaturas bajas (por ejemplo de 20 °C) determinan hembras (Yntema, 1979) y en el *Caiman crocodilus* y *Crocodylus moreletii*, en temperaturas intermedias dan machos y temperaturas altas y bajas determinan a hembras (Lang y Andrews, 1994).

1.1.3.2 Saurios

En 32 especies de saurios distribuidas en 6 familias se ha confirmado que la temperatura determina el sexo; la mayoría perteneciente a la familia Agamidae (13 especies de 32, por ejemplo *Pogona vitticeps*) y Gekkonidae (8 especies de 32, por ejemplo *Eublepharis macularis*), (Ezaz y col., 2009).

Robert y Thompson (2001) fueron los primeros en descubrir en *Eulamprus tympanum* que la DST se presenta en especies vivíparas. A partir de este estudio se han descubierto a otros 4 saurios vivíparos con DST (Ji y col., 2006; Wapstra y col., 2004; Zhang y col., 2010) (cuadro 1).

NOMBRE COMUN	ESPECIE	TPM	TPH	Ambos sexos
	Cocodrilo y tortugas			
Cocodrilo de las marismas	<i>Crocodylus palustris</i>	32.5 °C	28 a 31 °C	31, 32 y 33 °C
Aligador americano	<i>Alligator mississippiensis</i>	32.5-33 °C	30 °C	
Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	26 °C	31 °C	
Tortuga golfina	<i>Lepidochelys olivacea</i>	26-27.5 °C	32-33 °C	
Tortuga pinta	<i>Chrysemys picta</i>	25 °C	30.5 °C	
Tortuga lagarto	<i>Chelydra serpentina</i>	26 °C	30 °C	20 y 26 °C
	Lagartijas ovíparas			
	<i>Calotes versicolor</i>	25 y 34 °C	23.3 y 31.5 °C	
Gekko leopardo	<i>Eublepharis macularis</i>	31,33 y 35 °C	26,28; 29 y 30 °C	
	Lagartijas vivíparas			
* Eslizón agua del sur	<i>Eulamprus tympanum</i>	30.1-31.2 °C	25 °C	25 °C
	** <i>Eremias multiocellata</i>	35 °C	25 °C	29 y 31 °C
	* <i>Niveoscincus ocellatus</i>	30 °C	25 °C	25 °C
	*** <i>Sphenomorphus indicus</i>	28 °C	24 °C	

Cuadro 1. Especies en las cuales la temperatura determina el sexo en el periodo termosensible. TPM (Temperatura de Producción a Machos), TPH (Temperatura de Producción a Hembras) (Pieau, 1978; Yntema, 1979; Lang y col., 1989; Wibbels, 1998; Valleley y col., 2001; Shoemaker y Crews, 2009) *(Robert y Thompson., 2001; 2005) **(Xiao-Long, 2012) (***) Ji y col., 2006).

2. Mecanismos que controlan la diferenciación Sexual

En especies con DSC y DST existe un periodo crítico de diferenciación sexual. Es en este periodo donde se lleva a cabo una cascada de eventos moleculares y celulares que concluyen en la morfogénesis de las gónadas (ovarios o testículos). En continuidad con este fenómeno ocurre el desarrollo de los conductos sexuales y genitales externos. A la par con estos eventos ocurre la diferenciación sexual cerebral y en la vida posnatal la adquisición de características fenotípicas y de comportamiento (Salame-Méndez, 1998).

2.1 Mecanismos que controlan la diferenciación de la gónada

El desarrollo de las gónadas es regulado por una cascada de eventos, y diversas evidencias muestran que estos mecanismos se han conservado en los diferentes clados de vertebrados y que en las especies con DST esta serie de eventos inicia en el PST (como en

Trachemys scripta, *Alligator mississippiensis*, *Lepidochelys olivacea*, *Eublepharis macularius*: Shoemaker y Crews, 2009; *Chrysemys picta*, *Sternotherus odoratus*, *Testudo graeca*, *Emys orbicularis* y *Dermochelys coriácea*: Pieau y col., 1999).

Los principales eventos moleculares y celulares de la diferenciación gonadal se pueden dividir en tres etapas:

- 1.- cresta gonadal
- 2.- gónada bipotencial
- 3.- diferenciación testicular y ovárica

1.- Cresta gonadal: Diversos investigadores han identificado a dos genes SF1 (factor 1 estereidogénico) y Wt1 (Tumor de Wilm's) que se expresan antes de que empiece la diferenciación gonadal e incluso antes del PST para las especies con DST (Cuadro 2) (Shoemaker y Crews, 2009 y Norris y López, 2011).

Los principales eventos celulares en la formación de la cresta genital son los siguientes:

Inicia con la formación de un primordio gonadal, el cual es un engrosamiento de la pared dorsal del celoma. Esta estructura surge en especies con DST antes del PST (Figura 1) (*Lepidochelys olivacea* y *Alligator mississippiensis*: Pieau y col., 1999).

En *Sceloporus undulatus* el primordio surge en el estadio 29 y 30 (Defaure y Huber, 1961) y se ha observado que en esta etapa el mesénquima indiferenciado se extiende en la superficie ventromedial de cada riñón mesonéfrico y a cada lado del mesenterio dorsal. La cresta se encuentra cubierta por epitelio cubico simple y las células germinales primordiales están presentes a lo largo de la cresta, así como en los tejidos adyacentes (Austin, 1988).

En *Alligator mississippiensis* (especie con DST) los cordones sexuales y la red entran en contacto en la parte interior de la gónada y por lo tanto hay una mezcla de los dos tipos celulares.

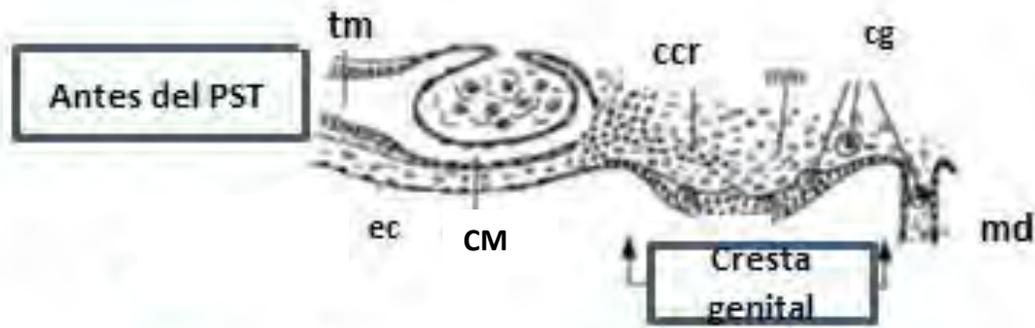


Figura 1. Desarrollo gonadal en etapa de cresta genital en especies con determinación del sexo por temperatura. CM, capsula Malpighi Ec, epitelio celómico; md, mesenterio dorsal; cg, células germinales; mm, mesénquima mesonefrico; tm, tubo mesonefrico; ccr, conjunto de cordones red (tomado de Pieau y col., 1999).

2.- Gónada bipotencial: se ha observado la expresión del gen Sox9 en diferentes reptiles (*Alligator mississippiensis*, *Lepidochelys olivácea*, *Chelydra serpentina*, *Chrysemys picta* y *Eublepharis macularius*: Shoemaker y Crews, 2009). En esta etapa la gónada indiferenciada, tiene forma ovoide y sobresale del celoma. La red sexual está presente (estadio 31-35 en *Sceloporus undulatus*: Austin, 1988).

En especies con DST se lleva a cabo durante el PST (Figura 2), la gónada permanece indiferenciada, sin embargo, en una TPH los cordones sexuales son más delgados (Pieau y col., 1999).

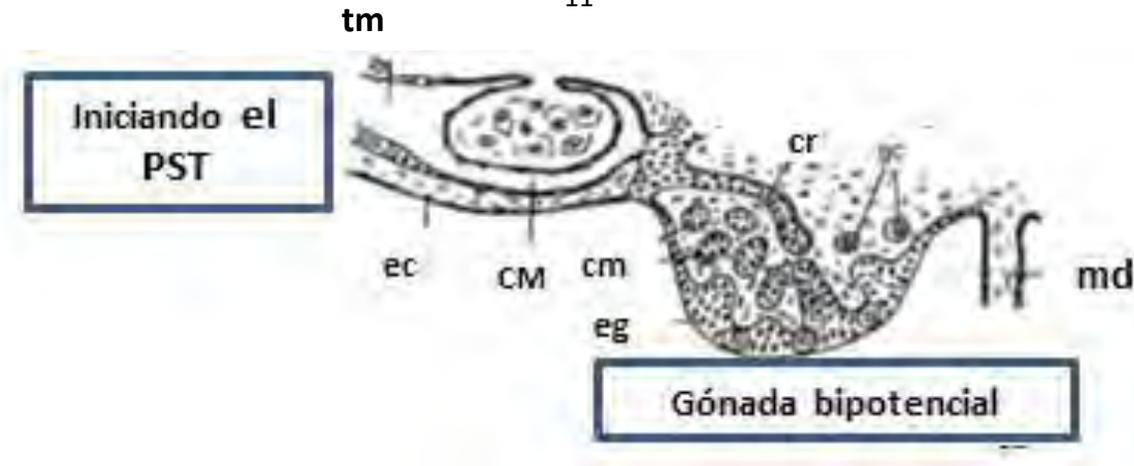


Figura 2. Desarrollo gonadal en etapa de gónada bipotencial en especies con determinación del sexo por temperatura. CM, capsula Malpighi; ec, epitelio celómico; md, mesenterio dorsal; eg, epitelio germinal; cm, cordones medulares; tm, tubo mesonefrico; cr, cordón rete (tomado de Pieau y col., 1999).

3.- Gónada diferenciada:

En mamíferos se han detectado a dos genes, Dax1 y Wnt4 que participan tanto en la diferenciación del testículo como del ovario,

En reptiles con DST la expresión de los genes para la diferenciación testicular y ovárica va a depender sí durante el PST en el nido hay una TPM o TPH (Crew, 1994; Moreno-Mendoza, 1999; Manfred-Schartl, 2004; Ezaz y col., 2005; 2006; 2009; 2013; Ferguson-Smith M, 2007; Valenzuela, 2008; Koopman, 2009; Pokorná, 2010). Después del PST el desarrollo testicular u ovárico ya no es afectado por hormonas esteroides exógenos o cambios de temperatura (Bull, 1987; Bull y col., 1988).

Tanto en especies con DSC y DST la diferenciación testicular se inicia con la congregación de las células germinales primordiales en la medula o en la corteza para el desarrollo ovárico (Smith y Joss, 1993; Greenbaum y Carr, 2001). La diferenciación de un testículo o un ovario en especies con DST se da hasta el final del PST (Fig. 5 y 6) (Pieau y col., 1999).

Testículo: se ha detectado la expresión de los genes, Sox 9, MIS (hormona anti müleriana), Dmrt 1 (doble sexo y factor transcriptor 1 de

mab3), Dax 1 (dosificador sensible al cambio de sexo) y Fgf9 (factor de crecimiento de fibroblastos 9) (ver cuadro 2) (Shoemaker y Crews, 2009).

La diferenciación testicular en *Sceloporus undulatus* inicia en el estadio 34-35, donde el 50 % de la gónada está indiferenciada. La corteza retrocede y se empieza a formar los túbulos seminíferos en la médula, el epitelio de la superficie ya no contiene células germinales primordiales y las espermatogonias están presentes en la médula y en la red testicular. En el estadio 36-38 los túbulos seminíferos son más numerosos y más desarrollados, la lámina basal está casi completa y la mayoría de las espermatogonias se encuentran en los túbulos. Las células de Sertoli son evidentes y sólo 20 a 50% del testículo permanece indiferenciado. Para el estadio 38-40 los túbulos han completado su formación y son más numerosos, el epitelio escamoso es de 1-4 capas de células, y las células de Leydig son aparentes (Austin, 1988).

En especies con DST el epitelio germinal se aplana, las células germinales migran entre las células epiteliales de los cordones medulares y las células de los cordones adquieren cada vez más las características de células de Sertoli. Los cordones medulares forman el esbozo de los túbulos seminíferos en la médula (Pieau y col., 1999) (Fig. 3).



Figura 3. Diferenciación testicular en especies con determinación del sexo por temperatura. Ccs, conjunto de cordones seminífero (tomado de Pieau y col., 1999).

Después del PST (Fig. 4) hay una túnica albugínea fina compuesta de pocas capas de fibroblastos, que rodean a los testículos. Las células de Leydig comienzan a diferenciarse en tejido intersticial.

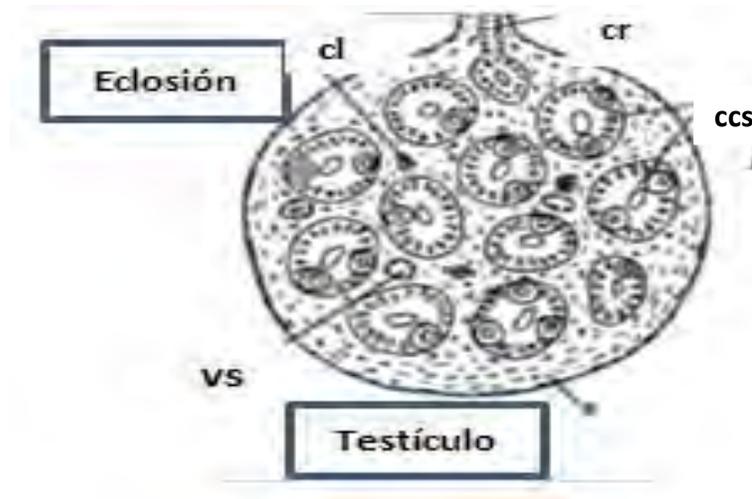


Figura 4. Diferenciación testicular en especies con determinación del sexo por temperatura, después del periodo termosensible. A, albugínea; vs, vaso sanguíneo; cl, células de; cr, cordón rete; ccs, conjunto de cordones seminífero (tomado de Pieau y col., 1999).

Ovario: los genes que se expresan para su diferenciación son, Foxl2, Rspo 1 (respondina 1), Wnt4 y Dax 1 (Cuadro 2) (Shoemaker y Crews, 2009).

Los principales eventos celulares en la diferenciación ovárica son los siguientes.

La médula se empieza a reabsorber para crear pequeños espacios y la corteza a engrosar, células somáticas pre-foliculares rodean a las células germinales en la región de la corteza para formar así ovocitos (Wibbels y col., 1991; Smith y Joss, 1993; Greenbaum y Carr, 2001).

Austin, (1988), menciona en *Sceloporus undulatus*, que en el estadio 34-35, el epitelio superficial que forma la corteza ha proliferado de 2-3 capas de células de espesor, las ovogonias se encuentran en la corteza y el rete, además se llegan a observar algunos ovocitos desnudos. En el estadio 36-38, la corteza tiene un espesor de 3-5 células, los ovocitos y ovogonias han aumentado en número y se

encuentran predominantemente en la corteza o anterodorsal al cordón del rete. Por último, en el estadio 38 al 40 la corteza es de 6-10 células y el rete está degenerando o ausente.

En especies con DST hay un engrosamiento del epitelio germinal por la proliferación de células epiteliales, las células germinales dan lugar a ovogonia y por lo tanto se forma una corteza ovárica. Al final del PST (Figura 5) algunas células germinales entran a meiosis. Los cordones medulares son delgados y aparecen fragmentados, separados por células intersticiales y vasos sanguíneos. Algunos cordones medulares no retroceden por completo, pero evolucionan como en la tortuga *Dermochelys coriacea* (Rimblot y col., 1985). El ovario tiene un menor crecimiento por la fuerte reducción medular y el poco desarrollo de la corteza. Después del PST (Figura 6), continua la proliferación de células germinales y entran a meiosis en la corteza, por lo que esta se espesa fuertemente (en *Dermochelys coriacea* y *Lepidochelys olivacea* no hay meiosis durante el desarrollo embrionario) (Rimblot y col., 1985). En la eclosión ya hay folículos primordiales con ovocitos en crecimiento.



Figura 5. Diferenciación ovárica en especies con determinación del sexo por temperatura, al final del periodo termosensible. CM, capsula Malpighi; vs, vaso sanguíneo; l, lagunas; cm, cordones medulares (tomado de Pieau y col., 1999).

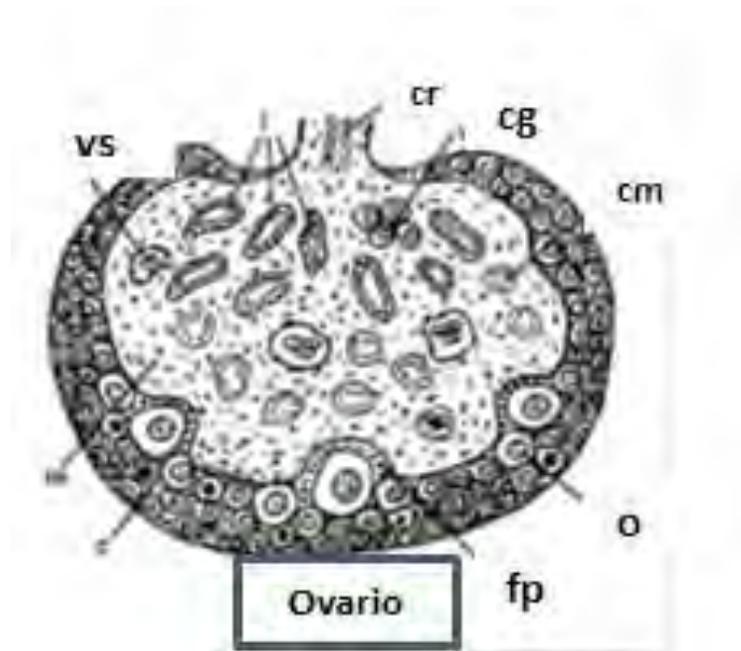


Figura 6. Diferenciación ovárica en especies con determinación del sexo por temperatura, después del periodo termosensible. Vs, vaso sanguíneo; c, corteza; cg, células germinales; l, lagunas; m, medula; cm, cordones medulares; o, ovocito; fp, folículo primordial; cr, cordón de la rete (tomado de Pieau y col., 1999).

DIFERENCIACIÓN A TESTICULO							
GEN	NOMBRE COMUN	ESPECIE	DONDE SE EXPRESA	SEXO	FASE	< EXPRESION	ESTADIO
SOX9	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	GAM	ambos	PST	TPM	19-23
	Tortuga golfina	<i>Lepidochelys olivacea</i>		ambos	PST: 23-25	TPM	26
	Cocodrilo Americano	<i>Alligator mississippiensis</i>	DT	ambos	PST	TPM	24-27
DMRT1	Gecko leopardo	<i>Eublepharis macularius</i>		ambos	PST: 36	TPM	al final PST: 37-40
	Cocodrilo americano	<i>Alligator mississippiensis</i>	CU	ambos	20-22	TPM	Final PST: 23-25
	Tortuga golfina	<i>Lepidochelys olivacea</i>		ambos	23-25	TPM	25-31
						TPM	26-31
	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	GAM, GA y CSCST	machos	PST	Indetectable en TPH	15-23
	Tortuga lagarto	<i>Chelydra serpentina</i>		mahos		Indetectable en TPH	
SF1	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	TG	machos		TPM	15-23
	Tortuga pinta	<i>Chrysemys picta</i>	SRG	ambos	PST	TPM	12 antes del TSP
WT1	Cocodrilo americano	<i>Alligator mississippiensis</i>	GAM	ambos	PST	TPM	20-23
			GA	ambos	PST	TPM	24-27
	Tortuga orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	GAM	ambos	PST	TPM	14-20
			NCSG		PST	TPM	16-18
			CC	hembras	PST	TPM	20-23
	Tortuga pinta	<i>Crysemys picta</i>	GAM	ambos	PST	TPM	9 al 22
				machos	PST	TPM	TSP 12
HIM	Cocodrilo Americano	<i>Alligator mississippiensis</i>	CM	machos	PST	TPM	22-25
	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	GAM, GB, TG y GA	ambos		TPM	15-23
Fgf 9, Sox8	Tortuga de orejas rojas y tortuga lagarto	<i>Trachemys scripta</i> y <i>Chelydra serpentina</i> . ²	TG	ambos		TPM y TPH	
DIFERENCIACIÓN A OVARIO.							
DAX1	T. orejas rojas, tortuga lagarto,	<i>T. Scripta</i> , <i>C. serpentina</i>	CG,CCM, CCW y AHP	Ambos	PST	TPH	
	tortuga pinta, golfina y cocodrilo americano	<i>C.picta</i> , <i>L. olivacea</i> , <i>A. mississippiensis</i>					
WNT4	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i> , <i>C serpentina</i>	CS,CM y MCE	ambos	PST	TPH	
FOXL2	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	GAM,GA y CCOD	ambos	PST	TPH	
Rspo1	Tortuga de orejas rojas	<i>Trachemys scripta</i>	GA	hembras	PST	TPH	
AROMATASA (CYP19)	Tortuga de orejas rojas	<i>T. scripta</i> , <i>A. mississippiensis</i> , <i>E. urbicularis</i>	AGR, GAM y CGFM	ambos	PST	TPH	

Cuadro 2. Genes involucrados en la diferenciación testicular - ovárica y temperatura que estimulan su expresión. GAM (Complejo Gónada-Adrenal-Mesonefros), DT (Diferenciación Testicular), CU (Cresta Urogenital), GA (Gónadas Aisladas), CSCST (Células Somáticas de Cordones Sexuales del Testicular, TG (Tejidos de Gónadas), CSRG (Complejo Suprarenal-Renal-Gónada), NCSG (Núcleo de Células Somáticas de Gónadas), CC (Células Corticales), CM (Células Medulares), GB (Gónada Bipotencial), TG (Toda la Gónada), CS (Cordones Sexuales), CM (Conductos de Müller), MCE (Migración de Células Estereidogenicas), CCOD (Células de Corteza Ovárica en Desarrollo), AGR (Adrenal-Gónada-Riñón), CGFM (Células Germinales en Fase Meiótica), TPM (Temperatura de Producción a Machos), TPH (Temperatura de Producción a Hembras), PST (Periodo Sensible de Temperatura) (Moreno-Mendoza, 1999; Manfred-Schartl, 2004; Ezaz y col., 2005; 2006; 2009; 2013; Ferguson-Smith M, 2007; Valenzuela, 2008; Koopman, 2009; Pokorná, 2010).

2.2 Mecanismos que controlan la diferenciación de los conductos

La formación de conductos se lleva a cabo al mismo tiempo que el desarrollo gonadal. Ambos conductos, Wolff y Müller se forman en ambos sexos durante el desarrollo embrionario. Austin (1988), menciona en *Sceloporus undulatus* que la morfología de los conductos es la misma en ambos sexos y es hasta el estadio 36 del desarrollo embrionario que se empiezan a diferenciar en las estructuras típicas de cada sexo. Conforme avanza el desarrollo uno de los conductos se desarrolla más, mientras que el otro conducto empieza a desaparecer, esto dependiendo del sexo del organismo (Pieau y col., 1999).

Conductos de Wolff: se forma inicialmente como conductos pareados colectores del riñón pronefrico. Place y Lance (2004) mencionan que es necesaria la participación de testosterona para la permanencia de los conductos de Wolff.

En las hembras los conductos de Wolff, presentan cambios como: las células del revestimiento epitelial adoptan una forma cúbica, hay reducción del tamaño del lumen y del mesotelio. Los conductos de Wolff en machos muestran pocos cambios, a excepción de una ligera disminución del ancho del lumen. En ambos sexos hay una reducción en el tamaño de los mesonefros (*Sceloporus undulatus*: Austin, 1988).

Conductos de Müller: surgen de una región del epitelio celómico que cubre cranealmente la parte del riñón embrionario (en el saurio *Niveoscincus ocellatus* inicia en el estadio 30-32: Neaves, 2006). Una vez que se han diferenciado los testículos, los conductos de Müller empiezan a retroceder hasta desaparecer (estadio 36 en *Niveoscincus ocellatus*: Neaves, 2006) debido al efecto del gen Sox9 en mamíferos, el cual regula los niveles de MIS (hormona anti Mülleriana) (Raynaud y Pieau, 1985; Austin, 1988; Wibbels, 1998; Greenbaum y Carr, 2001). MIS es secretada por las células de Sertoli, sin embargo, en el cocodrilo americano *Alligator mississippiensis* y tortuga de orejas rojas *Trachemys scripta* se ha detectado su expresión en diferentes regiones como en las células medulares, el complejo gónada-adrenal-mesonefro y en gónadas aisladas, en el PST (estadio

22-25 en el cocodrilo y 16-23 en tortuga) (Shoemaker y Crews, 2009; 2010).

Por otro lado los conductos de Müller se diferencian en las hembras en los oviductos (Raynaud y Pieau, 1985; Austin, 1988; Wibbels, 1998; Greenbaum y Carr, 2001). *Dax1* es expresado por los ovarios para suprimir la transcripción de los genes *Wt1* y *Sf1* y permitir la retención de los conductos (Norris y López, 2011).

2.3 Mecanismos que controlan la diferenciación de los genitales externos

Los genitales externos en escamosos, están presentes en pares y se les denomina hemipenes, mientras que en tortugas y cocodrilo sólo existe uno denominado pene; en ambos el surco espermático es bifurcado (Kelly, 2002).

La formación de los hemifalcos se inicia con la formación de un primordio que sobresale de la base ventral de las extremidades posteriores. Se origina de la somatopleura (mesodermo lateral y ectodermo de la superficie) (estadio 3 en *Anolis carolinensis*: Gredler, 2014; antes del estadio 29 en *Niveoscincus ocellatus*: Neaves, 2006; estadio 33 en *Barisia imbricata*: Martínez-Torres, 2015) (siguiendo la tabla de desarrollo de *Lacerta vivípara* de Dufuare y Hubert, 1961). En machos y hembras el desarrollo inicial de los genitales externos es muy similar pero en estadios más avanzados se diferencian en hemipenes en machos y hemiclitoris en hembras (estadio 10 en *Anolis carolinensis*: Gredler, 2014; estadio 35 en *Niveoscincus ocellatus*: Neaves, 2006), con la participación de andrógenos (en machos) y estrógenos (en hembras) (Holmes y Wade, 2005 y Beck y Wade, 2008).

Diferenciación de hemipenes

Se ha comprobado la expresión de 3 genes que participan en la diferenciación de los hemipenes: *Shh* (sónica de erizo), *Bmp4* (proteína morfo genética de hueso) y *Fgf10* (factor de crecimiento de

fibroblastos 10), los cuales están implicados en el desarrollo de los hemifallos.

Los principales eventos para el desarrollo de hemipenes son los siguientes.

En el estadio 9 surge un segundo brote fálico en el margen craneal de cada uno de los fallos, la superficie del ectodermo de cada línea ventro-medial de los brotes fálicos se invaginan para formar el surco espermático. En el estadio 10 hay un crecimiento próximo-distal, continúa el desarrollo del fallo secundario y labio cloacal anterior. En el estadio 12, la superficie del ectodermo invagina dentro del surco espermático. Sobresale más el fallo secundario y disminuye la anchura del surco cloacal entre los hemipenes. En el estadio 14, se bifurca la parte distal del surco espermático (*Anolis carolinensis*, Gredler, 2014).

Diferenciación de hemiclitoris

Los fallos en hembras son menores que el de los machos y hay regresión de la hinchazón del fallo secundario. El labio cloacal anterior tiene un crecimiento menor que en machos, pero el labio cloacal posterior es más grande (estadio 10). En el estadio 12 hay una mayor regresión de los hemiclitoris, hay remanencias del surco espermático, el labio cloacal posterior es mayor que en machos y se ve una muesca en la superficie del epitelio en el sitio donde se encuentra la membrana cloacal. Los labios cloacales anteriores y posteriores se extienden hacia afuera de la pared del cuerpo y son mucho más pronunciados que en machos. En el estadio 14 continúa la regresión de hemiclitoris y se empiezan a doblar en sentido medial hacia la membrana cloacal y caudal hacia el labio posterior de la cloaca (*Anolis carolinensis*: Gredler, 2014).

2.4 Diferenciación fenotípica y de comportamiento

Los reptiles presentan una gama amplia de comportamientos como los modos de forrajeo, estrategia antidepredación, comportamiento para termorregular, cortejo y copula (Norris y López, 2011). Sakata y Crews

(2004); Huang (2013), observaron en el gecko leopardo *Eublepharis macularius*, que las hormonas esteroides contribuyen al fenotipo, características sexuales secundarias, rango social, tasa de crecimiento y comportamiento socio sexual del organismo. Sin embargo, la información de la regulación neuroendocrina de los comportamientos reproductivos es escasa (Norris y López, 2011).

Las regiones del cerebro involucradas en el comportamiento son altamente conservadas en los diferentes clados de vertebrados, como el, hipotálamo ventromedial (VMH), área preóptica media (POA), los cuales se encuentran asociados al comportamiento reproductivo de machos; la amígdala (AMG) y cerebro medio participan en la regulación de la receptividad de las hembras durante el apareamiento (*Anolis carolinensis* Greenberg: Scott y Crews, 1984; Goodson, 2005; Beck y Wade, 2009b).

En especies con DST se demostró que la temperatura de incubación organiza el cerebro, por ejemplo, en el gecko leopardo *Eublepharis macularis*, con una TPM y modificación experimental de niveles de andrógenos o estrógenos se altera el volumen del POA, VMH, hipotálamo anterior y AMG sin embargo, sí hay una TPH estas áreas no son afectadas (Crews y col., 1996).

La Testosterona (T) es producida por los testículos y el incrementos de su concentración en el plasma está asociado con el comportamiento agresivo, dominancia, ornamentaciones (Miles, y col., 2007), color, la territorialidad (*Urosaurus ornatus*: Hews y Moore, 1995; Weiss y Moore, 2004), cortejo, montaje e intromisión de órganos copuladores (*Anolis carolinensis*: Rosen y col., 2002). Mientras que en las hembras la receptividad sexual las hormonas ováricas como estradiol (E2) y progesterona son expresadas (Crews y Silver, 1985).

Testosterona es metabolizado en E2 o 5 α dihidrotestosterona (DHT) en el cerebro y se ha reconocido que DHT es necesaria para el mantenimiento del comportamiento reproductivo en machos (Ball y Balthazart, 2002). En hembras, T y E2 favorecen la receptividad de la

hembra, probablemente por la aromatización de T (Winkler y Wade, 1998).

3. Efecto del calentamiento global sobre el ratio sexual en reptiles

Se ha documentado que la temperatura mundial ha aumentado 0.2 °C por década (IPCC, 2007), y que en el siglo XXI ha sufrido un aumento promedio de 1.7 °C. El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) predice un aumento de la temperatura global entre 0.3 y 4.8 °C para el siglo XXII, esto dependiendo de las emisiones de CO₂ (IPCC, 2013).

Para México se prevé que para el 2020 se presentara un aumento de entre 0.6 a 1.0 °C y para el 2050 de entre 1.5 a 2.3 °C (Cárdenas, 2009) y que las temperaturas extremas han subido hasta 3.9 °C en algunas regiones de la zona centro del país (Informe Climatológico de la Cuenca del Valle de México, 2006). En el 2015 la temperatura media anual fue de 16 °C (INEGI, 2015).

El cambio climático está generando condiciones críticas en diversos hábitats de las regiones templadas del planeta (temperaturas más altas en elevadas altitudes, sequías, olas de calor, etcétera) (Cárdenas, 2009).

Existe evidencia de que el aumento de temperatura puede afectar la herpetofauna, provocando cambios en su historia de vida (*Zootoca vivípara*: Elvire y col., 2015) como alteraciones en la proporción de sexos (Wapstra, 2009), momento de la eclosión (Du y Shine, 2010), éxito de eclosión, fenotipo de las crías (Hare y col., 2002; Shine y col., 1997), puede afectar la respuesta inmune (Les y col., 2009), éxito reproductivo (Warner y col., 2010), modificación del ciclo ovárico de especies estacionales, tiempo de reproducción (Zani y Rollyson, 2011), disminución de poblaciones y desaparición de ellas a corto, mediano y/o largo plazo (Sinervo y col., 2010).

Miller y colaboradores (2004) propusieron una hipótesis en la que responsabilizan al calentamiento global ocurrido en el Cretácico-Terciario de la extinción de los dinosaurios. Ellos sugieren que el aumento de la temperatura originó una preponderancia de machos, provocando la desaparición de diversas especies de dinosaurios; situación que podría estarse repitiendo en la actualidad. Por ejemplo, en un estudio de Sinervo y sus colaboradores (2010), señalan que desde 1975, el 12% de las poblaciones mexicanas de saurios se han extinguido, y a partir de esta fecha se estima que el 4% de las poblaciones mundiales han desaparecido y predicen que puede llegar a un 39% para el año 2080 (predicciones hechas por observaciones de 1975-2009), a causa del cambio de temperatura y que la tasa de adaptación no ha sido lo suficientemente rápida.

Ospina- Álvarez y Piferrer (2008) y Mitchell y colaboradores (2010) mencionan que las proyecciones del cambio climático podrían sesgar la descendencia hacia un solo sexo, en especies con DST, como se observa en algunas especies de tortuga marina donde se ha reportado el sesgo a solo hembras (*Chelonia mydas*: Broderick y col., 2001).

Santidrian-Tomillo y colaboradores (2015) demostraron que en la tortuga *Dermochelys coriácea* con DST una temperatura elevada de (30.4) favorecía la producción predominantemente de hembras pero al aumentar la temperatura conforme a los niveles proyectados por los modelos de cambio climático del IPCC, se sesgaría a machos.

Wapstra (2004), observo que en hembras preñadas del saurio vivíparo *Niveosincus ocellatus* (familia Scincidae) con limitada oportunidades de termorregulación producen predominantemente machos (69% machos= 31 y 31% hembras= 14) y hembras con mayor oportunidad de termorregulación tienen una predominancia de crías hembras (67% hembras= 18 y 33% machos= 9).

Además Wapstra (2009) observó en campo fluctuaciones de la proporción sexual en *Niveosincus ocellatus* a lo largo de 7 años de estudio. Por ejemplo hubo una dominancia de machos del 2001 al 2004 y una dominancia de hembras en el 2000 y 2006; y en el año

2007 se obtuvo radios sexuales mezclados (prácticamente 50:50). Concluyeron que el radio sexual en esta especie era dependiente de la temperatura, al observar que sus resultados del radio sexual variaban dependiendo de los años más o menos cálidos. Él explica que las hembras podrían modificar su comportamiento en base a la estación ya sea reduciendo su toma de asoleo en años más calurosos y en años más fríos aumentarla.

Xiao-Long y colaboradores (2012), encontraron que la temperatura en la que se encontraban las hembras gestantes de la lagartija vivípara *Eremias multiocellata* (familia: Lacertidae) determinaba el sexo, con una TPH a 25 °C, TPM a 35 °C; y balance de sexos a 29 y 31 °C.

Robert y Thomson (2006), determinaron en el saurio vivíparo *Eulamprus tympanum* (familia: Scincidae) que la temperatura de gestación en esta especie influía en el radio sexual, con una termorregulación limitada a 32 °C se producían exclusivamente machos.

Ji y sus colaboradores (2006) estudiaron a la lagartija vivípara *Sphenomorphus indicus* (Scincidae) y demostraron una relación de la temperatura de gestación con el radio sexual ya que a 24 °C nacían un 85.7% de hembras y a 28 °C un 76.5% de machos.

4. OBJETO DE ESTUDIO

Barisia imbricata (Figura 7 y 8) es una lagartija saxícola y tigmoterma facultativa, endémica de México (Villamar, 1998), que habita en climas templados o subtropicales, en elevaciones entre 2200 y 3800 msnm y que se distribuye a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal (Figura 9) (Dashevsky y col., 2013).

Este saurio vivíparo, presenta reproducción estacional anual otoñal. La vitelogénesis inicia en el verano, la ovulación en noviembre y diciembre (Martínez-Torres y col., 2006), el apareamiento ocurre antes de la ovulación (Guillete y Casas, 1987) y la gestación es durante los

meses de invierno y gran parte de la primavera (finales de noviembre o principios de diciembre a finales de mayo o principios de junio) (Martínez-Torres y col., 2003).

El desarrollo de las gónadas inicia en el estadio 33 (Figura 10) del desarrollo embrionario y concluye en el estadio 40 (Martínez-Torres y col., 2015) Los eventos más relevantes de este proceso son los siguientes.

La etapa de cresta gonadal ocurre entre los estadio 33-34. El primordio se forma por epitelio germinal, células mesenquimales y células germinales, mientras que en el estadio de gónada bipotencial ocurre entre el estadio 35-36. Se observan cordones sexuales en la región cortical y medular. Finalmente, la etapa de diferenciación ovárica y testicular se hace evidente en el estadio 38 (figura 11 y 12), el primer cambio es la regresión de los cordones sexuales de la medula en el estadio 37 y la formación de cavidades. La formación del folículo primordial sucede en el estadio 40. Por otro lado la formación del testículo inicia con el desarrollo de los cordones sexuales en la médula y regresión de las células germinales en la corteza (Martínez-Torres y col., 2015).

En los recién nacidos el ovario muestra una diferencia histológica clara entre la medula y la corteza. En la corteza existen folículos en proceso de formación, folículos ováricos de tamaños diferentes y algunas ovogonias y en la región medular se encuentran pequeñas cavidades. En los testículos de los presentan algunos túbulos seminífero, con células de Sertoli y escasas espermatogonias. Se observa tejido intersticial con células intersticiales (células pre-Leydig), algunos fibroblastos y vasos sanguíneos. Las células intersticiales contienen núcleo con cromatina condensada y escaso citoplasma (Martínez-Torres y col., 2015).

Aguilar-Martínez (2011) mencionan que las hembras de *B. imbricata* tienen un tamaño de camada promedio de 6.9 ± 0.3 , aunque el conteo de folículos vitelogénicos sugiere que pueden tener camadas hasta de 10 crías en promedio, (Figura 13 y 14).

En este saurio no existe evidencias de dimorfismo sexual corporal al momento del nacimiento, incluso hembras y machos presentan hemipenes, y no es hasta que cumplen de 12 a 15 meses de edad que

los hemipenes concluyen la regresión en las hembras y los machos adquieren las características típicas de los adultos (Martínez-Torres y col., 2015).



Figura 7. *Barisia imbricata* hembra.



Figura 8.
Barisia imbricata
macho.

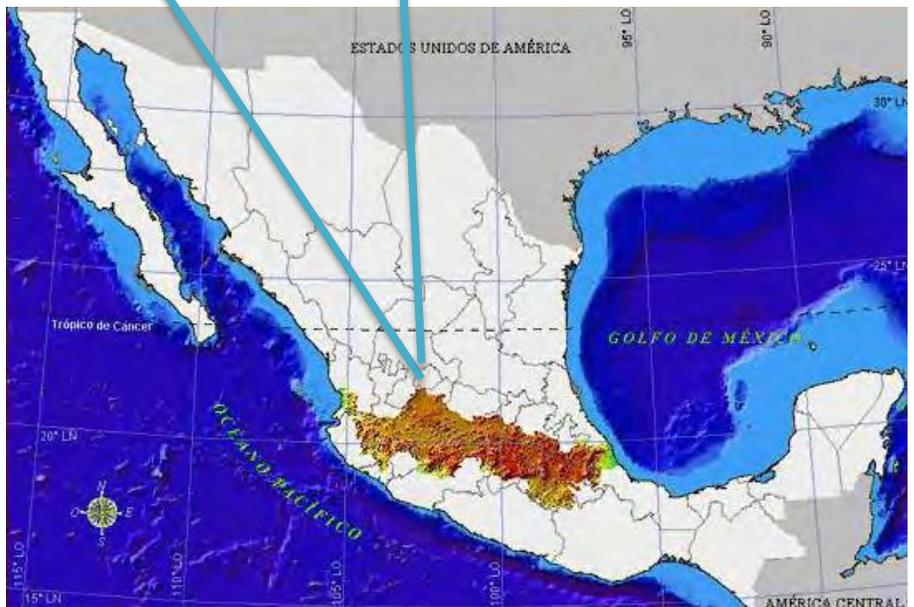


Figura 9. Distribución de *Barisia imbricata* (Eje neovolcánico transversal).



Figura 10. Embriones de *Barisia imbricata* en el estadio 33.



Figura 11 y 12. Embriones de *Barisia imbricata* en el estadio 38.



Figura 13 y 14. Camada de críos recién nacidos de *Barisia imbricata*.

5. JUSTIFICACIÓN

Los trabajos en saurios acerca de los mecanismos de determinación del sexo son muy escasos, ya que la mayoría de los investigadores se ha enfocado en trabajar con tortugas y cocodrilos (Moreno-Mendoza, y col., 1999) y los pocos trabajos en saurios son en especies ovíparas (Valleley y col., 2001; Radder, 2007) por ser más fáciles de controlar las variables, en cambio en saurios vivíparos se han estudiado solo 5 especies (*Niveoscincus ocellatus*: Wapstra, 2004; 2009; *Eulamprus tympanum*: Robert, 2006; *Podarcis muralis*: Florentino-Braña y Xiang – Ji, 2000; *Sphenomorphus indicus*: Ji y col., 2006; *Eremias multiocellata*: Xiao-Long y col., 2012).

La IPCC (2013) menciona que las temperaturas están aumentando más rápidamente en elevadas altitudes y que los organismos ectotermos se encuentran más en riesgo al cambio climático que los organismos endotermos, por lo que la evaluación de su vulnerabilidad es importante (Pacifici, 2015).

En los reptiles la temperatura participa para la determinación del sexo de la camada o nidada, por ejemplo se ha demostrado que *Bassiana duperreyi* presenta determinación genética del sexo sin embargo la temperatura se impone a los cromosomas sexuales para la determinación del sexo (Radder y col., 2009). Por tal razón, este y otros saurios, podrían ser susceptibles al sesgo de la proporción sexual por efecto del calentamiento global. Motivo por el cual es importante realizar trabajos sobre el efecto que podrían tener las temperaturas operativas extremas sobre el ratio sexual conforme a lo que se pronostica acerca del aumento de temperatura.

6. OBJETIVOS

6.1 General

- Establecer sí el mecanismo de determinación del sexo en la lagartija vivípara *Barisia imbricata* está determinado por cromosomas sexuales heteromórficos y/o ambiental (temperatura).

6.2 Particulares

- Establecer el cariotipo de hembras y machos en esta especie.
- Determinar si hay cromosomas sexuales heteromórficos y de ser así, en que sexo.
- Establecer sí la restricción de la termorregulación a una temperatura operativa extrema (32 °C) durante el periodo crítico de diferenciación gonadal, sesga el sexo de la camada.

7. MATERIAL Y METODO

Se colectaron organismos adultos de la lagartija vivípara *Barisia imbricata* del municipio de Nicolás Romero en la localidad de Vicente

Guerrero, Estado de México ($19^{\circ} 37' 19.92''$ N, $99^{\circ} 25' 5.16''$, altitud media de 2803 msnm) (CONAGUA, Servicio Meteorológico Nacional, 2010). Se transportaron los organismos al laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM ($19^{\circ} 36' N$, 98.5° , $11' W$, 2240 m de altitud). Se colocaron a los organismo en encierros de 4.98 m largo y 2.78 m de ancho (figura 15 y 16) y permanecieron ahí hasta el momento en que se inició la fase experimental. Se alimentaron cada tercer día con larvas de palomilla (*Galleria melonella*) y grillo doméstico (*Acheta domesticus*) (figura 17 y 18), suplementados con vitaminas para reptil (vit-plus y cal-plus marca TOTTO) además de proporcionarles el agua necesaria.

El lote experimental se dividió en dos grupos “cromosómico” y. “ambiental”.



Figura 15 y 16. Encierros de semicautiverio de los organismos.



Figura 17 y 18. Larvas de palomilla (*Galleria melonella*) y grillo doméstico (*Acheta domesticus*), respectivamente.

7.1 Cromosómico

Para establecer sí la determinación del sexo en esta especie es por cromosomas sexuales se llevó a cabo cultivos de linfocitos de machos y hembras adultos.

Se observaron las metafases de los linfocitos para así organizar el cariotipo de hembras y machos y detectar si presentan o no cromosomas sexuales heteromorficos.

7.1.1 Cultivo de linfocitos

Se extrajeron de 200 a 300 μ l de sangre mediante punción cardiaca con una jeringa que contenía 20 μ l de heparina (figura 19).

La sangre se colocó en 2 ml de medio RPMI 1640 adicionado con 10 μ l de antibiótico (penicilina-estreptomicina) y 200 μ l de fitohemaglutinina como mitógeno.

Se cultivó a 32 °C, agitándose los tubos cada mañana para romper los agregados celulares, a las 70 hr de incubación se agregaron 100 μ l de colchicina al 0.02% y se dejó incubar por 2 hr más (adaptado de Ulsh y col., 2000a) posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm/10 min, se decantó el sobrenadante (dejando en promedio 2ml) y la pastilla se re suspendió en 5 ml de solución hipotónica de KCL al 0.075 M a 32 °C y por último se incubaron por 30 min a 32°C.

Al final de este periodo se prefijaron las células con 1 ml de Metanol-Ácido Acético 3:1 por 20 min a 4 °C, posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm/10 min se quitó el sobrenadante y se adiciono 5 ml de fijador se volvió a centrifugar y se repitieron los lavados 3 veces más.



Figura 19. Técnica de extracción de sangre por punción cardiaca.

7.1.2 Preparación de los frotis

Se utilizó la técnica de goteo (modificado de Ulsh y col., 2000 b), la cual indica que se debe de dejar caer, de aproximadamente 1.2 m de altura 3 gotas del cultivo de linfocitos antes mencionado en laminillas las cuales se enfriaron previamente con metanol a 4 °C, las laminillas se dejaron secar al aire.

Se tiñeron las muestras con Giemsa, preparado con solución de Sorenson (Ulsh y col., 2000 a) durante 2 minutos. Una vez transcurridos ese tiempo se lavaron con agua destilada y se secaron al aire.

Se observaron las laminillas al microscopio, se ubicaron las metafases y se fotografiaron por medio del equipo y software Moticam.

Con las mejores fotografías se organizó el cariotipo de la especie acomodándolos por tamaño decreciente con ayuda del programa Adobe Photoshop CS6.

7.2 Ambiental

Para determinar si la temperatura participaba en la determinación del sexo y si la restricción de la termorregulación a una temperatura arriba de las operativas de 32°C afecta el sexo de la camada, se dividió a los organismos en tres grupos:

I. Grupo Experimental:

Se colocaron 12 hembras preñadas en terrarios de 1.37 m de largo y 95 cm de ancho (figura 20 y 21).

Los embriones de las hembras gestantes se encontraban previos al estadio 30 de desarrollo embrionario, ya que en estas especies por estudios de Martínez-Torres y colaboradores (2015) se sabe que el sexo todavía no se ha determinado ya que el periodo de cresta gonadal inicia a partir del estadio 33.

La temperatura se eligió 32 ± 1 °C ya que se han hecho estudios en la familia Anguillidae acerca de las temperaturas operativas, las cuales van de 21 a 31 °C (Villamar, 1998), por lo que 32 °C sería una temperatura extrema para ellas, pero abajo de las temperaturas letales las cual van de 40 a 48°C (Cowles y Bogert, 1944).

La temperatura fue controlada por medio de ventiladores y calentadores. La humedad ambiental y la temperatura se les registró diariamente y cada hora por medio de un registrador de datos (DATALOGGER, marca Extech Advantage).

Una vez superada la etapa de diferenciación sexual (posterior al estadio 38 (Martínez-Torres, 2012; 2015) se aislaron a cada una de las hembras en terrarios individuales hasta el nacimiento de los críos para poder determinar el número de críos y el sexo de la camada.



Figura 20 y 21. Terrarios donde se mantuvieron a las hembras preñadas de *Barisia imbricata* del Grupo Experimental.

II. Grupo Control, antes del Periodo crítico de diferenciación sexual (PCDS):

Se colocó a 4 hembras preñadas de *Barisia imbricata* en encierros de 4.98 m largo por 2.78 m de ancho (figura 22 y 23) y se les dejó termorregular libremente, registrando los datos de temperatura ambiental diaria durante los meses de gestación (DATA LOGGER, marca Extech Advantage) y se les proporcionó el alimento y agua necesaria. Se aislaron en terrarios individuales una vez superada la etapa de diferenciación sexual (estadio 38-40) hasta el momento del parto para determinar de esta manera la proporción sexual.

III. Grupo Control 2, después del PCDS:

Se colectó a 13 hembras preñadas de *Barisia imbricata*, las cuales termorregularon libremente en su estado natural durante la gestación y hasta su captura después del PCDS (estadio 38-40), con una temperatura promedio del sitio de captura de 23.9 ± 2.3 durante los meses de gestación de *Barisia imbricata* (cuadro 3).

Mes	temp. Máxima	temp. Mínima	Promedio de temp.	desv. estandar
Noviembre	28	12.5	21.9	2.5
Diciembre	28.5	12.5	21.5	2.7
Enero	29.5	8.5	21.3	3.2
Febrero	29.5	1	23	3.2
Marzo	32.5	11.5	25.6	2.9
Abril	36.5	18.5	27	3.1
Mayo	34.5	15.5	26.4	3.1
Junio	32.5	15.5	25.1	2.7
promedio	31.4375	11.9375	23.975	2.925
desv. Estandar	3	5.3	2.3	

Cuadro 3. Promedios de temperatura durante los meses de gestación de *Barisia imbricata* en Vicente Guerrero, Nicolás Romero (modificado de CONAGUA, Servicio Meteorológico Nacional, 2010).

A las hembras gestantes se les colocó en terrarios individuales hasta el nacimiento de los críos para poder determinar la proporción sexual de los mismos.

7.2.1. Establecimiento de la etapa de desarrollo embrionario y sexado de críos

Se les realizó laparotomías a 5 hembras gestantes del grupo experimental, 5 del grupo después del PCDS y 2 del grupo antes del PCDS, tomadas cada una de forma aleatoria (figura 22, 23 y 24), se tipificó a los embriones de acuerdo a la tabla de desarrollo de *Lacerta vivípara* (Dufaure y Hubert, 1961).

Adicional a la observación directa de los embriones, mensualmente se hicieron ultrasonidos (Figura 25 y 26) para conocer el avance del desarrollo del embrión y determinar el momento adecuado para separar a las hembras preñadas en terrarios individuales y esperar el nacimiento de las crías para su posterior sexado.

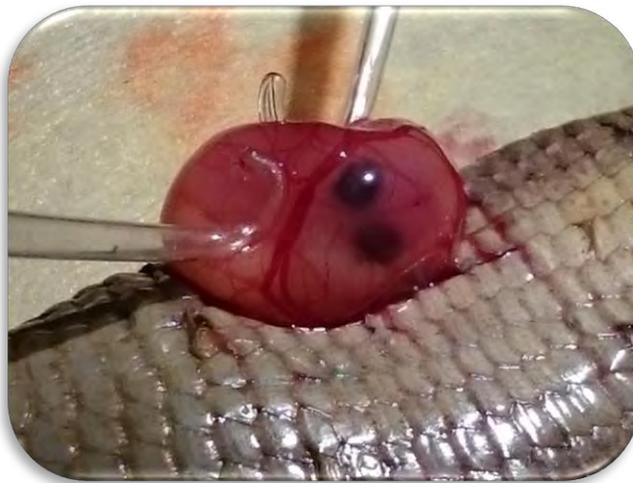


Figura 22, 23 y 24. Laparatomia de *Barisia imbricata*.



Figura 25 y 26. Ultrasonido de hembra gestante de *Barisia imbricata*.

El sexado de los organismos se realizó mediante la observación directa de los conductos (oviducto) para el caso de las hembras o su ausencia del mismo para el caso de los machos, tales observaciones se realizaron por una disección para las crías que murieron por causas naturales al momento de nacer o las que murieron post nacimiento y para las que sobrevivieron fue por medio de una laparotomía (figura 27 y 28).



Figura 27. Gónada de hembra de *Barisia imbricata*

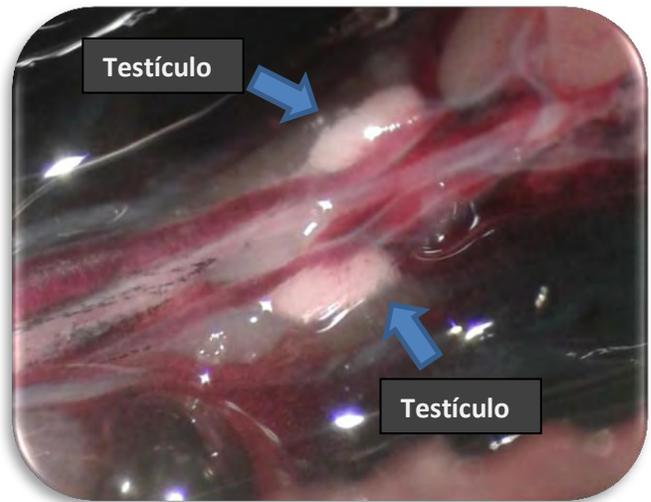


Figura 28. Gónada de macho de *Barisia imbricata*

7.3 Estadísticos

Para determinar si existía alguna relación de la temperatura con la proporción sexual de cada uno de los grupos, se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

Por último se utilizó el estadístico ANOVA de un factor con un alfa de 0.05 para observar si las medias de la proporción sexual de los tres grupos eran iguales o diferentes.

8. RESULTADOS

8.1 Cromosómico

El cariotipo de hembras y machos de *Barisia imbricata* se organizó juntando los homólogos de cada cromosoma y se acomodaron por tamaño en orden decreciente (figura 32 y 33).

Se encontraron alrededor de 15 metafases por laminilla (figura 29 de macho y 30, 31 de hembra) con un número diploide de $2n=48$ y sin cromosomas sexuales heteromórficos en ninguno de los sexos.

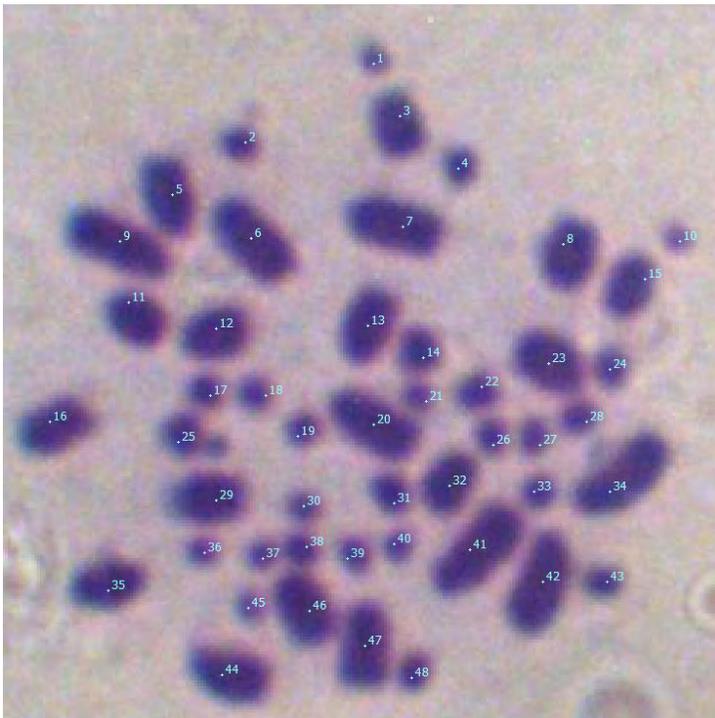


Figura 29. Cromosomas de macho en metafase

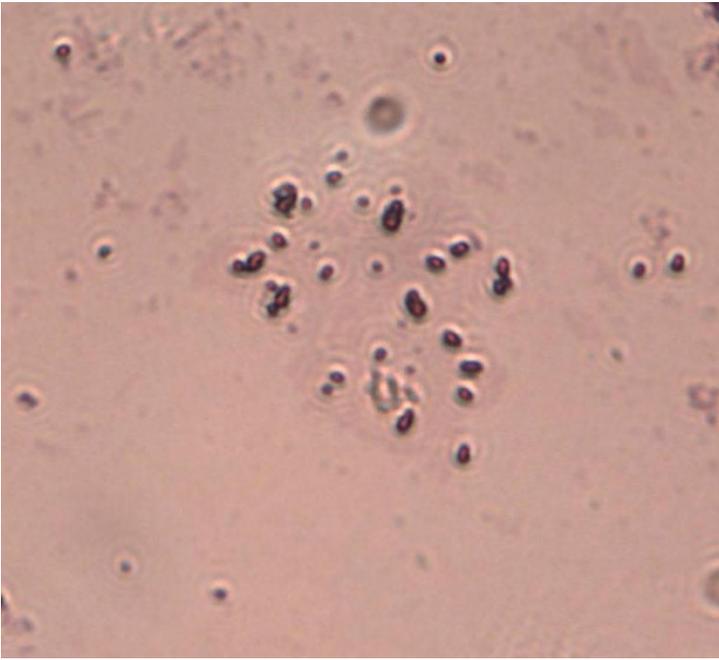


Figura 30. Cromosomas de hembra en metafase

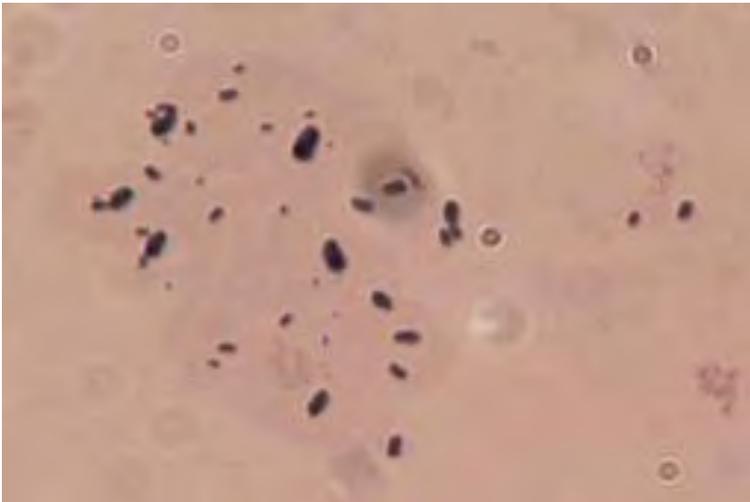


Figura 31. Cromosomas de hembra en metafase

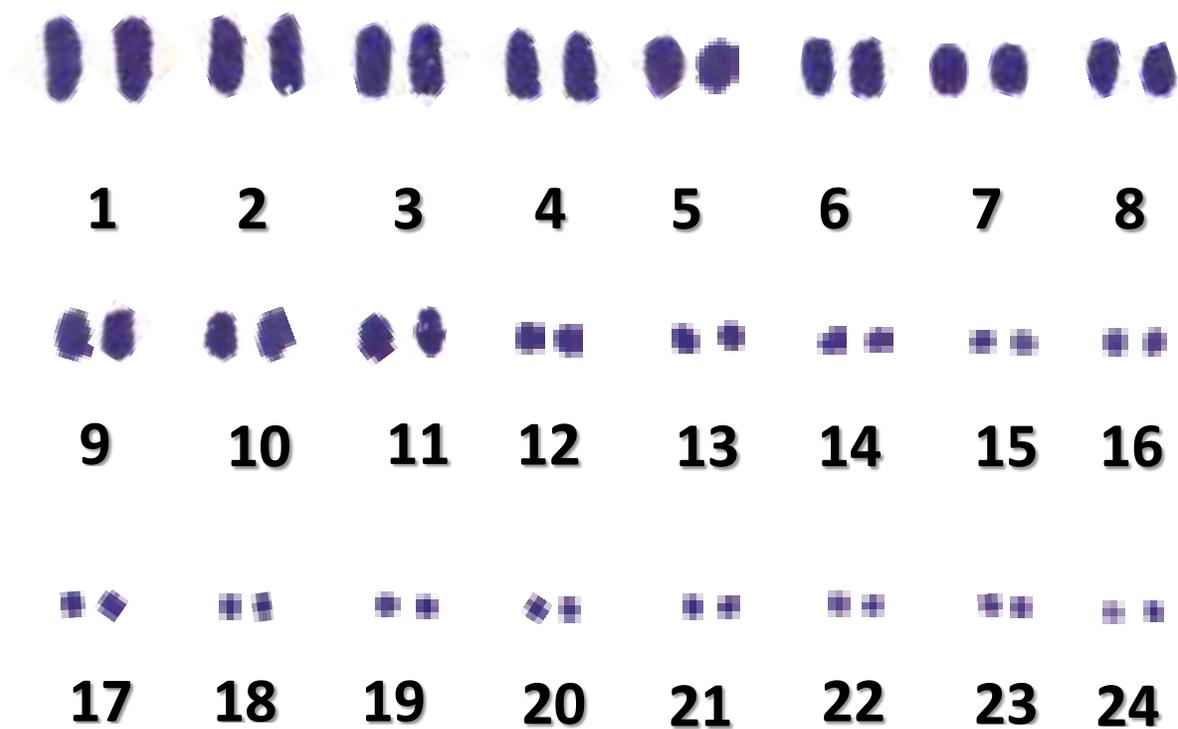


Figura 32. Cariotipo de macho de *Barisia imbricata*.

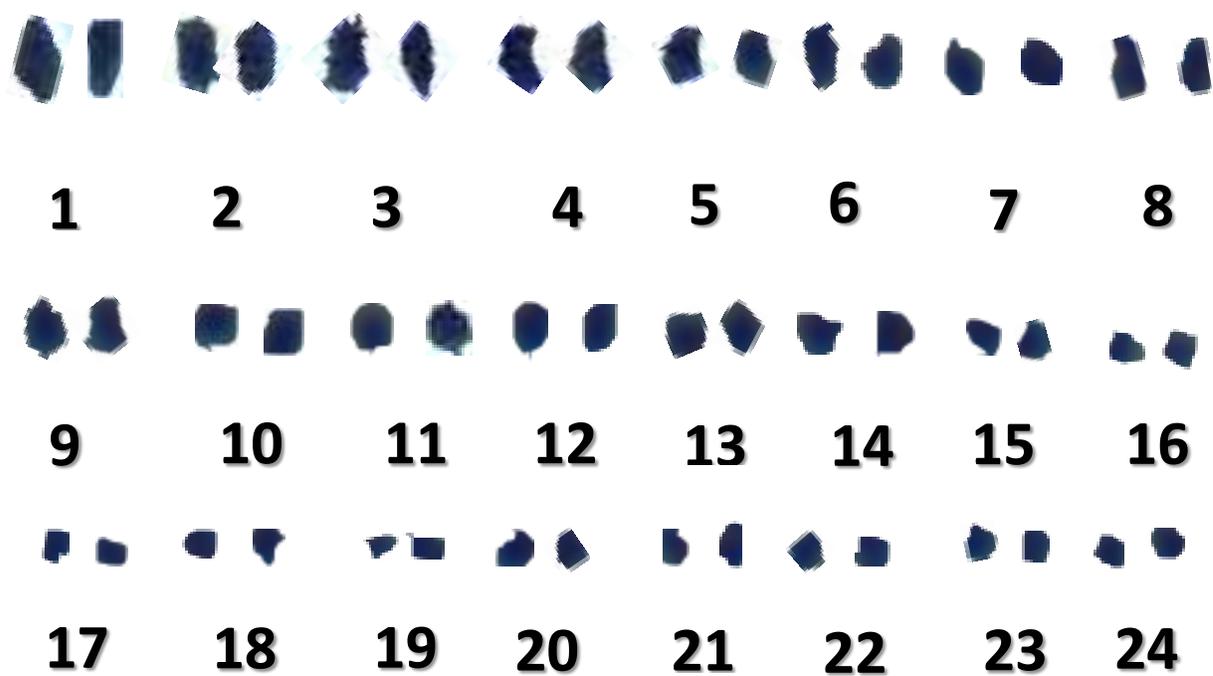


Figura 33. Cariotipo de hembra de *Barisia imbricata*.

8.2 Ambiental

- Grupo experimental

El promedio de proporción sexual por hembra gestante (figura 34) en este grupo fue equilibrado, con un total de 66 crías hembra y 79 crías macho (figura, 35). Se obtuvo una $p=0.3408$ conforme a la prueba de Mann-Whitney, por lo que no hubo relación de la restricción de la temperatura a 32 ± 1 °C con respecto a la proporción sexual.

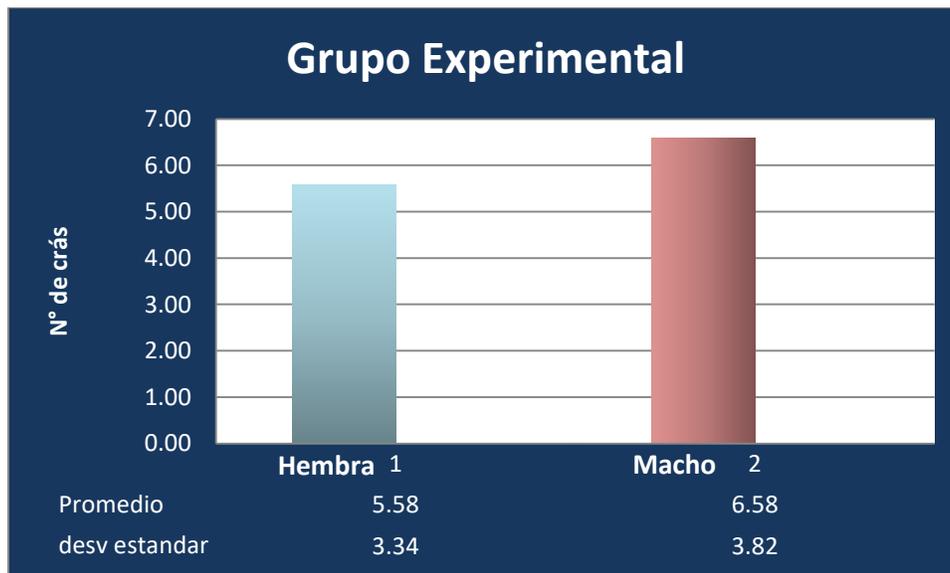


Figura 34. Promedio de crías hembras y machos obtenidos de cada hembra gestante en el grupo experimental.

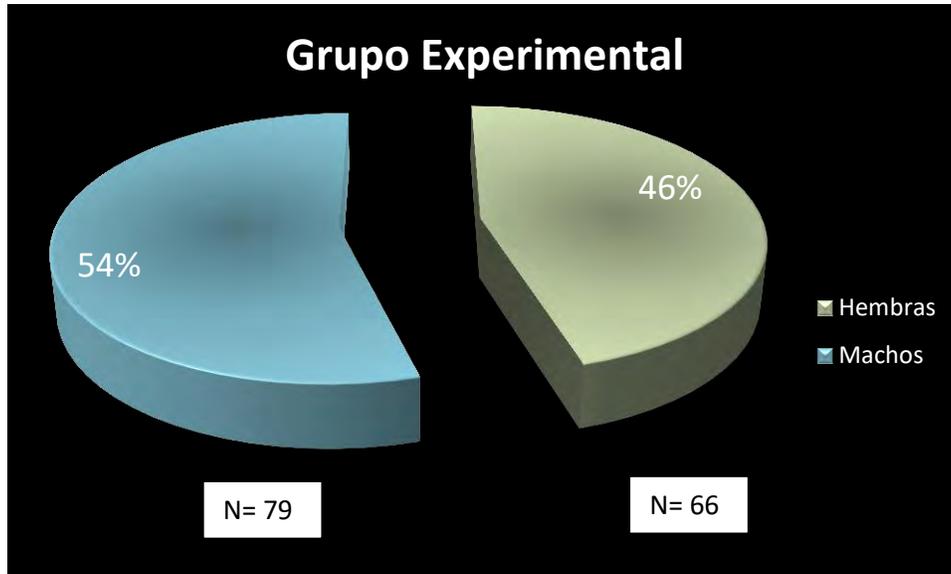


Figura 35. Cantidad y porcentaje de crías hembras y machos de *Barisia imbricata* obtenidos en el grupo experimental.

- Grupo control antes del PCDS.

En el presente grupo se obtuvo un total de 26 crías de las cuales 14 fueron hembras y 12 machos (figura 36), el promedio de proporción sexual de las crías nacidas fue equilibrado (figura 37).

El promedio de temperatura ambiental registrada por el datalogger durante los meses de gestación fue de 18.01 ± 6.2 °C (cuadro 4).

La prueba estadística de Mann-Whitney dio una p de 0.772 por lo que no se encontró algún sesgo de la proporción sexual en este grupo que termorregulo libre en semicautiverio antes del PCDS.

Mes	Temp. Max.	Temp. Min.	Promedio Temp.
Noviembre	33.80	5.60	15.13 ± 5.45
Diciembre	29.2	6.2	15.95 ± 5.58
Enero	30.6	4	14.72 ± 6.28
Febrero	32	6.6	17.53 ± 6.27
Marzo	30.7	7.7	17.16 ± 5.60
Abril	33.2	7.6	19.39 ± 5.87
Mayo	39.1	12.3	21.70 ± 6.26
Junio	43.2	10.5	22.50 ± 8.67
Promedio	33.98	7.56	18.01 ± 6.25

Cuadro 4. Temperatura ambiental en el grupo antes del PCDS durante los meses de gestación de *Barisia imbricata*.

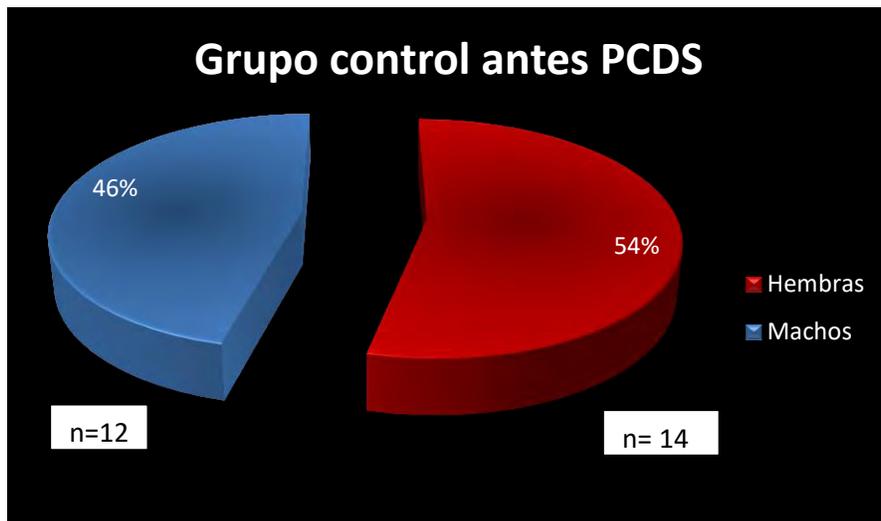


Figura 36. Cantidad y porcentaje de crías hembras y machos por hembra gestante del grupo antes del PCDS

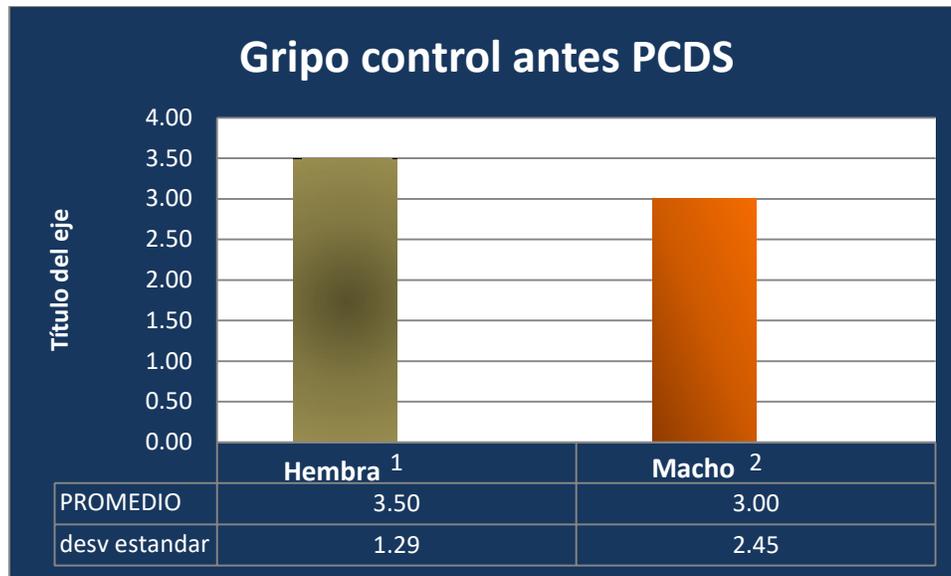


Figura 37. Media y desviación estándar de la proporción sexual en las crías de las hembra gestantes del grupo antes PCDS.

- Grupo control después del PCDS.

En el presente grupo las hembras gestantes tuvieron un total de 98 crías de las cuales 48 fueron machos y 50 hembras (figura 38).

El promedio de crías hembras y machos nacidas por cada hembra gestante fue equitativo (figura 39).

La prueba de Mann-Whitney nos indicó que la proporción sexual en este grupo que termorregulo libremente en el campo (promedio de temperatura ambiental de 23.9 ± 2.3 °C durante la gestación) (CONAGUA, 2010) fue equilibrada con una p de 1.0.

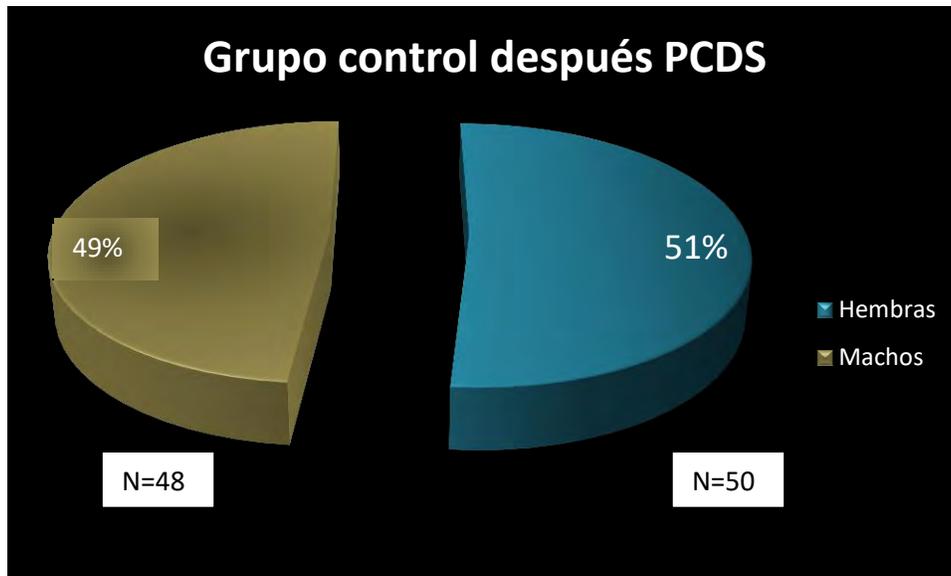


Figura 38. Número y porcentaje de hembras y machos del grupo después del PCDS.

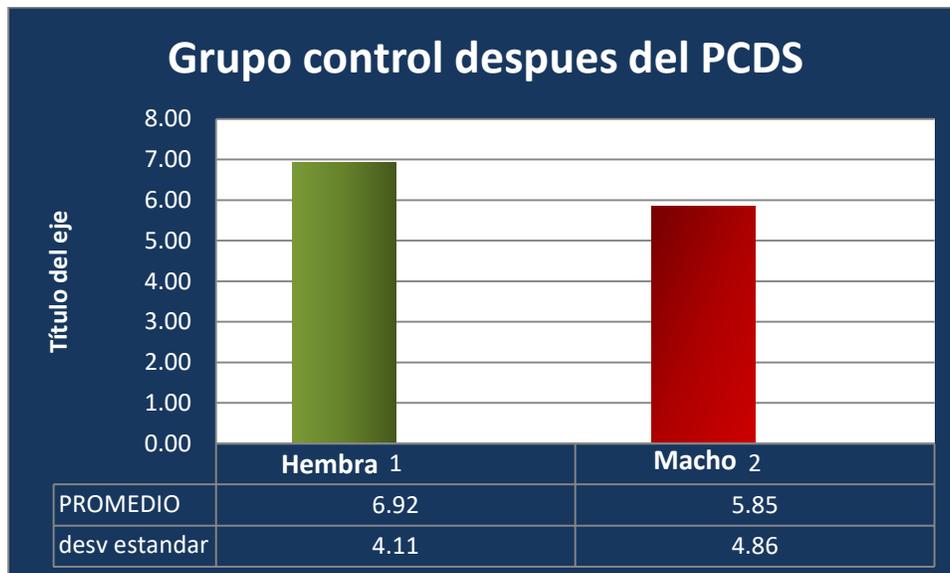


Figura 39. Media y desviación estándar del grupo después del PCDS.

Al realizar la prueba de ANOVA de un factor con un 95 % de confiabilidad, el valor estadístico de F fue 0.07 por lo que se acepta la hipótesis nula de que los promedios de proporción sexual en el grupo experimental, grupo antes del PCDS y el grupos después del PCDS no difieren significativamente, (como también se puede apreciar en el cuadro 5).

	Promedio Temp. amb.	Total hembras	Total machos	% hembras	% machos	\bar{X} hembras nacidas por madre	\bar{X} machos nacidos por madre
Experimento	32 ± 1 °C	66	79	46%	54%	5.58 ± 3.34	6.58 ± 3.82
Control antes PCDS	18.01 ± 6.2 °C	14	12	54%	46%	3.5 ± 1.29	3 ± 2.45
Control despues PCDS	23.9 ± 2.3 °C	50	48	51%	49%	6.92 ± 4.11	5.85 ± 4.86

Cuadro 5. Proporción sexual de los tres grupos trabajados.

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

9.1 Cromosómico.

El cariotipo de hembras y machos de *Barisia imbricata* es un número diploide ($2n = 48$) y difiere al de otros saurios de la misma familia Anguidae; *Ophiodes intermedius* y *Ophiodes striatus* al tener un número diploide de 36 cromosomas, con 12 macrocromosomas y 24 microcromosomas, metacéntricos y submetacéntricos y sin cromosomas sexuales heteromorficos al igual que *Barisia imbricata* (Hernando, 2002) sin embargo, Olmo (1986) menciona que en la familia Anguidae los números diploides varían de 30 a 48 cromosomas por lo que coincide con nuestros resultados.

Por otro lado, en otras familias de saurios se presenta un amplio rango de números diploides por ejemplo, en la familia Gekkonidae el numero diploides varía entre $2n = 16$ y $2n = 48$, algunos miembros de esta familia con cromosomas de tipo sexual (Olmo, 1986). En los scíncidos los cromosomas sexuales son raros aunque se han descrito los sistemas XX/XY con subtipos de cromosomas sexuales (Wright, 1973) por el contrario, Gorman (1973), menciona que el cariotipo de algunos iguánidos es altamente conservado $2n = 36$ con 6 pares de macrocromosomas metacéntricos y submetacentricos y 12 pares de microcromosomas sin encontrar de tipo sexual, el mismo autor menciona que este patrón se encuentra también en las familia Chamaeleontidae, Gerrhosauridae, Anguidae, Amphisbaenidae y Agamidae, otras familias de saurios con cariotipo altamente conservada son las citadas por Sites y sus colaboradores (1992), en la

familia Phrynosomatidae con $2n = 34$ a excepción de algunas especies del género *Sceloporus* (*S. grammicus* $2n = 32$ en hembras, $2n = 31$ en machos; *S. torquatus* $2n = 32$ en machos).

Al no identificar cromosomas de tipo sexual se pensó de manera inicial que el mecanismo de determinación del sexo dependía de la temperatura, como ocurre en otras especies de saurios vivíparos como *Niveosincus ocellatus* (familia: Scincidae) (Wapstra, 2004) y *Eremias multiocellata* (familia: Lacertidae) (Xiao-Long y col., 2012) sin embargo, nuestros resultados con una temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ no demostraron efecto de sesgo de la proporción sexual de la camada.

A pesar de no encontrarse cromosomas sexuales heteromórficos en ninguno de los sexos de *Barisia imbricata* no se descarta la posibilidad de encontrarse regiones en algún cromosoma con genes específicos para la determinación del sexo (cromosomas sexuales homomórficos) y que no sean posibles identificarlos por diferencia en el tamaño del cromosoma que lo porta y/o posición del centrómero si no que se necesiten de técnicas citológicas más avanzadas (Bull, 1983; Solari, 1994; Devlin y Nagahama, 2002).

La teoría evolutiva desarrollada por Charnov y Bull (1977) sugiere que la determinación del sexo ambiental es beneficiosa sobre la determinación cromosómica (DSC) cuando los entornos son irregulares, y hay aptitud diferencial entre los sexos. De igual manera Janzen y Krenz (2004) mencionan que en los reptiles la determinación del sexo por temperatura predomina sobre la cromosómica.

Ya se ha demostrado en el saurio ovíparo *Bassiana duperreyi* que la temperatura se sobrepone para la determinación del sexo a pesar de presentar cromosomas sexuales heteromórficos (Radder y col., 2009).

9.2 Ambiental.

La IPCC (2013) mencionan que la temperatura del aire para finales del siglo XXI probablemente aumente entre 1 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ más caliente que la actual, la temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ se encuentra $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ arriba de las operativas de las hembras gestantes de *Barisia imbricata*, por lo que

se consideraría como una temperatura extrema para ellas pero sin llegar a la muerte de los organismos como lo menciona Villamar (1998).

Esta temperatura operativa extrema no sesgó la proporción sexual, a diferencia de lo observado en un trabajo de Robert (2006), el cual obtuvo una inclinación cada vez más a machos en cuanto la temperatura se elevaba, hasta llegar a un sesgo exclusivo de sólo machos a 32 °C en el eslizón de alta montaña *Eulamprus tympanum* (familia: Scincidae). Sin embargo, sus resultados con el grupo que termoreguló libremente en campo coincide con los resultados en *Barisia imbricata*, con un balance de sexos.

Por otro lado los resultados de Xiao-Long y colaboradores (2012), mencionan que existe una relación entre la temperatura de gestación y la proporción sexual en la lagartija vivípara *Eremias multiocellata* (familia: Lacertidae) con una TPH a 25 °C, TPM a 35 °C; y balance de sexos a 29 y 31 °C, y temperatura pivote a 28.3 °C. El grupo control en este trabajo de hembras que termorregularon libremente en el campo, coincidió con nuestro mismo grupo control al existir un balance de sexos en las crías, no se descarta la posibilidad de encontrar una relación de la temperatura con la proporción sexual en *Barisia imbricata* utilizando diferentes rangos de temperatura.

Los resultados de Florentino-Braña y Xiang-Ji (2000), en la lagartija ovípara *Podarcis muralis* (familia: Lacertidae) también coinciden con los encontrados en *Barisia imbricata* al observar una proporción de sexos igual en todos los tratamientos de temperatura.

Wapstra (2004), encontró que las hembras de la lagartija vivípara *Niveoscincus ocellatus* (familia: Scincidae), sometidas a restricción de la termorregulación (30°C) tenían crías predominantemente machos y las que sí pudieron termoregular tuvieron un 67 % de hembras. Estos resultados difieren con los de *Barisia imbricata* ya que no se observó ningún sesgo de la proporción sexual con y sin restricción de la termorregulación.

Wapstra (2009), observó en campo fluctuaciones de la proporción sexual en *Niveoscincus ocellatus* a lo largo de 7 años de estudio. Por ejemplo hubo una dominancia de machos del 2001 al 2004 y una dominancia de hembras en el 2000 y 2006; y en el año 2007 se obtuvo proporciones sexuales mezclados (prácticamente 50:50). Concluyeron que el ratio sexual en esta especie era dependiente de la temperatura, al observar que sus resultados del ratio sexual variaban dependiendo de los años más o menos cálidos. Él explica que las hembras podrían modificar su comportamiento en base a la estación ya sea reduciendo su toma de asoleo en años más calurosos y en años más fríos aumentan.

Otra posibilidad es que el aumento de temperatura se asocie con el cambio de calendario de eventos reproductivos los cuales contrarresten los efectos térmicos sobre el ratio sexual. Otra opción más, son fluctuaciones en la proporción de sexos a lo largo de la escala evolutiva la cual podría llevar a los embriones a la insensibilidad térmica y, por lo tanto, a la pérdida de DST. No se descarta la posibilidad de que *Barisia imbricata* pudiera llevar acabo alguna de estas estrategias para el balance de la proporción sexual.

Mitchel y colaboradores (2008) demostraron en las tuataras de *Sphenodon guntheri* tienen un sesgo de sólo machos en las temperaturas de anidación más altas y que ese sesgo lo compensan con su comportamiento, moviendo su temporada de anidación (anidando antes conforme el clima se calienta) o anidando en sitios más sombreados.

Fisher (1930), mencionó que los modelos matemáticos predicen que la selección natural estabilizará la proporción de sexos en la población a 1:1. En nuestra especie la relación global de hembras y machos no fue significativamente diferente (167/171 de machos y hembras respectivamente). Bull (1983) por su parte menciona que en las especies con DSC la proporción sexual generalmente es de 1:1 pero, si en la especie la proporción sexual es por múltiples factores la suma de estos factores proporcionarían el sexo de la progenie y descartarían a los cromosomas sexuales, sin embargo son raras las especies que

presentan esta opción probablemente por la evolución inespecífica de este mecanismo.

Para establecer sí el calentamiento global afecta el ratio sexual en *Barisia imbricata* sería necesario realizar un seguimiento a largo plazo de las poblaciones en estado natural para establecer sí muestran patrones que provoquen fluctuaciones del ratio sexual con respecto a la variación de la temperatura. Además establecer cuáles serían las temperaturas umbrales para designar el sexo, sí es que esta especie presentara DST. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de encontrar genes en ciertos cromosomas pero que estos no sean distinguibles como diferencia de tamaño, posición del centrómero y/o tamaño de las cromátidas hermanas del cromosoma que porta tales genes (cromosomas heteromórficos).

La lagartija ovípara *Bassiana duperey*, presenta los dos mecanismos de determinación del sexo (DST y DSC), pero la DST se sobrepone a los cromosomas sexuales, además en esta especie el tamaño del huevo también participa en la designación del sexo, huevos grandes originan hembras, mientras que huevos pequeños dan origen a machos, pero solo si la temperatura de incubación es baja. También se ha observado que los huevos más pequeños presentan mayor concentración de dehidrotestosterona y por ello son más propensos a producir machos (Shine y col., 2002; Radder y col., 2009) este fenómeno de que el mecanismo de DST se sobrepone a la DSC es observada desde peces como en la tilapia *Oreochromis niloticus*, (Jalabert y col., 1974).

Las altas temperatura causadas por el cambio climático han ido aumentando de forma gradual y constante conforme a los años, por lo que las especies podrían haber evolucionado frente a este cambio, Robert (2006) menciona que aquellas especies que no son capaces de evolucionar lo suficientemente rápido para compensar el aumento de temperatura y que este incremento térmico incline su proporción sexual hacia machos, los podrá llevar a su extinción. Por lo que la selección natural podría influir en los saurios frente al cambio climático. Es probable que *Barisia imbricata* ya se encuentre

aclimatada o haya evolucionado a la temperatura extrema (32°C) que se estudió.

Estos resultados son respaldados por los estudios de Etchberger y Nelson (2004), los cuales mencionan que la evolución de las especies frente el cambio climático para la proporción de sexos puede provocar un aumento o disminución de los umbrales de temperatura para determinar el sexo, aunque contradicen la propuesta de Morjan (2003a) el cual sugiere que las temperaturas pivotes son relativamente fijas (Ewert y col., 2004; Doody y col., 2006).

En el trabajo de Radder y colaboradores (2007; 2009), mencionan que la proporción de sexos en la lagartija ovípara *Bassiana duperey*, podría ser influenciada por una combinación tanto de genes, temperatura y hormonas, con esta base podemos decir que los reptiles presentan una gran complejidad en cuanto su mecanismo de determinación del sexo, al tener múltiples factores que actúan de forma directa o indirecta, simultáneamente o en diferentes etapas del desarrollo embrionario.

Barisia imbricata no presento algún sesgo de la proporción sexual en la temperatura de restricción a 32 °C y no hubo diferencias significativas de las medias de proporción sexual en los organismos que termoregularon libremente tanto en campo como en laboratorio, sin embargo no se descarta el hecho de que podrían estar actuando diferentes factores (genéticos, ambientales y/o hormonales) para designar el sexo. Cabe mencionar que no se encontró algún efecto a causa de la temperatura extrema utilizada, como reabsorción de los embriones, este hecho fue constatado contando el número de embriones antes y después de nacer por medio de ultrasonido mensuales y laparatomías (realizadas antes de tomar la decisión de en qué grupo utilizarlo) por lo antes mencionado se podría dar la posibilidad de que esta especie presentara DST sin embargo, se requiere utilizar diferentes rangos de temperaturas de bajas a altas para concluir.

Se recomienda realizar un estudio posterior con un rango de temperatura mayor a 32°C el cual simule lo que se pronostica en el planeta al aumento de temperatura y poder observar y/o predecir como este calentamiento global podría afectar el sexo de la camada de *Barisia imbricata*.

A raíz de los estudios de Robert y Thompson (2001) que descubrieron que la DST no era exclusiva de especies ovíparas, solo se han identificado a 4 especies de saurios vivíparos con DST (*Eulamprus tympanum*, *Eremias multiocellata*, *Niveosincus ocellatus* y *Sphenomorphus indicus*; Robert y Thompson, 2001; 2005; Xiao-Long, 2012; Ji y col., 2006), la cual cada una habita en diferentes condiciones ambientales y su patrón de DST difieren, sin embargo todas coinciden en que son organismos que habitan o se distribuyen en regiones de alta montaña y por consiguiente en climas fríos, al igual de *Barisia imbricata*.

10. CONCLUSIONES.

El cariotipo de *Barisia imbricata* es de $2n= 48$ cromosomas y no se presentaron cromosomas sexuales heteromórficos en ninguno de los dos sexos.

La restricción de la termorregulación en hembras gestantes a una temperatura operativa extrema de 32 °C (conforme a lo que se pronostican acerca del calentamiento global) no demostró efecto de sesgo de la proporción sexual de la camada.

11. PERSPECTIVAS.

Con el fin de ampliar la información acerca del cariotipo de esta especie se recomienda realizar investigaciones encaminadas al análisis cariológico más fino, por medio de una tinción en bandejo para determinar mejor la clasificación de sus cromosomas, además se plantea necesario realizar estudios para identificar genes específicos

en cromosomas homomorficos que participan en la diferenciación gonadal.

La estandarización de la técnica de cultivo de linfocitos adaptada en *Barisia imbricata* resulta una buena opción en saurios para realizar cariotipos sin tener que ser un método destructivo para el organismo ya que en la mayoría de las técnicas requiere de la eutanasia del organismo.

Se recomienda realizar un estudios con diferentes rangos de temperatura (como 22, 24, 26, 28 y 30 °C) para establecer si en esta especie se presenta el mecanismo de determinación del sexo por temperatura. Hasta ahora se desconoce si en *Barisia imbricata* el calentamiento global afectara la proporción sexual pero trabajos futuros en nuestro laboratorio abordarán el tema utilizando temperaturas operativas más extrema para ver el probable efecto del calentamiento global sobre el sexo de la camada y poder así realizar planeaciones de conservación de la especie ya que se ha demostrado que en otros saurios vivíparos temperaturas extremas si afectan el sexo de los críos.

12. LITERATURA CITADA.

- Alderete M R, Tokarz R R y Crews D (1980). Luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone induction of female sexual receptivity in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Neuroendocrinology*, 30, 200–205.
- Austin B H (1988). Differentiation and Development of the Reproductive System in the Iguanid Lizard, *Sceloporus undulatus*. *General and comparative endocrinology*. 12, 351-363.
- Anderson R A y Vitt L J (1990). Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphism in teiidae lizards. *Oecologia*. 84: 145-157.
- Araújo M B, Thuiller W, Pearson R G (2006). Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *Journal of Biogeography* 33, 1712–8.
- Aguilar-Martínez G F (2011). Reporte del tamaño de una camada de *Barisia imbricata* (REPTILIA: ANGUILLAE). *Acta Zoológica Mexicana*. 27: 811-812.
- Arias F (2012). Reproducción sin machos: partenogénesis en lagartijas. *Temas BGNoa*. Vol. 2, Núm. 1.
- Beçak M L, Beçak W y Denaro L (1972). Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25: 313 – 326.
- Bull J J (1980). Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology* 55:3-21.
- Bull J J (1987). Temperature-sensitive periods of sex determination in a lizard: similarities with turtles and crocodylians. *Journal of Experimental Zoology*. 241, 143–148.
- Beuchat C A (1988). Temperature effects during gestation in a viviparous lizard. *Journal of Thermal Biology*. 13:135-142.
- Bull J J, Gutzke W H N y Crews D (1988). Sex reversal by estradiol in three reptilian orders. *General Comparative Endocrinology*. 70, 425–428.
- Bull C M, Pamula Y (1996). Sexually dimorphic head sizes and reproductive success in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *Journal Zoology (Lond)* 240:511–521.

- Borrelli L, Stasio R, Motta C M, Parisi E y Filosa S (2000). Seasonal-dependent effect of temperature on the response of adenylate cyclase to FSH stimulation in the oviparous lizard, *Podarcis sicula*. *Journal of Endocrinology*. 167, 275–280.
- Ball G F y Balthazart J (2002). Neuroendocrine mechanisms regulating reproductive cycles and reproductive behaviors in birds. *Hormones, Brain and Behavior*. pp. 649–798). New York: Academic Press.
- Bull J J (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.
- Bergmann J y Pand - Irschick J D (2005). Effects of Temperature on Maximum Clinging Ability in a Diurnal Gecko: Evidence for a Passive Clinging Mechanism? *Journal of Experimental Zoology*. 303A:785–791.
- Bradshaw W E y Holzapfel C M (2006). Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312, 1477-1478.
- Berg T, Rountree C B, Lee L, Estrada J, Sala FG, y colaboradores (2007). Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via β -catenin activation. *Hepatology* 46: 1187–1197.
- Beck L A, Wade J (2008a). Steroid receptor expression in the developing copulatory system of the green anole lizard (*Anolis carolinensis*). *General and Comparative Endocrinology* 157: 70–74.
- Beck L A, y Wade J (2009b). Morphology and estrogen receptor mRNA expression in the developing green anole forebrain. *Journal of Experimental Zoology*. A., 311A, 162–171.
- Badenhorst D, Stanyon R, Engstrom T y Valenzuela N (2013). A ZZ/ZW microchromosome system in the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera*, reveals an intriguing sex chromosome conservation in Trionychidae. *Chromosome Research*. 21: 137–147.
- Charnier M (1966). Action of temperature on the sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae: Lacertilia) embryo. *C R Science Society Biology Western African*. 160: 620–2.
- Charnov EL, Bull J (1977). When is sex environmentally determined? *Nature*, 266, 828–830.
- Carr J L, Bickham J W (1981). Sex chromosomes of the Asian black pond turtle, *Siebenrockiella crassicolis* (Testudines: Emydidae). *Cytogenetic Cell Genetic*. 31: 178-83.

- Crews D, y Silver R (1985). Reproductive physiology and behavior interactions in nonmammalian vertebrates. In N. Adler, D. Pfaff, & R. W. Goy (Eds.), „Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 7. pp. 101–182.
- Crews D, Bergeron J M, Bull J J, Flores D, Tousignant A, Skipper K J, y Wibbels T (1994). Temperature-Dependent Sex Determination in Reptiles: Proximate Mechanisms, Ultimate Outcomes, and Practical Applications. *Developmental genetics*. 15: 297-312.
- Crews D, Coomber P, Baldwin R, Azad N y Gonzalez-Lima F (1996). Brain organization in a reptile lacking sex chromosomes: Effects of gonadectomy and exogenous testosterone. *Hormones Behavior.*, 30, 474–486.
- Chamaille-Jammes S, Massot M, Aragon P, Clobert J (2006). Global warming and positive fitness response in mountain populations of common lizards *Lacerta vivipara*. *Global Change Biology* 12, 392–402.
- Cárdenas A (2009). México ante el cambio climático. Green Pace México. Informe. 1-72.
- Cadby C D, While M G, Hobday J A, Uller T y Wapstra E (2010). Multi-scale approach to understanding climate effects on offspring size at birth and date of birth in a reptile. *Integrative Zoology*; 5: 164-175.
- CONAGUA (2010). Servicio Meteorológico Nacional. <http://200.4.8.20/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=mex>.
- Dafaure J P y Hubert J (1961). Table de developpement du lezard vivipare: *Lacerta (zootoca) vivipara Jacquin*. *Archives Anatomique Microscopie Morphology and Experimental*. 50: 309-327.
- Doriaei M, Mignut T M, Guichard A; Desavages G y Pieau C (1991). Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. *Differentiation* 47:9-17.
- De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and Steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol*. 18:6653–65.
- Devlin R H y Nagahama Y (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191–367.
- Deutsch C A, Tewksbury J J, Huey R B, Sheldon K S, Ghalambor C K, Haak D C, y colaboradores (2008). Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *PNAS*. 105: 6668–6672. doi: 10.1073/pnas.0709472105 PMID: 184583.

- Du W G, Lu Y W, Shen J Y (2005). The influence of maternal thermal environments on reproductive traits and hatchling traits in a lacertid lizard, *Takydromus septentrionalis*. *Journal of Thermal Biology* 30, 153–61.
- Du W G y Shine R (2010). Why do the eggs of lizards (*Bassiana duperreyi*: Scincidae) hatch sooner if incubated at fluctuating rather than constant temperatures? *Biological Journal of the Linnean Society*. 101, 642-650.
- Duarte H, Tejedo M, Katzenberger M, Marangoni F, Baldo D, Beltrán J F y col., (2012). Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Glob Change Biol*. 18: 412–421.
- Dashevsky D, Meik J M, Mociño-Deloya E, Setser K y Schaack S (2013). Patterns of sexual dimorphism in Mexican alligator lizards, *Barisia imbricata*. *Ecology Evolution*. 3: 255–261.
- Darevsky I S (1966). Natural Parthenogenesis in a Polymorphic Group of Caucasian Rock Lizards Related to *Lacerta saxicola* Eversmann. *Journal of the Ohio Herpetological Society* Vol. 5, No. 4, pp. 115-152.
- Ewert M A y Nelson C E (1991). Sex determination in turtles: Diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia* 1991:50-69.
- Ewert, M A, Etchberger C R y Nelson C E (2004). Turtle sex-determining modes and TSD patterns. *Temperature-dependent Sex Determination in Vertebrates*. eds N. Valenzuela & V. Lance. Smithsonian Books, Washington, DC pp. 21–32.
- Ezaz T, Quinn A E, Miura I, Sarre S D, Georges A y Marshall Graves J A (2005). The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research*. 13: 763-776.
- Ezaz T, Valenzuela N, Grutzner F, Miura L, Georges A, Burke R L y Marshall-Graves J A (2006). An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosome Research*. 14: 139–150.
- Ezaz T, Sarre S D, O'Meally D, Marshall J A y Georges A (2009). Sex Chromosome Evolution in Lizards: Independent Origins and Rapid Transitions. *Cytogenetic and Genome Research*. 127: 249–260.
- Ezaz T, Bhumika A, O'Meally D, Young J M, Kazumi M J, Edwards M J, Zhang - Xiuwen, Holleley E C, Deakin E J, Marshall - Graves J A, Georges A, Edwards V S y Sarre D S (2013). Sequence and gene content of a large fragment of a lizard sex chromosome and evaluation of candidate sex differentiating gene R-spondin. *BMC Genomics*.14: 899.

- Edwards V S y Sarre D S (2013). Sequence and gene content of a large fragment of a lizard sex chromosome and evaluation of candidate sex differentiating gene R-spondin. *BMC Genomics*.14: 899.
- Fisher R A (1930). *The genetical theory of natural selection*. New York: Dover.
- Flores D L y Crews D (1995). Effect of hormonal manipulation on socio sexual behavior in adult female leopard geckos (*Eublepharis macularius*), a species with temperature-dependent sex determination .
- Hormones and Behavior. 29, 458–473.
- Florentino-Braña y Xiang-Ji (2000). Influence of Incubation Temperature on Morphology, Locomotor Performance, and Early Growth of Hatchling Wall Lizards (*Podarcis muralis*). *Journal of Experimental Zoology*. 286:422–433.
- Ferguson-Smith M (2007). The Evolution of Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates and the Key Role of DMRT. *Sexual Developmental*. 1: 2–11.
- Gorman G C (1973). The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation, in Chiarelli AB, Capanna E (eds). *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*, pp 348-424.
- Greenberg N, Scott M, y Crews D (1984). Role of the amygdala in the reproductive and aggressive behavior of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Physiology & Behavior*., 32, 147–151.
- Guillete L J. y Casas-Andreu (1987). The reproductive biology of high elevation Mexican lizard *Barisia imbricata*. *Herpetological*. 43: 29-38.
- Graves J A M, Shetty S (2000). The Evolution of Sex Chromosomes in Higher Vertebrates. *Comparative Genomics*, pp 153–205
- Greenbaum E, Carr J L (2001). Sexual differentiation in the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*), a species with genetic sex determination. *Journal of Experimental Zoology*. 290:190–200.
- Gardner J L, Peters A, Kearney M R, Joseph L Heinsohn R (2011). Declining body size: a third universal response to warming? *Trends in Ecology & Evolution* 26, 285–91.
- Gredler L M, Sanger J T y Cohn J M (2014). Development of the Cloaca, Hemipenes, and Hemiclitores in the Green Anole, *Anolis carolinensis*. *Sexual development*.
- Gutzke W H N y Crews D (1988). Embryonic temperature determines adult sexuality in a reptile. *NATURE*. Vol.332. 28.

- Goodson J L (2005). The vertebrate social behavior network: Evolutionary themes and variations. *Hormones and Behavior*. 48, 11–22.
- Goodman M R y Walguarnery W J (2007). Incubation Temperature Modifies Neonatal Thermoregulation in the Lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of Experimental Zoology*. 307A:439–448.
- Hanks J H (1948). The longevity of chick tissue cultures without renewal of mediuiyi. Longevity of chick tissue cultures.
- Huey B R y Stlatkin M (1976). Cost and Benefits of Lizard Thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology* Vol. 51, No. 3 pp. 363-384.
- Hews D K y Moore M C (1995). Influence of androgens on differentiation of secondary sex characters in tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and Comparative Endocrinology*. 97, 86–102.
- Hughes L (2000). Biological consequences of global warming: Is the signal already apparent? *Trends in Ecology and Evolution* 15, pp. 56–61.
- Hernando A (2002). Caracterización cromosómica de *Ophiodes intermedius* (Sauria: Anguidae). *FACENA* 18: 31-34.
- Hare K M, Daugherty C H y Cree A (2002). Incubation regime affects juvenile morphology and hatching success, but not sex, of the oviparous lizard *Oligosoma suteri*. *New Zeal. Journal of Zoology*. 29, 221-229
- Hamilton P S y Sullivan B K (2005). Female mate attraction in ornate tree lizards, *Urosaurus ornatus*: A multivariate analysis. *Animal Behaviour*. 69: 219-224.
- Holmes M M, Wade J (2005). Sexual differentiation of the copulatory neuromuscular system in green anoles (*Anolis carolinensis*): normal ontogeny and manipulation of steroid hormones. *Journal Comparative Neurology*. 489: 480–490.
- Hickling R, Roy D B, Hill J K, Fox R, Thomas C D (2006). The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. *Global Change Biology* 12, 450–55.
- Husak J F y Fox S F (2008). Sexual selection on locomotor performance. *Evolutionary Ecology Research*. 10: 213-228.
- Hall P W (2009). Chromosome variation, genomics, speciation and evolution in *Sceloporus* lizards. *Cytogenetic Genome Research*.
- Herrel A, Moore J A, Bredeweg E M, Nelson N J (2010). Sexual dimorphism, body size, bite force and male mating success in tuatara. *Biological Journal of the Linnean Society* 100:287–292.

- Hare M K, Yeong C, and Cree A (2011). Does Gestational Temperature or Prenatal Sex Ratio Influence Development of Sexual Dimorphism in a Viviparous Skink? *Journal of Experimental Zoology*. 315:215–221.
- Hare M K y Cree A (2011). Does Gestational Temperature or Prenatal Sex Ratio Influence Development of Sexual Dimorphism in a Viviparous Skink? *J. Exp. Zool.* 315:215–221.
- Hongliang L U, Wang Y, Tang W y Du W (2013). Experimental evaluation of reproductive response to climate warming in an oviparous skink. *Integrative Zoology*; 8: 175–183.
- Herrera A M, Shuster S G, Perriton C L, Cohn M J (2013). Developmental basis of phallus reduction during bird evolution. *Current Biology* 23: 1065–1074.
- Informe climatológico del valle de México (2006). Gobierno del Distrito Federal. Secretaria del Medio Ambiente.
- IPCC (2007). *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation, and Vulnerability*. Cambridge: Cambridge University Press. <http://www.ipcc.ch/>
- Inamdar L S (Doddamani), Vani V y Seshagiri P V (2012). A Tropical Oviparous Lizard, *Calotes versicolor*, Exhibiting a Potentially Novel FMFM Pattern of Temperature-Dependent Sex Determination. *Journal of Experimental Zoology*. 317:32–46.
- IPCC (2013) (eds Stocker TF, Qin D, Plattner GK y col.). *Climate Change 2013. The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge
- INEGI (2015). www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/df/territorio/clima.aspx?
- Jalabert B J, Moreau P Planquette y Billard R (1974). De`terminisme du sexe chez *Tilapia macrochir* et *Tilapia nilotica*: action de la me`thyltestoste´rone dans l'alimentation des alevins sur la differentiation sexuelle; proportion des sexes dans la descendance des "males inverses." *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* 14:729–739.
- Janzen F J y Paukstis G I (1991). Environmental sex determination in reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. *The Quarterly Review of Biology*. 66:149-179.
- Janzen, F.J (1994). Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91, 7487–7490.

- Jeyasuria P, Place A R (1998). Embryonic brain-gonadal axis intertemperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *Journal of Experimental Zoology*. 281,428–449.
- Josso N, di Clemente N, Gouédard L (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 179:25–32.
- Janzen F J, Krenz J G (2004). Phylogenetics. In: Which was First, TSD or GSD? In: *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates* (eds Valenzuela N, Lance VA), pp. 121–130.
- Ji X, Lin L H, Luo L G, Lu H L, Gao J F y Han J (2006). Gestation temperature sexual phenotype, morphology, locomotor performance, and growth of neonatal brown forest skinks, *Sphenomorphus indicus*. *Biological Journal of the Linnean Society*. 88, 453–463.
- Kelly D A (2002). The functional morphology of penile erection: tissue designs for increasing and maintaining stiffness. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 216–221.
- Kearney M, Shine R, Porter W P (2009). The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *PNAS*.106: 3835–3840. doi: 10.1073/pnas.0808913106 PMID: 19234117.
- Koopman P (2009). Sex determination: the power of DMRT1. *Trends in Genetics* .25:11.
- Kingsolver J G, Diamond S E, Buckley L B (2013). Heat stress and the fitness consequences of climate change for terrestrial ectotherms. *Functional Ecology*. 27: 1415–1423.
- Luckett W P (1977). Ontogeny of amniote fetal membranes and their application to phylogeny. In: *Major Patterns in vertebrate evolution*. Plenum Press. Pp. 439-516.
- Lang W J, Andrews H y Whitaker R (1989). Sex Determination and Sex Ratios in *Crocodylus palustris*. *American Society Zoologist*. Vol 29. Pp 935-952.
- Lang W J, Andrews H (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology* Vol 270. pp 28–44.
- Lovern M B y Wade J (2001). Maternal plasma and egg yolk testosterone concentrations during embryonic development in green anoles (*Anolis carolinensis*). *General and Comparative Endocrinology*. 124, 226–235.
- Lance, V A., Holt, W.V., Pickard A R., Rodger J C, y Wildt D E. (2003). Reptile reproduction and endocrinology. In *Reproductive Science and Integrated Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 338–358.

- Lovern M B y Wade J (2003). Yolk testosterone varies with sex in eggs of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Journal of Experimental. Zoology*, 295A 206–210.
- Loffler K A, Zarkower D, Koopman P (2003). Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* .144:3237–43.
- Lourdais O, Shine R, Bonnet X, Guillon M, Naulleau G (2004). Climate affects embryonic development in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos* 104, 551–60.
- Ludbrook L M y Harley V R (2004). Sex determination: a „window“ of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab.*15:116–21
- Leonard J L, Cordoba-Aguilar A (2010). *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals* (Oxford University Press, New York).
- Merchant-Larios H, Fierro I V, Urruiza B C (1989): Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *herpetological monograph*. 3:43-61.
- Martínez-Torres M (1997). Placentación y participación del cuerpo lúteo en el mantenimiento de la gestación de *Barisia imbricata* - una perspectiva evolutiva (REPTILIA: ANGUIDAE). Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias.
- Moreno-Mendoza M, Harley V R y Merchant-Larios H (1999). Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* at Male- or Female-Promoting Temperatures. *Journal of Experimental Zoology*. 284: 705–710.
- Marshall - Graves y Swathi-Shetty (2001). Sex from W to Z: Evolution of Vertebrate Sex Chromosomes and Sex Determining Genes. *Journal of Experimental Zoology*. 290:449–462.
- Martínez-Torres M, Hernández-Caballero M E, Alvarez-Rodriguez C, Luis - Díaz J A, y Ortiz-López G (2003). Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). *General and Comparative Endocrinology*. 132: 55–65.
- Morjan C L. (2003a). How rapidly can maternal behavior affecting primary sex ratio evolve in reptile with environmental sex determination? *American Naturalist*, 162, 205–219.
- Morjan C L (2003b). Variation in nesting patterns affecting nest temperatures in two populations of painted turtles (*Chrysemys picta*) with temperature dependent sex determination. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 153, 254–261.

- Manfred-Schartl (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Genomes and Evolution*. 14: 634–64.
- Martínez y Fernández (2004). Secretaria del medio ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de ecología.
- Miller D, Summers J, y Silber S (2004). Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction? *Fertility and Sterility*. 81: 4.
- Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, Kuroiwa A, Yamada K, Isobe T (2005). Highly conserved linkage homology between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Research*. 13: 601–615.
- Martínez-Torres M, Guzmán-Rodríguez R, Cárdenas-León M y Brunner-Reynaldo N (2006). Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous lizard *Barisia Imbricata* (REPTILIA: ANGUIDAE). *The southwestern naturalist*. 51: 401-406.
- Miles D B, Sinervo B, Hazard L C, Svensson E I, y Costa D (2007). Relating endocrinology, physiology, and behaviour using species with alternative mating strategies. *Functional Ecology*. 21, 653–665.
- Marquis O, Massot M, Le Galliard J F (2008). Intergenerational effects of climate generate cohort variation in lizard reproductive performance. *Ecology* 89, 2575–83.
- Martínez-Torres M, Amado-Piña J J, Rubio-Morales B (2012). Diferenciación gonadal de la lagartija vivípara *Barisia imbricata*. Doceava Reunión Nacional de Herpetología, Chiapas México.
- Martínez-Torres M, Rubio Morales B. Amado Piña J J, y Luis J (2015). Hemipenes in females of the Mexican viviparous lizard *Barisia imbricata* (SQUAMATA: ANGUIDAE): an example of heterochrony in sexual development. *Evolution and Development*.
- Naciones Unidas (1992). Convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático.
- Norris O D y López H K (2011). Hormones and Reproduction of Vertebrates. ELSEVIER. Volumen 3 Reptiles.
- Neaves I, Wapstra E, Birch D, Girling E J y Joss J M (2006). Embryonic Gonadal and Sexual Organ Development in a Small Viviparous Skink, *Niveoscincus ocellatus*. *Journal of Experimental Zoology*. 305A:74–82.
- Ohno S (1967). Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Olmo, E (1986). Reptilia, in John, B. (ed.), Animal Cytogenetics. Vol. 4 Chordata 3. Berlin Gebrüder Borntraeger. pp. 1- 100.
- Ospina-Alvarez N, Piferrer F (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. PLoS ONE, 7, e2837
- Pieau C. (1973). Variation de l'activité enzymatique 5-3 β -hydroxystéroïde deshydrogénasique dans les glandes génitales d'embryons d'*Emys orbicularis* L. (Chelonien), en fonction de la température d'incubation. CR Hebd Sen Acad Sci Paris Ser D 276:197-200.
- Pieau C. (1978). Effets de températures d'incubation basses et Elevées sur la différenciation sexuelle chez des embryons d' *Emys orbicularis* L. (Chelonien). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris, serie D. 286. 121-124.
- Pieau C y Dorizzi M (1981). Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in the embryos of the turtles, *Emys orbicularis*. Journal Morphology. 170, 373–382.
- Phillips J A, Garel A, Packard G C, Packard M J (1990). Influence of moisture and temperature on eggs and embryos of green iguanas (*Iguana iguana*). Herpetologica 46: 238-245.
- Pieau C, Girondot M, Desvages G, Dorizzi M., Richard - Mercier N y Zaborski P (1994). Environmental control of gonadal differentiation. In Short RV, Balaban E. "The Differences Between the Sexes." Cambridge: Cambridge University Press. 433-448.
- Parmesan C, Ryrholm N, Stefanescu C y col. (1999). Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. Nature 399, 579–83.
- Pieau C, Dorizzi M y Richard-Mercier N (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences. 5. 887–900.
- Place A R, y Lance V A (2004). The temperature-dependent sex determination drama: same case, different stars. „Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates“. pp. 99–110. Washington DC: Smithsonian Institution Press.
- Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith M A, Rens W y Kratochvíl L (2010). Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. Chromosome Research.18: 809–820.

- Pacifici M, Foden W B, Visconti P, Watson J E M, Butchart S H M, Kovacs K M y colaboradores (2015). Assessing species vulnerability to climate change. *Nature Climate Change*. 5: 215–224.
- Quinn E A, Georges A, Sarre D S, Guárico F, Ezaz T y Marshall Graves J A (2007). Temperature Sex Reversal Implies Sex Gene Dosage in a Reptiles. *Science*. 316: 411.
- Raynaud A, Pieau C (1985). Embryonic development of the genital system. In: Gans C, Billet F, editors. *Biology of reptiles*, Vol. 15. New York: Liss. p 149–301.
- Rimblot F, Fretey J, Mrosovsky N, Lescure J y Pieau C (1985). Sexual differentiation as a function of the incubation temperature of eggs in the sea-turtle *Dermochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Amphibia-Reptilia* 6: 83–92.
- Rincon – Gutiérrez P (2007). Origen del calentamiento global. Tesis para obtener el título de maestría en educación. Universidad de los Andes – Táchira.
- Rhen T y Crews D (1999). Embryonic temperature and gonadal sex organize male-typical sexual and aggressive behavior in a lizard with temperature-dependent sex determination. *Endocrinology*, 140, 4501–4508.
- Robert K A y Thompson M B (2001). Sex determination: Viviparous lizard selects sex of embryos. *Nature*. 412: 698.
- Rosen G J, O'Bryant E L, Matthews J, Zacharewski T y Wade J (2002). Distribution of androgen receptor mRNA expression and immunoreactivity in the brain of the green anole lizard. *Journal of Neuroendocrinology*. 14, 19–28.
- Rey R, Lukas - Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P (2003). AMH/MIS: What we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 211: 21–31
- Robert K A, Thompson M B y Seebacher F (2005). Thermal biology of a viviparous lizard with temperature - dependant sex determination. *Journal of Thermal Biology*. 31: 292–30.
- Radder R S, Quinn A E, Georges A, Sarre S y Shine R (2007). Genetic evidence for co -occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biology Letters*. 4. 176–178.
- Ramsey M y Crews D (2007). Steroid signaling system responds differently to temperature and hormone manipulation in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*), a reptile with temperature dependent sex determination. *Sexual Developmental*. 1, 181–196.
- Radder R S, Pike D A, Quinn A E y Shine R (2009). Offspring sex in a lizard depends on egg size. *Current Biology*. 19. 1102–1105. (1989). Ecological causes

for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. *Quarterly Review of Biology*. 64(4):419-61.

- Shine R (1989). Constraints, Allometry, and Adaptation: Food Habits and Reproductive Biology of Australian Brown snakes (*Pseudonaja*: Elapidae). *Herpetological*. Vol. 45, No 2. Pp. 195-207.
- Sites J W, Archie J W, Cole C J y Flores-Villela O (1992). A review of phylogenetic hypotheses for lizards of the genus *Sceloporus* (Phrynosomatidae): Implications for ecological and evolutionary studies. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 213:1-110 (1992).
- Smith C A, Joss J M P (1993). Gonadal sex differentiation in Alligator mississippiensis, a species with temperature dependent sex determination. *Cell Tissue Res* 273:149–162.
- Solari A J (1994). Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. CRC, Boca Raton, Fla.
- Salame-Méndez A y Villalpando-Fierro (1998). La diferenciación sexual en vertebrados: Hipótesis y teorías. *Acta Zoológica Mexicana*. 73: 89-110.
- Shine R y Harlow P (1993). Maternal thermoregulation influences offspring viability in a viviparous lizard. *Oecologia* 96,122–127.
- Shine R, Elphick M J y Harlow P S (1997). The influence of natural incubation environments on the phenotypic traits of hatchling lizards. *Ecology* 78, 2559-2568.
- Spotila L D, Spotila J R, Hall S E (1998). Sequence and expression analysis of *Wt1* and *Sox9* in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology*. 281:417–27.
- Sreenivasulu K, Ganesh S, Raman R (2002). Evolutionarily conserved, *DMRT1*, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor*. *Mechanisms of Development*. 119(S1):S55–64.
- Sakata J T y Crews D (2004). Developmental sculpting of social phenotype and plasticity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 28, 95 – 112.
- SMAGDF (2008). Inventario de emisiones de Gases de Efecto Invernadero de la Zona Metropolitana del Valle de México 2006. México.

- Shoemaker M C y Crews D (2009). Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20: 293–303.
- Sinervo B, Méndez-de-la-Cruz, F, Miles D B, Heulin B, Bastiaans E, Villagrán-Santa Cruz M, Lara-Resendiz R, Martínez-Méndez, N, Calderon-Espinosa M L, Meza-Lázaro R N Jr y colaboradores (2010). Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science* 328, 894-899.
- Silva T L, Silva M I A, Venancio L.P.R, Zago C E S, Moscheta V A G, Lima A V M, Vizotto L D, Santos J R, Bonini- Domingos C R y Azeredo - Oliveira M T V (2011) *Genetics and Molecular Research*. 10: 3020-3025.
- Santidrian-Tomillo P, Meritxell-Genovart¹, Paladino F, Spotila R (2015) J y Oro D. 2015. Climate change overruns resilience conferred by temperature-dependent sex determination in sea turtles and threatens their survival. *Global Change Biology*. 21, 2980–2988.
- Thomas E O, Licht P, Wibbels T, Crews (1992): Development of hydroxysteroid dehydrogenase activity in sexually undifferentiated and differentiated embryos of the turtle *Trachemys (Pseudemys) scripta*. *Biology of Reproduction*. 46:140-145.
- Thomas C D, Cameron A, Green R E, Bakkenes M, Beaumont L J, Collingham Y C y colaboradores (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*. 427: 145–148.
- Tang-Xiao L, Yue-Fen, Yan-Feng X, Zhang De-Jiu, Xin-Ying, Wang-Cui y Che-Qiang (2012). Effects of gestation temperature on offspring sex and maternal reproduction in a viviparous lizard (*Eremias multiocellata*) living a thigh altitude. *Journal of Ternal Biology*. 37: 438–444.
- Ulsh B A, Congdon J D, Hinton T G y Whicker F W (2000a). Culture methods for turtle lymphocytes. *Methods in Cell Science*. 22: 285-297.
- Ulsh B A, Muhlmann-Diaz M C, Whicker F W y Hinton T G (2000b). Chromosome translocations in turtles: a biomarker in a sentinel animal for ecological dosimetry. *Radiation Research*. 153: 752-759.
- Uller T y Olsson M (2003). Prenatal Sex Ratios Influence Sexual Dimorphism in a Reptile. *Journal of Experimental Zoology*. 295A:183–187.
- Uller T, Massot M, Richard M, Comte J L, Clobert J (2004). Longlasting fitness consequences of prenatal sex ratio in a viviparous lizard. *Evolution* 58:2511–2516.
- Villamar-Duque (1998). Contribución al conocimiento de las preferencias térmicas en Anguidos (REPTILIA: SAURIA). Tesis para obtener el título de Biólogo.
- Valenzuela N (2008). Relic thermosensitive gene expression in a turtle with genotypic sex determination. *BioOne*. 1: 234-240.

- Valleley E M A, Cartwright E J, Croft N J, Marchan A F y Coletta P L (2001). Characterisation and Expression of Sox9 in the Leopard Gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology*. 291: 85–91.
- Valencia - Limón E R, Castro-Franco R y Bustos-Zagal M G (2014). Dimorfismo sexual y ciclo reproductor de *Sceloporus horridus horridus* (wiegmann 1939) (sauria: phrynosomatidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 30 (1): 91-105.
- Wright J (1973). Evolution of the X1X2Y sex chromosome mechanism in the scincid lizard *Scincella laterale* (Say). *Chromosoma (Berl.)* 43: 101- 108.
- Wibbels T, Bull J J, Crews D. (1991). Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *The Journal of Experimental Zoology*. 260:371-381.
- Wibbels T, Bull J J y Crews D (1991). Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination? *The Journal of Experimental Zoology*. 260: 130-134.
- White R B, Thomas P (1992). Adrenal-kidney and gonadal steroidogenesis during sexual differentiation of a reptile with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology*. 88: IO-19.
- White R B, Thomas P B (1992). Stimulation of in vitro steroidogenesis by pituitary hormones in a turtle (*Trachemys scripta* within the temperature-sensitive period for sex determination. *Biological Reproduction*. 47:952-959.
- Wibbels T, Bull J J y Crews D (1992). Hormone-induced sex determination in an amniotic vertebrate. *Journal of Experimental Zoology*. 262: 454-457.
- Wibbels T, Crews D (1992). Specificity of steroid hormone-induced sex determination in a turtle. *Journal Endocrinology*. 133: 121-129.
- Wade J, Huang J M y Crews D (1993). Hormonal control of sex differences in the brain, behavior and accessory sex structures of whiptail lizards (*Cnemidophorus* species). *Journal of Neuro endocrinology*, 5, 81–93.
- Wibbelst, Cowan J y Leboeuf R (1998). Temperature-Dependent Sex Determination in the Red-Eared Slider Turtle, *Trachemys scripta*. *The Journal of Experimental Zoology*. 281: 409–416.
- Winkler S W y Wade J (1998). Aromatase activity and regulation of sexual behaviors in the green anole lizard. *Physiology & Behavior.*, 64, 723–731.

- Western P S, Harry J L, Graves J A M, Sinclair A H (2000). Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene*. 241:223–32.
- Western P S y Sinclair A H (2001). Sex, Genes, and Heat: Triggers of Diversity. *Journal of Experimental Zoology*. 290: 624–631.
- Walther R C, Post E, Convey P y col. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389–95.
- Wapstra E, Olsson M, Shine R, Edwards A, Swain R y Joss M P J (2004). Maternal basking behaviour determines offspring sex in a viviparous reptile. *Biology Letters*. The Royal Society. 271, S230–S232.
- Weiss S L y Moo (2004). Activation of aggressive behavior by progesterone and testosterone in male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and Comparative Endocrinology*. 136, 282–288.
- Warner A D, Shine R (2005). The adaptive significance of temperature-dependent sex determination: experimental tests with a short-lived lizard. *Evolution*, 59(10), pp. 2209–2221.
- Woolrich-Piña G A, Lemos-Espinal J A, Oliver-López I, Calderón Méndez M E, González-Espinoza J E, Correa-Sánchez y Montoya Ayala R (2006). Ecología térmica de una población de la lagartija *Sceloporus grammicus* (iguaniae: phrynosomatinae) que ocurre en la zona centro-oriente de la Ciudad de México. *Acta Zoológica Mexicana* 22(2): 137-15.
- Wapstra E, Uller T, Sinn L D, Olsson M, Mazurek K, Joss J y Shine R (2009). Climate effects on offspring sex ratio in a viviparous lizard. *Journal of Animal Ecology*. 78: 84–90.
- Warner D A, Woo L K, Van Dyk D A, Evans C S y Shine R (2010). Egg incubation temperature affects male reproductive success but not display behaviors in lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 64, 803-813.
- Warner A D (2011). Capítulo 1 Sex determination in reptiles. *Hormone and reproduction of Vertebrates: Reptiles*. 1-38.
- Xiao - Long T1, Feng Yue, Xue- Feng Y, De-Jiu Z, Ying-Xin, Cui Wang, Qiang Chen (2012). Effects of gestation temperature on offspring sex and maternal reproduction in a viviparous lizard (*Eremias multiocellata*) living a thigh altitude. *Journal of Thermal Biology*. 37. 438–444.
- Yntema C L (1979). Temperature levels and periods of sex determination during incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. *Journal Morphology*. 159, 17–27.

- Yntema C L, Mrosovsky N (1982). Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in logger head turtles. *Canadian Journal of Zoology*. 60, 1012–1016.
- Yao H H, Matzuk M M, Jorgez C J, Menke D B, Page D C, Swain A, y colaboradores (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics*. 230:210–5.
- Zug G R, Vitt L G y Caldwell G P (2001). *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians & Reptiles*. 2nd Edition, Academy Press.
- Zhang, D J., Tang X -L, Yue F, Chen Z, Li R D y Chen Q (2010). Effect of gestation temperature on sexual and morphological phenotypes of offspring in a viviparous lizard, *Eremias multiocellata*. *Journal of Theoretical Biology*. 35, 129–133.
- Zani P A y Rollyson M E (2011). The effects of climate modes on growing season length and timing of reproduction in the Pacific Northwest as revealed by biophysical modeling of lizards. *The American Midland Naturalist Journal*. 165, 372-388.