

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Impacto de factores ambientales en la determinación sexual de anfibios

**Monografía previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

ANDREA ELIZABETH RUEDA ACOSTA

Quito, 2022

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Monografía de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Andrea Elizabeth Rueda Acosta ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Firma del Director de la Monografía

A handwritten signature in black ink, reading "Andrés Romero Carvajal". The signature is written in a cursive style with a large initial 'A' and 'C'.

Andrés Romero Carvajal

Quito, 30 de Mayo del 2022.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todas las personas que me apoyaron durante la realización de la misma. Especialmente a mis padres que sin sus sacrificios, amor y apoyo no habría podido culminar mis estudios. A mis abuelitos que siempre estuvieron pendientes de mí en la ausencia de mis papas. A mi hermano que desde pequeña me ha incentivado la determinación en lo académico y el amor por la ciencia. Y finalmente a mi novio por ser mi soporte emocional, felicidad y apoyo durante estos últimos 2 años.

Tabla de contenidos

- 1. Síntesis**
 - 1.1 Resumen
 - 1.2 Abstract
- 2. Objetivos**
 - 2.1. General
 - 2.2. Específicos
- 3. Introducción**
 - 3.1. Determinación sexual
 - 3.2. Importancia del balance sexos
 - 3.3. Extinción masiva en anfibios
- 4. Desarrollo gonadal en anfibios**
 - 4.1. Formación de gónadas
 - 4.2. Diferenciación de gónadas
 - 4.3. Intersexualidad y hermafroditismo
- 5. Cromosomas sexuales**
 - 5.1. Generalidades de los cromosomas sexuales
 - 5.2. Evolución de cromosomas sexuales
- 6. Genes**
 - 6.1. Genes en la determinación sexual en anfibios.
- 7. Tipos de determinación sexual**
 - 7.1 Evidencia en los vertebrados
 - 7.2 Evolución de sistemas de determinación
- 8. Determinación sexual por factores ambientales**
 - 8.1. Temperatura
 - 8.2. Contaminantes
- 9. Determinación sexual por temperatura y su relación con el calentamiento global**

1. SÍNTESIS

1.1. RESUMEN

Los anfibios representan a uno de los grupos más vulnerables frente al cambio climático, por esta razón es fundamental reconocer toda amenaza derivada de este problema. Una de sus principales amenazas siempre ha sido la temperatura gracias a la sensibilidad de su piel. Sin embargo, ese no es el único órgano afectado por este factor ambiental, sino que a su vez este factor interviene en el desarrollo gonadal. Lo que provocará inversiones sexuales que tendrán como consecuencia un desbalance de sexos en sus poblaciones, afectando el tamaño efectivo de las mismas. Por esta razón, se sintetizará toda la información sobre el desarrollo gonadal, los genes involucrados en su diferenciación sexual como Z-AR implicado en la formación de testículos y DM-W implicado en la formación de ovarios, entre otros. Por otro lado, también se recopilará datos sobre el sistema de determinación de sexo donde participan los cromosomas sexuales, que a su vez la morfología homomórfica y heteromórfica cumple un papel importante en la determinación sexual. El reto de esta revisión literaria es recopilar la escasa información existente sobre esta clase de vertebrados, en cuanto a los mecanismos moleculares, genéticos, cromosómicos y ambientales de determinación sexual en anfibios resaltando la influencia ambiental sobre este proceso.

Palabras clave: Cambio climático, cromosomas sexuales, determinación sexual, heteromórfico, homomórfico, inversión sexual.

1.2. ABSTRACT

Amphibians represent one of the most vulnerable groups due to climate change, and for this reason it's essential to recognize any threat derived from this problem. One of their main threats has always been temperature due to the sensitivity of their skin. However, this is not the only organ affected by this environmental factor, but this factor is also involved in gonadal development. This will cause sexual inversions that will result in a skewed sex ratio in their populations, affecting their effective size. For this reason, we will synthesize all the information on gonadal development and the genes involved in their sexual differentiation such as Z-AR involved in the formation of testes and DM-W involved in the formation of ovaries, among others. On the other hand, data will also be collected of the sex determination system where sex chromosomes are involved, which can have homomorphic and heteromorphic morphology and plays an important role in sex determination. The challenge of this literature review is the lack of information on this class of vertebrates, regarding their molecular, genetic, chromosomal and environmental mechanisms of sex determination in amphibians highlighting the environmental influence on this process.

2. OBJETIVOS

2.2. GENERAL

Sintetizar toda la información existente sobre los mecanismos moleculares, genéticos, cromosómicos y ambientales de determinación sexual en anfibios resaltando la influencia ambiental sobre este proceso.

2.3. ESPECÍFICOS

- Recopilar la información actual sobre el desarrollo gonadal en anfibios.
- Simplificar la información actual sobre los factores genéticos y ambientales que intervienen en la diferenciación sexual en anfibios.
- Proponer ramas de investigación prioritarias respecto a la diferenciación sexual en anfibios y su importancia en el manejo de poblaciones en peligro frente al cambio climático.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. DETERMINACIÓN SEXUAL

La determinación del sexo cumple un rol fundamental en la historia de vida de todos los organismos con reproducción sexual. Este proceso consiste en la diferenciación de gónadas para el desarrollo de ovarios y testículos, usando principalmente procesos de regulación génica y control hormonal. Tanto en anfibios como en otros vertebrados los protagonistas de este proceso serán moléculas androgénicas y estrogénicas (hormonas). La producción de estas moléculas será regulada por la expresión de genes determinantes de sexo, que en algunos casos están ubicados en cromosomas sexuales y otros en cromosomas autosomales (Viguera, 2010).

Tanto en anfibios como en otros vertebrados, existen 2 tipos de determinación sexual: una que se rige solo por su genética (DSG) y otra que se influencia por los factores ambientales (DSA) (Edmands, 2021). El sistema DSA es más común en anfibios y reptiles, lo que podría estar relacionado con la morfología cromosómica; ya que algunos reptiles como las tortugas con inversión sexual por temperatura usualmente exhiben cromosomas sexuales homomórficos (Tezak et al., 2020).

En el sistema DSA se observa que además de la temperatura también el pH y algunos contaminantes pueden fomentar ciertas modificaciones epigenéticas que alteran el desarrollo gonadal en vertebrados. Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en reptiles, pero en anfibios aún falta investigación sobre la relación entre las moléculas y estas modificaciones epigenéticas que intervienen en la determinación de sexo (Luckenbach y Yamamoto, 2018).

De lo que se conoce, en los anfibios al igual que los reptiles presentan una etapa termo-sensible en su desarrollo. En la cual, aplicando temperaturas altas se da lugar a individuos masculinos y las temperaturas más bajas dan lugar a individuos femeninos (Navara, 2018). Por otro lado, ya se ha demostrado que la exposición continua de xenobióticos como herbicidas o químicos (Específicamente nos referimos a los glifosatos, la atrazina, el ethyl-nylestradiol y bisfenol A) son compuestos que exhiben consecuencias relacionadas con afecciones graves en la fertilidad y diferenciación sexual en algunas especies de anfibios (Bach, 2018; Hecker et al., 2006).

La clave para entender porque estos agentes externos actúan sobre algunas especies de anfibios y en otras no, lo encontramos en el rol de los cromosomas sexuales y los genes activos durante su desarrollo gonadal. El 96% de anfibios tienen cromosomas sexuales homomórficos, estos son cromosomas que no se pueden distinguir entre si y permiten el reemplazo de un gen determinante de sexo por un gen nuevo. Gracias a esto, los individuos con tal característica pueden transformar autosomas a cromosomas sexuales; lo que los hace más moldeables a la hora del desarrollo de sus gónadas sexuales. De lo contrario, en los cromosomas dimórficos o heteromórficos no existe tal característica y este tipo de cromosomas sexuales son distinguibles el uno del otro (Miura et al., 2018; Perrin, 2021). También existe la posibilidad de que en algunos organismos no exista la presencia de cromosomas sexuales. Sin embargo, en anfibios no se encontró evidencia de esto, pero si en peces y reptiles que coincidentemente son clases reconocidas por exhibir una determinación sexual por temperatura (DST) (Edmands, 2021).

Dependiendo del organismo existe información variada respecto a este tipo de genes. Lamentablemente, en anfibios los únicos genes determinantes de sexo encontrados por el momento son: Z-AR un receptor de andrógenos que contribuye a la determinación sexual masculina descubierta en *Glandirana rugosa* y DM-W un gen que determina el sexo femenino, al incrementar la expresión de CYP19A1 que fue encontrado en *Xenopus laevis* (Nagahama et al., 2021; Roco et al., 2021).

3.2. IMPORTANCIA DEL BALANCE DE SEXOS

A nivel de laboratorio se ha descubierto efectos negativos que podrían llegar a tener las poblaciones al presentar inversiones sexuales, gracias a factores ambientales como sucede en anfibios y peces (Edmands, 2021). Este fenómeno puede amenazar la diversidad y abundancia de las poblaciones naturales. Además de las consecuencias mencionadas también provocaría la limitación de la selección sexual debido a la escasez de parejas. Lo que también puede resultar en un incremento de agresividad, ruptura de la cooperación parental, una aptitud reducida en machos XX y YY, reducción del crecimiento de la población y potencial de adaptación. (Cotton y Wedekind, 2009; Edmands, 2021).

Uno de los agentes más involucrados en la inversión sexual es la temperatura. Este factor puede dar 2 escenarios adversos. El primero donde muestra temperaturas masculinizantes que provocarán una descendencia 100% femenina, debido a la reproducción de las hembras homogaméticas XX con estos pseudomachos XX afectados por la temperatura. Así desapareciendo el cromosoma Y e imposibilitando la reproducción sexual en la especie lo que la llevaría a la extinción (Edmands, 2021).

Por ejemplo, en un estudio realizado por Nemesházi y sus colaboradores (2020) se describen fenómenos de inversión sexual en poblaciones naturales de *Rana dalmatina* en

Hungría. Estas inversiones sexuales fueron el resultado de actividades antropogénicas, que producirían el efecto de la isla de calor urbano y la contaminación en los cuerpos de agua donde habita esta especie. Este efecto causó un desbalance de sexos inclinado más a la conversión de hembra a macho en la población. En el mismo artículo se menciona que las hembras de esta población pueden reconocer fácilmente a los individuos con inversión sexual por su color debido a que este rasgo está ligado al cromosoma X, con el fin de elegirlos para la reproducción. Lo que conduciría a un declive en el tamaño efectivo de la población al generar más hembras, esto gracias a que ambos progenitores muestran un genotipo femenino XX.

Por otro lado, evidenciamos que las consecuencias de las temperaturas feminizantes no son tan comunes. A primera vista esta situación puede verse como algo beneficioso al aumentar la proporción de hembras, así incrementando el tamaño de la población. Sin embargo, al cabo de unas generaciones se pierde el cromosoma X en la población; dejando solo individuos YY que afectarían el tamaño efectivo de la población al igual que con las temperaturas masculinizantes (Cotton y Wedekind, 2009; Edmands, 2021; Nemesházi et al., 2021).

3.3. EXTINCIÓN MASIVA EN ANFIBIOS

Las especies que presentan DSA son mucho más susceptibles a los cambios de temperatura, debido a la posibilidad de tener un desbalance en la proporción sexual de la población. Generando efectos negativos que afectarían a la conservación de dichas especies a largo plazo. Por esta razón, el estudio de la diferenciación sexual en anfibios y de cualquier vertebrado que presente este tipo de determinación sexual es de gran importancia, frente a escenarios adversos como lo es el calentamiento global (Valenzuela et al., 2019).

Desde 1980, sabemos que los vertebrados más afectados por el cambio climático son los anfibios, con un tercio de sus especies amenazadas y aproximadamente 122 extintas. Este declive de las poblaciones se debe a la sensibilidad que tienen estos animales frente a cambios fluctuantes en sus hábitats, provocando una disminución en el número poblacional dramáticamente (De Sá, 2005; Montero, 2009).

El cambio de temperatura en el ambiente y su potencial efecto sobre la determinación sexual y balance de sexos podría estar afectando a ciertas poblaciones vulnerables de anfibios. Muchas poblaciones de anfibios se han vuelto vulnerables o amenazadas por factores antropológicos como: la expansión de fronteras agropecuarias, actividades mineras y petroleras. Provocando la deforestación, la contaminación en arroyos y demás fuentes de agua con los residuos que generan. El principal factor responsable de este evento es el calentamiento global. Sin embargo, existen otros agentes perjudiciales que no se encuentran relacionados directamente con humanos, entre estos están las infecciones por microorganismos. Un ejemplo de ello es un hongo que ha llamado la atención últimamente por el gran índice de extinciones y decrecimientos de poblaciones en anfibios, con esta descripción nos referimos a *Batrachochytrium dendrobatidis* (Montero, 2009).

Uno de los géneros más afectados por este hongo es *Atelopus* y su declive incrementa en países neotropicales donde existe mayor calor y humedad. Esto podría haber explicado la extinción de varias especies pertenecientes a Ecuador en los años 80s y 90s. Se han registrado grandes declinaciones de anfibios que presentan un modo reproductivo conectado a los cuerpos de agua (Bustamante et al., 2005). Sin embargo, más adelante se descubren que existen algunas especies de *Atelopus* que no son realmente afectadas por este hongo y más bien han generado una especie de coevolución con el tiempo por una disminución en la transmisión o resistencia del hospedero. Además, sugieren que temperaturas cálidas promueven la coexistencia entre estos 2 organismos (Ballestas et al., 2021; Tarvin et al., 2014).

Al estudiar la razón del decrecimiento poblacional de algunas especies que no les afectaba este hongo se llegó a la conclusión de que en la zona donde existe este declive fue deforestada; permitiendo una mayor cantidad de luz y calor solar. Algo interesante a destacar de *Atelopus spumarinus* una de las especies con este rasgo, es el hecho de que en esta específica población encontraron una proporción sexual 4:1. Así mostrando un mayor número de machos que de hembras, provocando un desbalance de sexos en la población (Tarvin et al., 2014). Lo que nos lleva a especular que además de todos los factores negativos del cambio climático, la desaparición masiva de esta y muchas otras especies de anfibios se podría deber también a un desbalance de sexos. Razón por la que es imprescindible estudiar la determinación sexual de los anfibios para su conservación.

4. DESARROLLO GONADAL EN ANFIBIOS

4.1. FORMACIÓN DE GONADAS

La formación de las gónadas en la mayoría de anfibios tiene lugar en el inicio de la metamorfosis cuando surgen los primordios de las patas traseras (estadio 26 de Gosner). En ese momento comienzan a migrar las células germinativas primordiales (CGP) hacia estos 2 plegamientos longitudinales, denominados crestas genitales. Las cuales son estructuras que provienen del epitelio celómico expuestos a ambos lados del mesenterio intestinal (Wylie et al., 1976; Wylie, 1980).

Posteriormente, la migración de este tipo de células contribuirá a la organización de gónadas al permitir la formación de la gónada central, la progónada y la epigónada. Las cuales conformarán la gónada indiferenciada (estado gonadal en el que aún no se puede reconocer el sexo del organismo), que se encuentra sujeta a un mesenterio especializado denominado mesogonium. Estas estructuras presentan ciertas diferencias entre Anura, Urodela y

Gymnophiona. En Anura se va a degenerar la epigónada y la progónada se transformará en un cuerpo graso. En Urodela y Gymnophiona tanto la epigónada como la progónada se transformarán en cuerpo graso. Por otro lado, la gónada central en los 3 ordenes será la que sufra la mayoría de modificaciones para dar lugar a un sexo determinado; ya sea por su maquinaria genética, ambiente o ambos (Dournon et al., 1990; Olgieska, 2009). Toda esta descripción mencionada sobre la formación temprana de gónadas (epigónada, progónada y gónada central) si bien se puede aplicar a *Xenopus*, también se ha visto en otros anuros como *Rana sylvatica* y *Rana temporaria* (Haczkiewicz y Ogielska, 2013; Witschi, 1929a, 1929b).

4.2. DIFERENCIACIÓN DE GÓNADAS

La diferenciación gonadal en Caudata y Anura sigue un mismo patrón potencialmente distinto al de Gymnophiona del que no se sabe mucho (Hayes, 1998). Estos organismos que presentan gonocorismo (Rasgo de un individuo que produce gametos específicos de un sexo) en la mayoría de sus especies exhiben la diferenciación gonadal en diferentes estadios larvales, dependiendo de cada especie y sexo. (Benvenuto y Weeks, 2020; Roco et al., 2021).

Para la formación de testículos en anfibios, las células germinales migrarán desde la corteza (capa periférica de la gónada bipotencial o indiferenciada) hacia la gónada central. Esto con el fin de estimular a las células somáticas, las cuales inducirán a las células germinativas para dar lugar a las espermatogonias (Falconi et al., 2004; Flament et al., 2011; Haczkiewicz y Ogielska, 2013). De manera adyacente a este proceso, también se dará la formación de los túbulos seminíferos que surgen a partir de los conductos de Wolff y se dará una regresión del conducto mulleriano por acción de la hormona antimülleriana (AMH). Que a su vez interviene en la producción de células sertoli (Adolfi et al., 2019; Flament et al., 2011; Flament, 2016; Jansson et al., 2016).

Para la formación de las gónadas femeninas las células germinativas permanecerán en la superficie de las gónadas, mientras tanto en la capa central estéril con la asistencia de las células somáticas se va formando el saco ovárico (Falconi et al., 2004). Esta última estructura se origina a partir del conducto mülleriano, mientras que en los machos es inexistente. Al igual que los machos, las hembras mantendrán los conductos de Wolff y el único rol que cumplirán estos ductos será eliminar la orina de manera eficiente como normalmente sucede en los anamniotas (Adolfi et al., 2019).

Así finalmente se va a poder identificar los primeros rasgos de las gónadas masculinas o femeninas de los individuos. Continuando con la descripción del desarrollo gonadal, en este punto las gónadas ya son completamente reconocibles: los ovarios tendrán una cavidad central rodeada por el córtex y la médula estéril, mientras que los testículos presentarán estas 2 últimas estructuras fusionadas en una masa y sin la cavidad que se mencionaba en los ovarios. Por último, en la metamorfosis las gónadas ya son notorias, aparecen oocitos en el ovario y los túbulos seminíferos en los testículos (Piprek et al., 2018).

En algunos ránidos y bufos se ha observado que las primeras señales de diferenciación gonadal suceden en renacuajos, donde la parte anterior de la gónada (pars progona/rogónada) se convierte en cuerpo graso y la parte central o indiferenciada de la gónada (pars gona/rogona central) se va diferenciando en un ovario o testículo (Haczkiwicz y Ogielska, 2013). De la misma manera, en otras especies puede variar el desarrollo gonadal de tal forma que existen 3 diferentes tasas de diferenciación gonadal en cada sexo. En caso de la formación de los ovarios primero se encuentra la tasa básica que consiste en la aparición de la cavidad ovárica al final de la metamorfosis. Después se encuentra la tasa retardada en donde los primeros oocitos diploténicos aparecen posterior a la metamorfosis y al final está la tasa acelerada donde esta diferenciación ocurre al inicio de la metamorfosis. Algo parecido sucede con la diferenciación en machos, pero con la diferencia

que las tasas están relacionadas con estructuras asociadas a la formación de testículos (Roco et al., 2021). En caso de *Xenopus laevis* el periodo decisivo de la determinación sexual se visualiza en los estadios que se están formando las patas posteriores, donde se observará una migración de células germinativas dentro de la diferenciación de testículos (Piprek et al., 2018).

Existen 3 diferentes vías de formación gonadal. La primera es cuando una gónada indiferenciada pasa directamente a organizarse en ovarios o testículos (Tipo diferenciado), que se puede observar en *R. sylvatica* (Witschi, 1929a). La segunda es cuando esta misma gónada indiferenciada pasa a formar los ovarios que posteriormente, si su genética lo permite se transformarán en testículos (Tipo semindiferenciado). Esta vía está presente en *Hynobius retardatus* (Flament et al., 2011). Para terminar, en la tercera y última vía se diferenciará en ovarios, o puede permanecer en una fase intersexual hasta que se diferencie en testículos (Tipo indiferenciado). Esto es lo que sucede en *R. temporaria* (Ogielska y Kotusz, 2004). Debido a que esta serie de eventos morfológicos solo las separa un periodo de tiempo, es fácil confundirse con la del tipo diferenciado e incluso se lo puede considerar un mismo tipo de diferenciación gonadal (Flament, 2016; Haczkiwicz y Ogielska, 2013; Merchnt-Larios y Villalpando, 1981).

4.3. INTERSEXUALIDAD Y HERMAFRODITISMO EN ANFIBIOS

Una vez explicada la formación de ovarios y testículos en anfibios, se puede identificar ciertas anomalías que surgen dentro de este mecanismo de diferenciación. La más conocida es la inversión sexual que implica un cambio de sexo, el cual puede darse de manera experimental o natural (Cotton y Wedekind, 2009).

Este fenómeno en algunos casos puede ser la causa del hermafroditismo, que es la presencia de ambos sexos funcionales en un mismo individuo gracias a: una anomalía genética en el cigoto, un error durante el desarrollo embrionario, factores ambientales como hemos ido discutiendo o por la combinación de todos los anteriores. Esto dando como resultado a un anfibio con un desarrollo gonadal que terminará con ambos sexos, ya sea al mismo tiempo o consecutivamente (Adolfi et al., 2019). Un ejemplo de ello podemos encontrarlo en *Scinax fuscovarius*, un organismo con hermafroditismo verdadero al poseer tanto un ovario totalmente desarrollado en el lado izquierdo, como un testículo incipiente en el lado izquierdo funcional (Goldberg, 2013).

Por otro lado, también se encuentra *Hyperolius viridiflavus ommatosticus*, una rana capaz de aguantar grandes fluctuaciones ambientales al habitar en la savana africana. Donde su población se redujo, como resultado esta especie recurrió al hermafroditismo secuencial como alternativa de supervivencia. Esta rana mostró ciertas cualidades masculinas como: el canto y femeninas como la capacidad de fertilizar huevos después de haberlas separado de los machos (Grafe y Linsenmair, 1989). El hermafroditismo secuencial expuesto surge a partir de una necesidad ecológica social dentro de la población. Este fenómeno también se ha observado en peces (*Thalassoma bifasciatum*) y en varios vertebrados (Munday et al., 2006).

Al igual que el caso mencionado en otras especies de anfibios, no existe el hermafroditismo verdadero sino estructuras que representan un estado intersexual; pero sin una funcionalidad de ambos sexos como los ovotestis. Esta estructura es un término muy amplio utilizado para muchos grados de gónadas intersexuales. Sin embargo, una definición general sería la presencia de tejidos tanto de ovario como de testículo en un mismo individuo. Aunque este concepto fácilmente podría confundirse con otros términos de intersexualidad. Para evitar confusiones se nombró a los testículos que contenían oocitos como oocitos testiculares y a los ovotestis como una estructura que consiste en un ovario maduro, que contiene la presencia histológica de tejidos testiculares o nidos espermatogénicos (Abdelmoneim et al., 2015; Storrs- Méndez y Semlitsch, 2010).

La estructura gonadal denominada como ovotestis no solo se encuentra en *R. temporaria*, ya que se han descubierto más especies con esta anomalía, entre ellas: *R. sylvatica*, *R. pipiens*, *Xenopus laevis*, *Rana fusca*, *Bufo vulgaris*, *Bufo cinereus*, *Bufo lentiginosus*, *Pelobates fuscus*, etc (Hecker et al., 2006). Una gónada intersexual consiste en tejidos testiculares con la capacidad de contener folículos ováricos u oocitos, que han mostrado ser capaces de ser fertilizados en algunos anfibios como *Rana clamitans* (Lambert et al., 2019). Algo parecido sucede en la salamandra *Pleurodeles waltl*, pues en esta especie se ha presenciado esta estructura como un gran nódulo testicular rodeado por una tira ovárica que contendría a los oocitos translúcidos. Esta reversión puede darse espontáneamente o por factores ambientales (Collenot et al., 1994). En algunos casos puede ser consecuencia directa de la temperatura, ya que al someterlos a temperaturas mayores de 32°C se ha descubierto que llega disminuir la actividad de la aromatasa en los estadios 52-54. Los cuales han sido identificados como termosensibles en esta especie (Chardard et al., 1995; Chardard y Dournon, 1999).

En comparación, *R. temporaria* es una especie que presenta una población natural de seres intersexuales, que tienen ovotestis al inicio de la metamorfosis (Witschi, 1929b). Esto no es usual, ya que en la mayoría de poblaciones esta especie suele presentar ovarios al inicio de la metamorfosis y después se producen inversiones hasta lograr el equilibrio de la población. Después de semanas o incluso meses posteriores a su metamorfosis (Dournon et al., 1990). Otras especies como *R. sylvatica* presentan directamente el sexo femenino o masculino sin la necesidad de pasar por un estadio femenino (Witschi, 1929a).

También existe la posibilidad de que estas gónadas no se desarrollen totalmente y estos seres intersexuales terminen con testículos u ovarios primitivos por factores externos. Un ejemplo de esto sucede en *Xenopus tropicalis*, donde se ha observado la presencia de ovarios inmaduros ubicados en la parte posterior de los testículos. Algo similar ocurre en los bufos pero de manera natural mientras que en esta especie el evento se da por la exposición a xenobióticos que inhiben la acción del estradiol (Olmstead et al., 2009).

En la familia Bufonidae existe un caso particular de gónadas ambiguas conocido como el órgano de Bidder. Este tejido es el resultado de la involución incompleta de la corteza de la gónada bipotencial o indiferenciada, tomando su posición en la parte anterior de la cresta genital o testículo. Así, este órgano vestigial aparece frente a los testículos en forma de un ovario rudimentario. Si se extirpan los testículos del individuo masculino, este órgano se desarrollará en un ovario totalmente (Flament, 2016; Nakamura, 2009). Esta funcionalidad se debe a que este pseudo-ovario tiene oocitos previtelogénicos con la capacidad de llegar a estadios vitelogénicos maduros (Sánchez et al., 2021).

La presencia del órgano de Bidder ha sido reportado en ambos sexos y en algunas especies se ha revelado una degeneración en la madurez sexual. Su histología y morfología han demostrado ser similares en las especies que lo poseen, por esto se hipotetiza que este carácter es una sinapomorfía de los bufónidos (Sánchez et al., 2021). El desarrollo de esta estructura se origina en la vida larval justo antes de la diferenciación de gónadas. Su histología consiste en 2 regiones: el córtex que es donde se encuentran los oocitos bidderianos rodeados por células foliculares y la médula que suele ser más pequeña (Farias et al., 2002; Silberschmidt et al., 2015).

Otro rasgo importante de este fenómeno es que al estar ubicado en la parte anterior de los testículos se pensaría que existe un tejido que los separa entre sí. No obstante, la verdad es que no existe un tejido especializado que los separe, lo que lleva a pensar que los oocitos bidderianos se encuentran cerca de los túbulos seminíferos (Sánchez et al., 2021). Varias características morfológicas e histológicas permiten reconocer las diferencias entre ovotestis y el órgano de Bidder. En los ovotestis los oocitos previtelogénicos se encuentran dentro de los testículos, mientras que en el órgano de Bidder existe solo un ovario rudimentario anexo a la gónada masculina. Aunque no exista un tejido que los separe por completo (Abdel-moneim et al., 2015; Silberschmidt et al., 2015).

5. CROMOSOMAS

5.1. GENERALIDADES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

La citogenética en anfibios es una herramienta fundamental para el estudio de la morfología y mecanismos cromosómicos (Veloso e Iturra, 1979). El elemento principal de este estudio son los cromosomas, que son estructuras encargadas de la organización o empaquetamiento de ADN dentro de una célula (Tolosa, 2021). En la actualidad se ha esclarecido que los cromosomas se dividen en: cromosomas autosómicos que son cualquier cromosoma del organismo exceptuando el otro tipo de cromosomas, que son los sexuales. Los cuales están relacionados con mecanismos que determinarán el sexo del individuo, es decir, intervienen en la diferenciación gonadal al contener información esencial para activar o reprimir genes asociados con este proceso (Evans et al., 2012; Guzman y Bullejos, 2017). Hoy en día este concepto parece ser un poco ambiguo, debido a que se han encontrado genes determinantes de sexo tanto en cromosomas sexuales como autosómicos (Stelkens y Wedekind, 2010).

Los cromosomas sexuales en anfibios pueden clasificarse en diferentes grupos o denominaciones dependiendo de sus rasgos. Uno de los más notorios es la clasificación por su morfología, pues algunos cromosomas sexuales son indiferenciados (homomórficos) y en otros diferenciados (heteromórficos). Esta distinción morfológica se debe a la degeneración y por ende a la reducción de tamaño de los cromosomas Y y Z. Este fenómeno se debe a varias razones, entre ellas a la acumulación de heterocromatina, inversiones pericéntricas,

inserciones, deleciones o presencia de cromosomas supernumerarios (Ezaz et al., 2006). En anfibios existe un alto porcentaje de especies que tienen cromosomas sexuales homomórficos (96%), mientras que los cromosomas heteromórficos solo se encuentran en el 4% de las especies. Paralelamente a esto también se ha observado una mayor cantidad de especies

XX/XY con cromosomas homomórficos que ZZ/ZW para la misma morfología. A diferencia de los cromosomas heteromórficos que presentan casi la misma cantidad de especies con sistemas de determinación sexual mencionados (Ma y Veltsos, 2021; Perrin, 2021).

La presencia de cromosomas heteromórficos define dos tipos de sistemas de determinación sexual: En el sistema XX/XY, el sexo heterogamético XY será el sexo masculino, al igual que los mamíferos y en el sistema ZZ/ZW, el sexo heterogamético ZW será el femenino. Entre otras diferencias de estos sistemas está la herencia a su progenie pues en especies XX/XY las hembras reciben la variación ligada al cromosoma X de ambos progenitores, mientras que en los cromosomas X de machos solo son de origen materno. Al contrario, en especies con ZZ/ZW los cromosomas Z masculinos reciben herencia de ambos progenitores y los cromosomas W solo son de origen paterno (Connallon, 2009; Ezaz et al., 2006; Tamschick, 2016). Según el estudio de Hillis y Green (1990) esta cualidad es fundamental para la determinación de sexo en anfibios y usualmente es identificada por métodos de bandeo.

Los métodos de bandeo cromosómico consisten en la desnaturalización, digestión enzimática y tinción de un colorante específico para ADN, con el fin de revelar características morfológicas de cromosomas. Existen varios tipos de bandeo entre ellos están: el bandeo C, Q, G, tinción Ag-NOR, etc. La técnica a utilizar dependerá del propósito de la investigación y el organismo. Los cromosomas sexuales homomórficos se pueden identificar mediante bandeo C, G y tinción Ag-NOR en caso de *Buergeria buerger* (Guzman y Bullejos, 2017). Si bien en algunas especies se puede identificar este rasgo con el bandeo C, en otras como *Hoplobatrachus rugulosus* no (Panthum et al., 2021).

La identificación de los cromosomas sexuales heteromórficos será mucho más sencillo debido a la degeneración del cromosoma Y o W. El verdadero obstáculo es el reconocimiento del sistema de determinación sexual que puede estar XX/XY, ZW/ZZ o los 2 en una misma especie (Schmid et al., 2014; Zechner y Hameister, 2011). Si bien los cromosomas tienen un rol muy importante en la diferenciación sexual requiere de una dosificación de genes determinantes de sexo para poder efectuar el desarrollo y determinación de gónadas (Ezaz et al., 2006). Con el fin de tener una idea de que genes participan, podemos mencionar algunos que han sido identificados para el desarrollo masculino como: DMRT1, AMH, AR, CYP17A1 y otros para el desarrollo femenino DM-W, CYP19A1, SF1, FOXI2, SOX3 (Ma y Veltsos, 2021).

Algo que vale rescatar de todo lo expuesto, es que estos genes determinantes de sexo se comportarán de manera diferente dependiendo de la morfología cromosómica a la que pertenezcan. Sobre todo, en el caso de los cromosomas sexuales indiferenciados (Homomórficos), ya que estos tienen la capacidad de cambiar fácilmente estos genes. También puede resultar en el recambio de autosomas a cromosomas sexuales, lo que los hace más moldeables a la hora de desarrollar las gónadas sexuales (Ito, 2020). Además, se presume que este tipo de cromosomas a la vez se ha encontrado en la evolución temprana de los cromosomas sexuales (hace unos 100 millones de años). Es decir que puede ser considerado un rasgo ancestral, con posibilidad de estar asociado con el cambio de un sistema de determinación sexual a otro $XX/XY \Leftrightarrow ZW/ZZ$ (Ezaz et al., 2006).

5.2. EVOLUCIÓN DE CROMOSOMAS SEXUALES

Los cromosomas sexuales son sujetos a cambios evolutivos más rápidos a diferencia de lo que sucede en autosomas. Posiblemente debido a la heterocigosidad obligatoria que presentan al entrar en meiosis (Hillis y Green, 1990). Al parecer, el origen de los cromosomas sexuales en los anfibios era el sistema de determinación con heterogamia femenina ZZ/ZW. Para después surgir el sistema heterógamo masculino XX/XY. El cual se cree que ha

evolucionado al menos 7 veces dentro de los anfibios (Ezaz et al., 2006; Hillis y Green, 1990; Miura, 2008). Para este grupo los cambios evolutivos pueden estar asociados a la morfología de sus cromosomas y se ha propuesto que los cromosomas homomórficos cumplen un rol fundamental en la transición de sistemas de determinación sexual (Evans et al., 2020).

Cabe señalar que los cromosomas homomórficos no siguen el modelo canónico de evolución de cromosomas. Esto se puede deber a la constante ocurrencia de recambios de cromosomas sexuales, en donde un nuevo par de cromosomas adquiere los genes determinantes de sexo o mutaciones y sustituye a los ya establecidos. Al mismo tiempo este acontecimiento también puede ser causado por efectos ambientales o parásitos (Dufresnes et al., 2021).

Una herramienta clave en la evolución de cromosomas sexuales que influye en la degeneración mencionada son los genes antagonistas (GA). Los cuales cumplen con la función de incrementar el efecto mencionado por medio de una retención de la recombinación entre cromosomas. Con la ayuda de mecanismos como el trinquete de Muller, una fuerte deriva genética o reducción de la selección purificadora (Ma y Veltsos, 2021; Perrin, 2021). Este tipo de genes serán beneficiados al estar cerca de los genes determinantes de sexo, puesto que las mutaciones formadas en su proximidad aumentarán la detención de la recombinación entre los cromosomas X-Y (Perrin, 2021).

La recombinación en anfibios puede variar dependiendo del sexo. Por ejemplo, en algunos linajes de ranas, como ranidae, los cromosomas homomórficos XY presentan recombinación tan solo en regiones teloméricas. Mientras que el par XX si manifiestan una recombinación completa. Esto favorecería las transiciones de sistema XY gracias a la vinculación de los genes determinantes de sexo junto con los antagonistas. A su vez este patrón también aplica en sistemas ZW (Dufresnes et al., 2021). Estas diferencias mecánicas

en la recombinación podrían promover la unión de alelos beneficiosos al cromosoma Y o al W, e influyen directamente al sexo fenotípico. Por ejemplo, se ha visto que machos XX con inversión sexual tiene restricción en la recombinación igual que en los normales XY en *R. temporaria* (Ma y Veltsos, 2021).

Las transiciones de sistemas de determinación sexual en anuros se relacionan con la fijación y propagación de una mutación masculinizante o feminizante. En caso de la transición de XY \rightarrow ZW se obtendrá la fijación de una mutación feminizante; que resultará en la fijación de Y en un autosoma (Dufresnes et al., 2021). Este recambio de cromosomas sexuales responsable de la transición de sistemas puede ser homólogo, en caso de que el gen o mutación que determinará el sexo se mantenga en los cromosomas sexuales ancestrales. A diferencia de lo que ocurre en el recambio no homólogo en el cual se establecerá en otro par de cromosomas que no son los ancestrales (Evans et al., 2020).

Existe evidencia científica donde se observa que los anuros con cromosomas sexuales heteromórficos como *Gastrotheca*, *Engystomops*, *Eleutherodactylus* y *Pristimantis* exhiben adaptaciones reproductivas que favorecerían la degradación de cromosomas. Entre estos rasgos se encuentra el desarrollo directo que reduce el tiempo de desarrollo y conduce a tener generaciones más cortas, lo que posiblemente aceleraría la evolución de los cromosomas sexuales. De la misma manera, otra estrategia es el control parental y el dimorfismo sexual que acentuaría una selección sexual para ciertos genes antagonistas. Aumentando su importancia en la evolución de cromosomas sexuales incluyendo la degeneración de cromosomas (Ma y Veltsos, 2021).

Un caso particular donde se puede observar este cambio de sistemas de determinación es en *G. rugosa*, en la cual se encontró un cambio del sistema de determinación sexual de heterogamia masculina a femenina y cambio la morfología cromosómica en poblaciones aisladas. Estos eventos surgen de las poblaciones de Japón Occidental y Kanto las cuales

presentan cromosomas homomórficos y un sistema XX/XY. A continuación, estas poblaciones se derivarían en grupos neo-ZW, XX/XY y ZZ/ZW heteromórficos distribuidas en el oeste, centro y noroeste de Japón (Miura et al., 2016). En las poblaciones de esta especie hubo una transición de XX/XY a ZZ/ZW debido a una inversión pericentromérica del cromosoma 7. Vale agregar que, en estas poblaciones, ni Y ni W presentaban la usual degradación o acumulación de heterocromatina. La cual era causante de heteromorfía en los

cromosomas sexuales en otras especies. Otro factor que pudo haber causado este cambio del sexo heterogamético es la distorsión en la proporción de sexos de la población de esta especie. Conjuntamente con la presencia de cromosomas homomórficos en las poblaciones originales que son capaces de reemplazar genes determinantes de sexo asociado con la especiación pudo haber contribuido con la evolución de los cromosomas sexuales (Miura, 2008).

6. GENES

6.1. GENES EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL EN ANFIBIOS.

Los genes determinantes de sexo han sido muy bien estudiados en mamíferos, aves, reptiles y peces. En anfibios, estos mecanismos moleculares no han sido examinados a profundidad (Miura et al., 2018). Entre los genes más destacados que intervienen en la diferenciación sexual de los vertebrados están DMRT1, SOX3, SOX9, CYP19A1, CYP17A1, FOXL2 (Flament et. al, 2011; Nakamura, 2009; Tamschick, 2016).

Lamentablemente en anfibios esta rama no ha sido investigada ampliamente en todas las especies, razón por la cual nos enfocaremos en uno de los anfibios más estudiados, *Xenopus laevis*. Este anuro presenta una determinación sexual del tipo diferenciado, es decir, que la gónada bipotencial se formará directamente en ovarios o testículos. Lo que hace a este tipo de diferenciación tener una fase feminizante menos prolongada, como sucede en otros modelos de diferenciación gonadal (Nakamura, 2009). En este organismo modelo las gónadas bipotenciales serán notorias desde la formación del sistema perilinfático hasta el desarrollo de las patas traseras. Este proceso es controlado por ciertos genes como CYP19A1, CYP17A1, DMRT1, DM-W, Z-AR, etc (Faber y Nieuwkoop, 1994; Piprek et al., 2018; Roco et al., 2021).

En la vía feminizante de anfibios intervienen varios genes, pero el protagonista de este proceso es CYP19A1 un gen que se encuentra en los cromosomas X o W, codificantes de la enzima aromatasa. Esta es una enzima sumamente relevante en la síntesis de estrógenos como el estradiol y la estrona. A partir de andrógenos como la testosterona y androstenediona respectivamente, insinuando su rol como molécula feminizante (Jansson et al., 2016; Mawaribuchi et al., 2014; Nakamura, 2009; Roco et al., 2021). A pesar de que CYP19A1 se expresa tanto en testículos como en ovarios en *Xenopus laevis*, este gen muestra un incremento del mismo en los ovarios durante el desarrollo de las extremidades posteriores. Sugiriendo que esta molécula trabaja como un marcador de diferenciación femenina (Piprek et al., 2018).

Por el mismo hecho en esta especie se ha visto que CYP19A1 tiene una expresión mucho mayor en las células somáticas. Alrededor de las cavidades ováricas de organismos ZW durante la formación de sus extremidades inferiores. El mismo gen en *G. rugosa* tiene una alta actividad en los ovarios de esta especie, e incluso tiene mayor expresión en gónadas indiferenciadas de hembra. Lo que demuestra su rol en estadios tempranos de desarrollo ovárico (Nakamura, 2009).

CYP19A1 no es el único que interviene en la formación de ovarios, sino que trabaja conjuntamente con otras moléculas feminizantes. Entre ellas se encuentra el gen FOXL2, un factor de transcripción (Nakamura, 2009; Pipek et al., 2018). En caso de anfibios como *Xenopus laevis* su función inicia durante la formación de extremidades posteriores y termina cuando se forma el duodeno (Faber y Nieuwkoop, 1994; Pipek et al., 2018). Este mismo gen promueve la transcripción de la aromatasa (CYP19A1) en las gónadas de *Xenopus laevis* (Roco et al., 2021).

En el mismo organismo se ha observado que FOXL2 será expresado en ambos sexos, pero exhibirá niveles bajos de expresión en los testículos (Nakamura, 2013; Pipek et al., 2018). Este incremento en las hembras está regulado por DM-W, un gen que antagonizará la acción de DMRT1 en la determinación sexual y aumentará la expresión de FOXL2 (Roco et al., 2021). Este último factor de transcripción es considerado como un gen autosomal, que actúa de manera similar en renacuajos de *G. rugosa*, *R. silvaticus* y *Xenopus tropicalis*. Mostrando un alto potencial para ser considerado un gen determinante en anfibios (Nakamura, 2013; Pipek et al., 2018; Roco et al., 2021).

Otro factor altamente determinante es SOX3, el cual incentiva la formación de ovarios en donde se puede apreciar un bajo nivel de expresión en estadios tempranos. Con un aumento durante la formación de los ovarios en *Xenopus laevis* (Pipek et al., 2018). Este factor destaca su función como regulador de la vía feminizante al promover la expresión de CYP19A1. Entonces SOX3 es un probable candidato como regulador de la determinación sexual en anfibios y al igual que FOXL2 es un gen autosomal. Por esta razón, se considera la posibilidad de que además de los genes mencionados debe existir otro factor que estimule la expresión del gen esteroideogénico feminizante (Nakamura, 2009). Por otro lado, lo que se conoce en *G. rugosa* es que SOX3 presenta una funcionalidad parecida a *Xenopus laevis* y que su ubicación reside en los brazos largos de ZW y XY (Nakamura, 2013).

Ahora bien, los genes planteados han sido observados en todos los vertebrados, pero al referirnos a un gen determinante para sexo femenino propio de anfibios podemos encontrar a DM-W. Este gen fue encontrado en el cromosoma W de *Xenopus laevis* y se presume que se deriva de una duplicación parcial de DMRT1 (Miura et al., 2018; Nakamura, 2009). DM-W es un factor de transcripción que al parecer antagonizará la función de DMRT1. Evitando la formación de testículos y promoviendo la expresión de moléculas feminizantes, como CYP19A1 y FOXL2 para inducir el desarrollo de gónadas femeninas (Nakamura, 2009; Roco et al., 2021).

Si bien *Xenopus laevis* ha sido la especie más analizada de su clase no es la única, pues existen otras que exhiben los mismos genes que pueden manifestar la misma función o no. Un ejemplo de ello es su especie hermana *Xenopus gilli* que además de tener el mismo número cromosómico, la capacidad de hibridizar en la naturaleza y tener el mismo sistema de determinación sexual, contiene el gen DM-W. Esto no sucede con otras especies ni siquiera dentro de su mismo género aun cuando presentan el mismo patrón de desarrollo como sucede con *Xenopus tropicalis* pues en esta especie no se ha encontrado DM-W (Roco et al., 2021).

En cuanto a los genes que intervienen en la masculinización el más destacado es DMRT1, un gen ubicado en el cromosoma Z en aves o Y en el caso de los peces y mamíferos (Navara, 2018). Este gen conservado por miles de años ha adaptado su manera de operar con el fin de codificar factores de transcripción para inducir la formación de los testículos (Miura, 2017; Miura et al., 2018). DMRT1 inicia su expresión en la cresta genital durante la formación testicular post-natal y tiene su mayor nivel de expresión en las células Sertoli de organismos completamente desarrollados (Raymond et al., 1999; Miura et al., 2018).

La relevancia de este DMRT1 en los vertebrados se debe a la alta similitud en secuencia entre anfibios como *G. rugosa* y otros vertebrados (ratones, humanos, pollos y tortugas), lo que nos demuestra que este gen ha sido conservado durante la evolución (Shibata et al., 2002). Al analizar la expresión de este gen en *G. rugosa* no se observó expresión en gónadas indiferenciadas pero si en las células de Sertoli y esta expresión aumentaría 2 meses después de la metamorfosis en ranas adultas (Piprek et al., 2013; Shibata et al., 2002). En especies como *R. temporaria* y *Rana arvalis* este gen si se ve expresado en gónadas indiferenciadas (Piprek et al., 2013). Al igual que en otros vertebrados, DMRT1 tiene una expresión mayor en machos que en hembras y es un gen autosomal por lo que se requiere de otro gen para expresarse en fases tempranas del desarrollo gonadal (Flament et al., 2011; Nakamura, 2013).

El gen DMRT1 trabaja sinérgicamente con otras moléculas masculinizantes. Una de estas es AMH, glicoproteína perteneciente a la familia de genes de factores de diferenciación y crecimiento transformante beta (TGF β). Este factor es usual encontrarlo en las células sertoli del testículo fetal en la mayoría de vertebrados, debido a su contribución a la degeneración celular de los ductos mullerianos en vertebrados masculinos (Jansson et al., 2016; Piprek et al., 2018). En *Xenopus laevis* no hay expresión en las gónadas indiferenciadas, pero si se ha visto expresión en las gónadas una vez formadas. Específicamente, en los túbulos testiculares (Jansson et al., 2016; Piprek et al., 2013).

Ahora bien, al comparar la AMH entre *Xenopus laevis* y *G. rugosa* se puede apreciar que comparten una misma funcionalidad. No obstante, en *G. rugosa* su expresión si ocurre en las gónadas embrionarias a diferencia de *Xenopus laevis*. A la vez, se mostró una relación entre el gen y la regresión de ductos mullerianos que son precursores de los tractos reproductivos femeninos en vertebrados (Faber y Nieuwkoop, 1994; Jansson et al., 2016). El efecto de este gen puede variar en algunas especies. AMH también se puede encontrar en el desarrollo de ovarios en *Bufo viridis*, *R. arvalis* y *R. temporaria* aunque su expresión no fue tan fuerte como sucede en los testículos (Piprek et al., 2013).

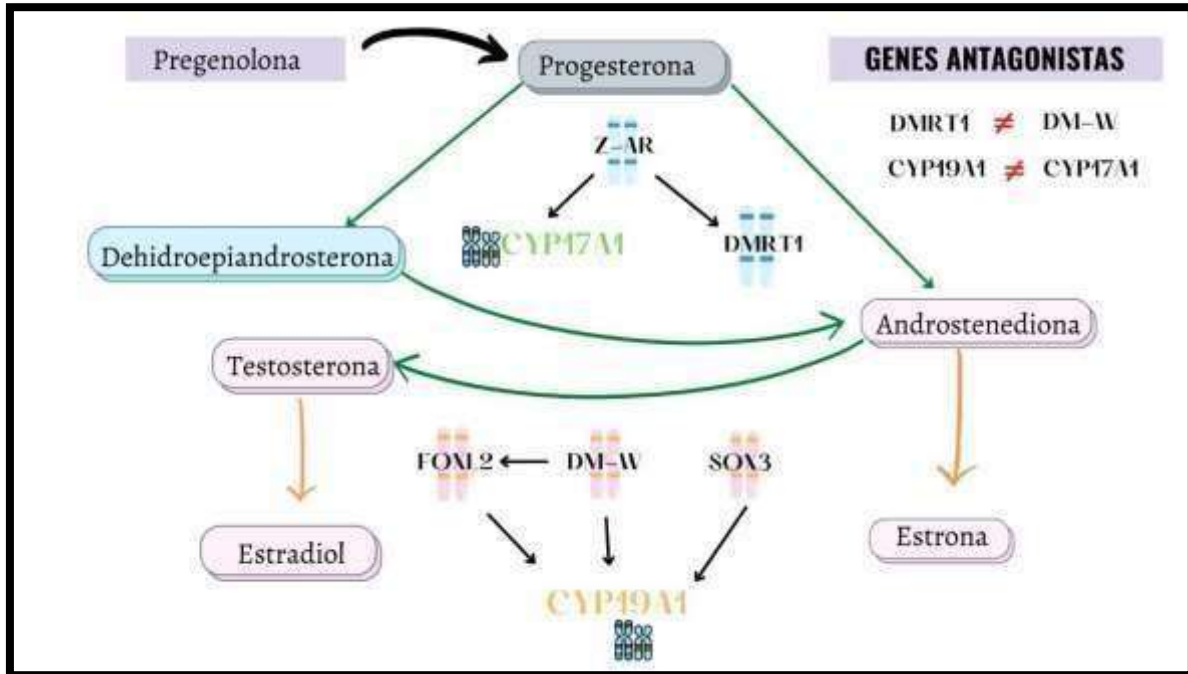


Figura 1. Mecanismo de determinación sexual en anfibios. Este proceso comienza con la producción de la progesterona que producirá 2 andrógenos: Dehidroepiandrosterona que a su vez producirá androstenediona al igual que la progesterona. A continuación, se sintetizará la androstenediona para formar la testosterona gracias a CYP17A1 que activará su expresión gracias a Z-AR que a la vez hará lo mismo con DMRT1. Enseguida se produce la formación de estrógenos como estradiol y estrona a partir de la testosterona y androstenediona respectivamente con la ayuda de la aromatasa (CYP19A1) que será promovida por DM-W, FOXL2 y SOX3.

Otro gen esteroideogénico fundamental para la vía masculinizante en vertebrados es CYP17A1, un gen que se caracteriza por codificar el citocromo P450 17A1 que transformará la progesterona en andrógenos. Gracias a su actividad como 20-liasa e hidroxilasa con el fin de convertir a la progesterona en dehidroepiandrosterona y androstenediona. A la vez estos andrógenos en androstenediona y testosterona respectivamente (Mawaribuchi et al., 2014; Nakamura, 2013; Piprek et al., 2018).

Esta molécula inicia su expresión en el inicio de la formación de las gónadas *Xenopus laevis*, casi igual que CYP19A1. Este proceso ocurre justo después de la determinación sexual donde varias masas celulares se detectaron alineadas en el eje antero posterior de las gónadas que más adelante se dispersarían (Mawaribuchi et al., 2014). De hecho, existe una expresión

10 veces mayor en organismos ZZ que en organismos ZW durante la diferenciación sexual temprana (Faber y Nieuwkoop, 1994; Mawaribuchi et al., 2014; Piprek et al., 2018). No obstante, esta molécula al igual que CYP19A1 está presente en ambos sexos (ZZ - ZW) y se verá expresada en ovarios de ranas adultas. Donde se ha discutido su participación en la síntesis de estrógeno en oocitos vitelogénicos. Además de cumplir un rol fundamental en el desarrollo de las gónadas, CYP17A1 también contribuye a la producción de progesterona, corticoide mineral y glucocorticoides (Mawaribuchi et al., 2014).

El gen CYP17A1 también se encuentra presente en *G. rugosa* junto a DMRT1, genes antagonistas a moléculas feminizantes como CYP19A1 y DM-W respectivamente de manera que las bloquean. De igual forma, estas moléculas masculinizantes mencionadas intervienen en el desarrollo de testículos. Mostrando ser sensibles a la presencia de la testosterona por medio del receptor de andrógenos (AR) de manera directa o indirecta (Fujii et al., 2014; Nakamura, 2009).

Con respecto a AR al igual que en *G. rugosa* ha sido detectado en *Xenopus laevis* y codifica para los receptores de andrógenos, pero no se obtuvo una expresión mayor o menor que la de ER (receptor de estrógenos). Entonces no tiene significancia a la hora del desarrollo gonadal en esta especie, pero si puede ser significativa en otras que se discutirá después en esta revisión (Flament et al., 2011).

En *G. rugosa* AR puede encontrarse en cualquier cromosoma sexual (Z,W, Y o X). Esto por medio de experimentos donde introducían de manera artificial Z-AR; se ha descubierto que su presencia tiene un mayor impacto a la hora de la diferenciación gonadal masculina. Al expresarse en mayor escala que en los demás cromosomas (Roco et al., 2021). Vale la pena mencionar, que este gen ya se ha considerado como un gen determinante del sexo masculino ubicado en los brazos cortos de W y X, y en los largos de Z y Y (Nakamura, 2013).

Otro elemento correlacionado en la vía masculinizante de *Xenopus laevis* proviene de la familia SOX, el gen en cuestión es SOX9. En *Xenopus laevis* se han identificado 2 parálogos de este gen que fueron potenciados en los testículos: SOX9a y SOX9b. Ambos se reconocieron en los 2 sexos y su diferencia recae en que: el primero se identificó una expresión similar en ambos sexos, mientras que en el segundo se obtuvo una mayor expresión en los testículos durante la formación de las extremidades inferiores. Después de este estadio no existió una mayor regulación (Faber y Nieuwkoop, 1994; Piprek et al., 2018).

Profundizando en el rol masculinizante de este gen en otras especies como *Xenopus tropicalis* y *G. rugosa*, se ha detectado que este gen se encuentra presente en ambos sexos. Pero al mismo tiempo observaron que se promovía más en los testículos después de 2 meses de la metamorfosis (Flament et al., 2011; Piprek et al., 2018). Continuando con las funciones de AMH, se han observado ciertas diferencias en su papel dentro de la determinación sexual entre en anfibios y mamíferos. Claro está que en ambos se muestra una regresión del ducto mulleriano para la formación de ovarios, pero en anfibios no existen registros donde SOX9 puede activar AMH (hormona anti-mulleriana) como es el caso de los mamíferos (Barrionuevo et al., 2012).

Si bien es importante conocer los genes involucrados en este mecanismo de determinación sexual, también lo es conocer los distintos sistemas de determinación sexual. Pues en cada especie pueden variar de XX/XY, ZZ/ZW o en casos raros pueden: tener ambos dependiendo de su ubicación geográfica como sucede en *G. rugosa* e inclusive un caso más raro pueden presentar genotipos ZZW siendo hembras y YWW al ser machos en *Xenopus laevis* (Schartl, 2015).

Todo esto también está directamente conectado con los genes, pues la principal distinción entre estos 2 sistemas de determinación sexual reside en la distribución de los genes. Con el fin de reconocer si esto es un factor que influye en la morfología final del anfibio. Esto debido a que en este grupo existen muchas variaciones con respecto a este rasgo.

Por ejemplo, pueden existir organismos como *G. rugosa* que tienen ambos sistemas y contienen a genes como AR, SOX3, WT1 y DMRT1. No obstante, en caso de este último gen se ha visto que se encuentra en cromosomas autosomales y no en sexuales, X o Z específicamente como sucede en otros vertebrados. En contra parte en especies de anfibios XY/XX se han identificado los siguientes genes: SF1, SOX9, AMH, FOXL2. Y en especies ZZ/ZW se han encontrado: ER, CYP17A1 y DM-W hasta el momento (Eggert, 2004; Jansson et al., 2016; Miura, 2017; Miura et al., 2018).

En cuanto a genes que comparten los anfibios con otras clases, se encuentra a DMRT1 con una alta similaridad de cDNA de este gen entre anfibios y tortugas. Algo a destacar es que este gen es uno en los que se descubrió por primera vez una expresión dependiente de la temperatura. Por lo tanto, se sugiere que estos 2 grupos pueden tener semejanzas en cuanto a su determinación sexual (Kettlewell et al., 2000; Nakamura, 2009; Shibata et al., 2002).

Sumado a esto, también se ha demostrado que DMRT1 es más abundante en la cresta genital y complejo de mesonefros a temperaturas masculinizantes que a temperaturas feminizantes en *Trachemys scripta*, (Shibata et al., 2002). Posteriormente, en la misma especie se descubrió que esta plasticidad fenotípica no solo involucraba el gen DMRT1, sino también a KDM6B por su función regulatoria en DMRT1 al unirse al promotor de este gen.

Lo que impedirá la trimetilación de H3K27 con el fin de activar la transcripción de DMRT1 y dar lugar a individuos masculinos. De cualquier modo, KDM6B no solo es un gen que se ve afectado por la temperatura, sino por tratamientos hormonales; al igual que varios genes entre ellos podemos encontrar: CYP19A1, DMRT1, FOXL2, etc. Esto exhibe cierta conexión entre los dos tipos de determinación más usados para describir el desarrollo de gónadas en vertebrados, GSD y TSD. Una prueba de ello son los organismos que presentan ambos tipos de diferenciación como *Pogona vitticeps* o los anfibios de los cuales se enfoca esta revisión de literatura (Ge et al., 2017, 2018; Li y Gui, 2018).

Ya se han visto ciertos anfibios que presentan sensibilidad a la temperatura durante su desarrollo, tal es el caso de: *Pleurodeles waltl* en donde sus larvas han sufrido inversión sexual de hembras a machos por altas temperaturas durante el periodo sensitivo a la temperatura, y a la vez se ha observado una considerable disminución en la actividad esteroidogénica de CYP19A1. Algo parecido sucede en *G. rugosa* pues disminuye la expresión del gen mencionado, pero al mismo tiempo aumenta CYP17A1 en el ovario (Nakamura, 2013). En otro artículo se menciona que 8 de cada 19 ranas transgénicas ZW de la especie mencionada, en la cuales insertaron el gen Z-AR desarrollaron gónadas intermedias. Es decir, ovotestis en las que se magnificó la expresión de CYP17A1 y DMRT1 (Fujii et al., 2014). Paralelamente, estos ovotestis también pueden formarse cuando se inserta un vector de DM-W en organismos ZZ en *G. rugosa* (Nakamura, 2009).

7. TIPOS DE DETERMINACIÓN SEXUAL

7.1. EVIDENCIA EN LOS VERTEBRADOS

En los vertebrados la determinación sexual puede ser de carácter monogénico, es decir que está controlado por un solo locus determinante de sexo o puede ser de carácter polifactorial que es controlado por más de un locus u otros factores (Luckenbach y Yamamoto, 2018). En caso de los homeotermos encontramos: a los mamíferos en donde predomina el gen SRY, un sistema monogénico estrictamente determinado por el genotipo (DSG), donde el cromosoma Y se encargará directamente del desarrollo de testículos y de evitar la formación de los ovarios. Por otro lado, en la determinación sexual en aves no se debe a la presencia de un factor sino a la ausencia del mismo (Navara, 2018).

Al contrario, en los ectotermos como los reptiles, anfibios y peces exhiben un sistema de determinación mucho más complejo en comparación con los homeotermos. Estos vertebrados de sangre fría además de presentar una determinación sexual por genotipo (DSG), también suelen mostrar una determinación sexual por factores ambientales (DSA). En un inicio la idea de esta determinación por temperatura (DST) solo era atribuida a los peces y reptiles, pero gracias a estudios posteriores surgió la evidencia científica para respaldar que los anfibios poseen un tipo de DSG asociado con factores ambientales como la temperatura y contaminantes (Lambert et al., 2019; Nakamura, 2009).

En sí esto es posible por la existencia de que en todos estos clados se muestra un periodo termo sensible en sus gónadas bipotenciales. Las cuales fijarán su sexo dependiendo del clado o especie en el que se encuentren (Flament et al., 2011). Así mismo, esto puede estar relacionado a una combinación de rasgos relacionados con la reproducción, estos pueden ser: el lugar de oviposición, características de los gametos, naturaleza de las puestas, etc. Es decir, sus modos reproductivos están relacionados con las adaptaciones reproductivas y pueden variar mucho especialmente en los anfibios al tener una gran cantidad de estrategias de reproducción.

Para ser exactos se han encontrado 74 modos reproductivos de los cuales la mayoría pertenecían a los anuros, siguiéndoles está caudata con 16 y finalizando con 7 estrategias en las cecilias según un estudio que abarco 2170 especies de anfibios. En este mismo estudio se menciona que aún falta muchas más adaptaciones de modos reproductivos por conocer en esta clase (Nunes De almeida et al., 2021; Viguera, 2010). Por lo general, estrategias como la oviposición, la colocación de huevos en depresiones del suelo, el desarrollo indirecto, entre otras, están ligadas con el ambiente y todos sus elementos (Nunes De almeida et al., 2021).

Al igual que los anfibios los peces también pueden presentar DST. Incluso esta clase ha demostrado ser mucho más estudiada, debido al gran interés en llevar a cabo varias alternativas de fijación de un solo sexo en la población dentro de la acuicultura. En un

principio se observó a *Menidia menidia*, primer pez descubierto con DST, posteriormente se fueron descubriendo más como el organismo modelo pez cebra (*Danio rerio*), etc. De igual importancia, se encontró a *Paralichthys olivaceus* el cual mostró que el incremento de temperatura afectaba las proporciones sexuales. Esto era a causa de la influencia de este factor en el nivel de cortisol que alteraba la producción de esteroides gonadales, lo que nos lleva a pensar que este tipo de mecanismo también se encuentra ligado a DSG o este se encontraba subyacente al igual que en los peces del orden Atheriniforme (Luckenbach y Yamamoto, 2018).

Consideremos ahora que todas las especies con una DSG serán consecuencia de un desencadenante genético específico de los cromosomas sexuales, acorde a esto anteriormente se creía que los anfibios presentaban únicamente este tipo de determinación. Pero hoy en día se ha demostrado lo contrario al contar con especies dentro de los géneros: *Pleurodeles*, *Hynobius*, *Bufo*, *Rana* y *Xenopus*. Los cuales muestran una influencia en su diferenciación gonadal por la temperatura (Edmands, 2021; Evans et al., 2012).

7.2. EVOLUCIÓN DE MECANISMOS DE DETERMINACIÓN SEXUAL

A continuación, analizaremos estos 2 mecanismos que se encargan de la diferenciación sexual en vertebrados. En estos individuos han surgido varias interrogantes e hipótesis de cómo y por qué surgieron. A pesar de que aún no existan respuestas claras para estas preguntas, hoy en día se construyen varias hipótesis para comprenderlas un poco mejor. En cuanto al origen de estos mecanismos antes se atribuía el carácter ancestral a la determinación sexual por temperatura (DST). En resultado a que está presente en reptiles ancestrales, sin embargo, en la actualidad se sigue debatiendo que mecanismo surgió primero DSG o DST. De igual manera se ha esclarecido que tanto DSG como DSA son altamente funcionales y adaptativos (Bull, 2015). En teoría se nos muestra la posibilidad de haber evolucionado a lo largo de una línea evolutiva, que incluye especies con un tipo de

determinación. Implicadas tanto factores genéticos como ambientales para determinar los resultados sexuales, así demostrando que estos 2 sistemas no son mutuamente excluyentes como se creía (Sarre et al., 2011). Este dato es respaldado por el hecho de que en la mayoría de casos de DSG muestran haber evolucionado varias veces dentro de un mismo clado e incluso en la misma especie (Luckenbach y Yamamoto, 2018).

Ahora bien, ¿cuál sería la razón de este suceso en la naturaleza? Pues si, por ejemplo, tomamos a uno de los vertebrados más viejos que son los cocodrilos que muestran un DST y este se ha mantenido por tanto tiempo esto debe ser resultado de un mecanismo de adaptación que se ve favorecido. Una teoría podría ser que en general el DSA se ve ventajoso frente a diferentes niveles de aptitud para cada sexo y en conjunto con condiciones ambientales fluctuantes para mantener las proporciones sexuales equilibradas (Charnov y Bull, 1977). No obstante, existen varios ejemplos donde estas proporciones se ven alteradas y no contribuyen a la aptitud así poniendo en riesgo a la población.

Antes de continuar con el razonamiento de la evolución de estos tipos de determinación de sexo, también hay que considerar el rol que juegan los mecanismos de determinación sexual en los reptiles. Este clado considerado como uno de los que contienen mayor número de reportes de DSA, abarcan varias especies con este tipo de mecanismo. Entre los más destacados se encuentran *Trachemys scripta*, *Alligator mississippiensis* y *Pogona vitticeps* o más conocido como el dragón barbudo del centro de Australia. Esta última especie al igual que *Paralichthys olivaceus* exhiben datos para creer en la evolución de estos sistemas, ya que se ha visto una transición de DSG a DSA (Luckenbach y Yamamoto, 2018). Este tipo de fenómenos en la naturaleza contienen una interrogante que finalmente se resolvió con el descubrimiento de genes similares entre peces y reptiles que se ven implicados para estos tipos de determinación. Uno de ellos es DMRT1 el cual se diferencia tan solo en 2 aminoácidos entre organismos con DSG y DST (Navara, 2018). Lo que da indicio a pensar que este puede ser un gen clave en la determinación sexual por temperatura en peces, reptiles, anfibios y todo organismo que lo incluya en su proceso de desarrollo gonadal (Navara, 2018).

Ahora retrocediendo en la escala evolutiva encontramos a los organismos principales de esta revisión, los anfibios al igual que los peces y reptiles también comparte el gen DMRT1 (Eggert, 2004). Acorde a esto los anfibios también tendrían la misma capacidad de tener DST. Por lo tanto, en un principio se creía que el sexo de estos animales era influenciado mayormente por factores ambientales. Incluso llegar a pensar que estaba estrictamente determinados por ellos, pero hace unas décadas se resolvió que eran totalmente determinados por el genotipo (Lambert et al., 2019). No obstante, hoy en día gracias a las herramientas tecnológicas, prácticas de reversión de sexo y demás, se ha develado que presentan un DSG con reversión de sexo en temperaturas y contaminación extrema. Sin embargo, esto no es tan común observarlo en su entorno natural, sino a nivel de laboratorio en varias especies. Como lo son *Pleurodeles waltl* una salamandra que exhibe machos a temperaturas altas al igual que *G. rugosa* (Lambert et al., 2019, Sarre et al., 2011).

8. DETERMINACIÓN SEXUAL POR FACTORES AMBIENTALES

8.1. TEMPERATURA

La determinación sexual por factores ambientales se ve principalmente en reptiles, peces y anfibios. Este tipo de determinación ocurre cuando los factores ambientales ocasionan modificaciones epigenéticas en el periodo termosensible de estas especies. En esta etapa del desarrollo se ven afectados genes clave por estos agentes externos; por ende, terminan actuando sobre las vías de desarrollo de gónadas sexuales (Flament, 2016; Navara, 2018). Este tipo de determinación sexual puede llegar a afectar la proporción sexual, pues existe la posibilidad de presentar reversiones de sexo en los organismos que la poseen. Lamentablemente, la identificación de estas reversiones se vuelve complicado cuando: no han sido ampliamente estudiados los genes determinantes de sexo o cuando los individuos presentan cromosomas sexuales homomórficos ambos son rasgos característicos de la clase anfibia (Ruiz-García et al., 2021).

A pesar de esto se reconoce que hay evidencia científica para respaldar que la determinación sexual de esta clase está influenciada por la temperatura. A través de experimentos realizados durante su periodo termosensible, donde señalaron que las temperaturas altas ($\sim 25^{\circ}$) generan individuos masculinos. En cuanto a las temperaturas bajas ($\sim 12^{\circ}\text{C}$) generan individuos femeninos como es el caso de varias especies como: *Hynobius retardatus*, *Bufo bufo*, *R. temporaria*, *Rana japonica*, *Lithobates catesbeianus*, *Pleurodeles waltl* (Dournon et al., 1984; Navara, 2018; Wallace et al., 1999). Existen otras hipótesis de este último escenario que exponen que el cambio de sexo también puede estar a sujeto a un retraso del desarrollo gonadal en especies que presentan las vías de desarrollo indiferenciadas o semindiferenciadas. Una vez el organismo alcance su madurez sexual exhibirá el sexo atribuido por su genotipo (Ruiz-García et al., 2021).

Aunque lo común sea observar este tipo de respuesta en el desarrollo gonadal de los anfibios, esta tendencia no es una regla. Debido a que en algunas especies de Urodela exponen proporciones sexuales mayores de hembras a altas temperaturas. Esto sugiere que la respuesta a la temperatura no está relacionada con relaciones filogenéticas, pues en *Pleurodeles poiretti* muestra el mecanismo mencionado. Mientras que en *Pleurodeles waltl* sigue la normativa de los demás anfibios (Dournon et al., 1984; Dournon et al., 1990; Ruiz-García et al., 2021). Cabe aclarar que no todos los anfibios son estimulados por la temperatura. Sirva de ejemplo el famoso *Xenopus laevis* que no exhibe este tipo de determinación sexual, pero existen híbridos de esta especie con cromosoma W que tienen una gran probabilidad de desarrollar individuos masculinos a temperaturas bajas. Como individuos femeninos en temperaturas altas (Ruiz-García et al., 2021).

Si bien existen varios agentes que influyen el desarrollo de estas especies como el pH en el pez cola de espada (*Xiphophorus helleri*), contaminantes de los cuales profundizaré más adelante, etc (Luckenbach y Yamamoto, 2018). La temperatura es uno de los factores más indagados para ser una causa directa de las inversiones sexuales presentes en la naturaleza. Tal es el caso del estudio en la platija japonés *Paralichthys olivaceus* que muestra

una correlación del incremento de la temperatura en su entorno con el nivel de cortisol. Ya que provoca la masculinización genotípica, esto gracias a que se suprime la expresión del gen CYP19A1 y por ende disminuirá la producción de estrógeno necesaria para la formación de las gónadas femeninas (Luckenbach y Yamamoto, 2018).

CYP19A1 es un gen que juegan un rol fundamental en la formación de ovarios, lo que se cree es que de alguna manera esta molécula está sujeta a la respuesta de la temperatura. Esta especulación se da por estudios en peces, donde afirman una expresión mayor de este gen en temperaturas feminizantes con el fin de acelerar la diferenciación ovárica. Por otro lado, en temperaturas masculinizantes inhiben esta molécula y se promueve la activación de DMRT1 (Guiguen et al., 2010). Esto se correlaciona con lo que sucede en *Pleurodeles waltl* por su capacidad de responder a temperaturas altas específicamente a 32°C en renacuajos ZW machos en los cuales se reducirá ER α (Receptor de estrógeno) (Ruiz-García et al., 2021).

El gen DMRT1 muestra una larga lista de datos interesantes que lo ligan directamente con DSA. En primera instancia es muy interesante la variación que se muestra en especies con DSA y DSG, pues existe un cambio de 2 aminoácidos en su estructura (Navara, 2018). Por otra parte, también como ya se mencionó anteriormente está el ejemplo de *Trachemys scripta*. En este ejemplo se evidencia una trimetilación de DMRT1 que dará lugar a una masculinización en ambientes más cálidos (Ge et al., 2017, 2018). Por consiguiente, se puede observar que la mayoría de estudios con respecto a la DSA solo estudian un gen clave. Sin embargo, existen organismos en los que este evento no solo se da por uno sino por múltiples genes como sucede con *Kryptolebias marmoratus* (Navara, 2018).

De manera adyacente, la latitud también interviene en el fenómeno que hemos estado analizando debido a su impacto en los cromosomas sexuales homomórficos en poblaciones de *R. temporaria*. Esto surge a partir de un interesante polimorfismo del gen DMRT1, que

influye en la morfología del cromosoma Y en poblaciones de Suecia. Donde se denota una relación con la latitud, refiriéndonos a que al tener una menor latitud; como sucede en el sur de este país existe una mayor proporción de machos. Mientras que al norte de este país se observa una mayor cantidad de cromosomas sexuales heteromórficos y una menor cantidad de machos. Lo que nos sugiere que también la morfología de los cromosomas lleva consigo una gran importancia en la determinación sexual (Ma y Veltsos, 2021).

Por ahora no existe una gran cantidad de información en los anfibios, pero basándonos en la información de los individuos. Con este tipo de determinación se puede evidenciar que la mayoría muestran algunos genes claves mencionados. De ahí que en este grupo se ha evidenciado un efecto parecido en su desarrollo gonadal y se puede sugerir que los anfibios pueden mostrar un mecanismo similar al de los reptiles y peces.

8.2. CONTAMINANTES

Los contaminantes presentan un grave peligro para todas las especies principalmente a los anfibios. Estos agentes teratogénicos involucran grandes repercusiones en todo aspecto a los anfibios alterando su diversidad, morfología, etc. Ya se han notificado varias malformaciones en sus estructuras al inhibir la metamorfosis como sucede en *Pleurodeles waltl* o la disminución de la tasa de fertilización y de clivaje en *Xenopus laevis*. No obstante, en este caso se va a resaltar los problemas que conllevan el contacto de contaminantes en la reproducción de los anfibios. Estos agentes pueden afectar tanto caracteres sexuales primarios como secundarios, como la laringe que afecta directamente a su canto de apareamiento (Flament, 2016; Slaby et al., 2019).

Sin embargo, los cambios más fundamentales son los que se encuentran ligados a sus aparatos reproductivos. Por ejemplo, en *Xenopus laevis* se ha probado que cloruros metálicos y el cadmio inhiben la progesterona responsable de la maduración de los oocitos; que producirán una disminución en la tasa de fertilización. Otro ejemplo es el ethyl-nylestradiol un compuesto estrogénico que ha mostrado cualidades feminizantes. Esto se puede percibir al exponer a larvas de *Xenopus tropicalis* en este compuesto que dará como resultado inversiones sexuales de machos a hembras alterando su proporción sexual (Storrs-Méndez & Semlitsch, 2010). Este contaminante, que se encuentra en la fórmula de algunas pastillas anticonceptivas, causa la hipertrofia de los ductos mullerianos (precursores del tracto reproductivo femenino) en *Pleurodeles waltl*. De manera similar funciona el bisfenol A, un compuesto que interviene en la producción industrial de plásticos policarbonados, lo que facilita su contaminación en cuerpos de agua. Esto para después resultar en un aumento de inversiones sexuales al desarrollar oocitos testiculares (Flament, 2016; Hecker et al., 2006; Tamschick, 2016).

Al mismo tiempo, existen algunos herbicidas que al igual que etinil-estradiol y el bisfenol A tienen la capacidad de alterar el desarrollo gonadal de los anfibios. Estos son el glifosato y la atrazina, el glifosato funciona como un perturbador endocrino al inducir alteraciones en la actividad aromatasa en tejido no ovárico (Bach, 2018). Por otra parte, la atrazina es un herbicida que incrementa la actividad de la aromatasa en la determinación sexual en anfibios. Como consecuencia ha mostrado alterar la relación de sexos en *L. pipiens*,

Acris blanchardi y *Xenopus laevis* al incrementar la cantidad de hembras. En esta última especie mencionada también se ha observado otras consecuencias de la exposición de este compuesto y son las siguientes: disminución en la testosterona, reducción de la espermatogénesis, supresión en el comportamiento de apareamiento y disminución en la fertilidad (Bach, 2018; Hayes et al., 2010; Olmstead et al., 2009).

Ahora bien, un disruptor endocrino que ha demostrado ser masculinizante es 117β -trenbolone. Este compuesto es un esteroide androgénico anabólico que normalmente se usa en el ganado para promover el crecimiento. Sin embargo, en anfibios como *Xenopus laevis* ha demostrado intervenir en la diferenciación sexual de manera que su exposición da lugar a inversiones sexuales que aumentarían el número de machos en la población (Flament, 2016).

9. DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA Y SU RELACIÓN CON EL CALENTAMIENTO GLOBAL

El incremento inusual de temperatura en los últimos años gracias a los gases invernaderos producidos por actividades antropológicas; son los responsables directos del calentamiento global y por ende de la extinción de muchas especies (Mitchell y Janzen, 2010). Este problema reside en los cambios fenológicos que sufren ciertas especies. En caso de los anfibios ya se ha visto varias repercusiones en el crecimiento larval, su supervivencia y el desarrollo embrionario (Urban et al., 2014).

Sin embargo, existe un aspecto del desarrollo de estos animales que se toma mucho en cuenta y es la capacidad poco conocida de la inversión sexual, la cual trae consigo más de un problema. Entre estas consecuencias esta la alteración de la constitución genética, el desbalance de proporción sexual, la extinción de cromosomas sexuales y cambios en el sistema de determinación del sexo (Nemesházi et al., 2021).

Al mismo tiempo como ya se ha discutido antes este fenómeno de la inversión, como consecuencia de factores externos podría estar ligado a sus adaptaciones reproductivas. Por ejemplo, en caso de algunos géneros de anuros como *Xenopus*, *Bufo* y en salamandras como *Pleurodeles* que son caracterizados por un desarrollo indirecto. Esto quiere decir que realizan la metamorfosis y a la vez dependen de cuerpos de agua. Que serán los que generen más individuos inversos de sexo al haber una continua exposición a temperaturas extremas y

contaminantes. Sin embargo, también los no acuáticos pueden verse afectados por la misma situación, ya que algunos presentan la estrategia de colocar sus huevos en pequeñas depresiones en el suelo que podrían ser afectados por el efecto de la isla urbana. De lo contrario, en especies como *Eleutherodactylus coqui* las cuales presentan un desarrollo directo, no dependen de cuerpos de agua o algún anfibio que solo tenga la adaptación de irse desarrollando en la espalda del parental es menos probable que sufra este fenómeno de inversión sexual (Nunes De almeida et al., 2021; Sallaberry, 2008).

Una de las principales consecuencias estudiadas en otros grupos como reptiles y aves es la proporción sexual sesgada dentro de las poblaciones. Ya que una pieza fundamental en la población es la heterogeneidad. La razón que este acontecimiento sea un gran obstáculo comienza a notarse cuando existe un declive en la población debido a la ausencia de hembras o machos. Una vez existe este declive puede presenciarse la extinción, debido a un efecto cuello de botella causado por algún evento estocástico demográfico o ambiental, que finalmente resultara en la desaparición de hembras o machos culminando con aquella especie (Mitchell y Janzen, 2010; Nemesházi et al., 2021).

Por otro lado, un escenario alternativo en el que podría darse el mismo resultado es combinando este desbalance de sexos con la extinción de cromosomas ya mencionado anteriormente. Pues en este caso, existe la posibilidad de que el sexo contrario al que está desapareciendo pierda el interés en el momento de la búsqueda de la pareja. Esto sucede al momento de perder un cromosoma y cambiar solo el fenotipo del organismo este no expresaría caracteres sexuales secundarios importantes a la hora de elegir pareja en caso de que este rasgo esté ligado a tal cromosoma (Nemesházi et al., 2021). Por ejemplo, en una población de anfibios existe una mayor proporción de hembras y una proporción menor de machos gracias a la inversión sexual por temperatura. En esta población existirían hembras invertidas que no pueden realizar el canto característico de los machos de su especie y este siendo un rasgo necesario fundamental para atraer a las demás hembras, no se podría dar la copula así disminuyendo aún más la población hasta terminar en la extinción de la especie.

La inversión sexual también puede ser la causante de la pérdida de diversidad genética debido a que con este desbalance de sexos se presenta una pérdida de heterocigosidad en gran medida (Mitchell y Janzen, 2010). Esta inequidad en la proporción de sexos se ha visto más afectada hacia las especies que presentan una masculinización por las altas temperaturas como sucede en anfibios y aves (Edmands, 2021). Una explicación de por qué los anfibios fueron los más afectados, es por la relación de este sexo con el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* el cual es más propenso en machos que en hembras (Adams et al., 2017; Mitchell y Janzen, 2010).

A la vez esto se podría deber a que la mayoría de anfibios se encuentra en zonas neotropicales, lo que los hace más vulnerables a cambios drásticos de clima al no tener un rango de aclimatación vasto y estar adaptados tan solo a fluctuaciones de temperatura relativamente estables (Mitchell y Janzen, 2010). Por esta razón, es fundamental conocer la equivalencia de la temperatura constante de incubación de estos organismos al medir no solo la media de temperatura de incubación sino también las fluctuaciones durante el día de la misma. De la misma manera, es importante reconocer los principales genes reguladores y promotores responsables de la determinación sexual en anfibios especialmente en los que se encuentran en zonas neotropicales (Navara, 2018).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-moneim, A., Coulter, D. P., Mahapatra, C. T., y Sepúlveda, M. S. (2015). Intersex in fishes and amphibians: Population implications, prevalence, mechanisms and molecular biomarkers. En *Journal of Applied Toxicology* (Vol. 35, Número 11, pp. 1228–1240). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jat.3204>
- Adams, A. J., Kupferberg, S. J., Wilber, M. Q., Pessier, A. P., Grefsrud, M., Bobzie, S., Vredenburg, V. T., y Briggs, C. J. (2017). Extreme drought, host density, sex, and bullfrogs influence fungal pathogen infection in a declining lotic amphibian. *Ecosphere*, 8(3). <https://doi.org/10.1002/ecs2.1740>
- Adolfi, M. C., Nakajima, R. T., N, R. H., y Schartl, M. (2019). Intersex, Hermaphroditism, and Gonadal Plasticity in Vertebrates : Evolution of the Mullerian Duct and Amh / Amhr2 Signaling. *Annu*, 7(October), 149–172.
- Bach, N. (2018). Efectos de herbicidas sobre la diferenciación sexual de *Leptodactylus latrans*. *Unidad Nacional de la Plata* 148, 148–162. <https://doi.org/10.35537/10915/68799>

- Ballestas, O., Lampo, M., y Rodríguez, D. (2021). Living with the pathogenic chytrid fungus: Exploring mechanisms of coexistence in the harlequin toad *Atelopus cruciger*. *PLoS ONE*, *16*(7 July), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254439>
- Barrionuevo, F. J., Burgos, M., Scherer, G., y Jiménez, R. (2012). Genes promoting and disturbing testis development. *Histology and Histopathology*, *27*(11), 1361–1383. <https://doi.org/10.14670/HH-27.1361>
- Benvenuto, C., y Weeks, S. (2020). Hermaphroditism and gonochorism. En R. Cothran, y M. Thiel, *The Natural History of the Crustacea: Reproductive Biology: Volume VI* (pág. 197). New York: Oxford University Press.
- Bull, J. J. (2015). Reptile sex determination goes wild. *Nature*, *523*(7558), 43–44. <https://doi.org/10.1038/523043a>
- Bustamante, M. R., Ron, S. R., y Coloma, L. A. (2005). Cambios en la diversidad en siete comunidades de anuros en los Andes de Ecuador. *Biotropica*, *37*(2), 180–189. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00025.x>
- Chardard, D., Desvages, G., y Pieau, C. (1995). Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex reversal by thermal treatment effect. *General and Comparative Endocrinology*. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016648085710891>
- Chardard, D., y Dournon, C. (1999). Sex reversal by aromatase inhibitor treatment in the newt *Pleurodeles waltl*. *Journal of Experimental Zoology*, *283*(1), 43–50. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990101\)283:1<43::AID-JEZ6>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990101)283:1<43::AID-JEZ6>3.0.CO;2-G)
- Charnov, E., y Bull, J. (1977). When is sex environmentally determined? *Nature*, *266*, 828–832. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/865602/>
- Collenot, A., Durand, D., Lauthier, M., Dorazi, R., Lacroix, J. C., y Dournon, C. (1994). Spontaneous sex reversal in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibia): Analysis of its inheritance. *Genetical Research*, *64*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1017/S0016672300032535>
- Connallon, T. (2009). Evolutionary Consequences of Sex Linkage and Sex-Specific Selection. *University of Michigan*, 48–78. <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/64677>
- Cotton, S., y Wedekind, C. (2009). Population consequences of environmental sex reversal. *Conservation Biology*, *23*(1), 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.01053.x>
- de Sá, R. (2005). Crisis Global De Biodiversidad: Importancia De La Diversidad Genética y la Extinción De Anfibios. *Agrociencia*, *9*(1–2).
- Dournon, C., Guillet, F., Boucher, D., y Lacroix, J. C. (1984). Cytogenetic and genetic evidence of male sexual inversion by heat treatment in the newt *Pleurodeles poireti*. *Chromosoma*, *90*(4), 261–264. <https://doi.org/10.1007/BF00287033>
- Dournon, C., Houillon, C., y Pieau, C. (1990). Temperature sex-reversal in amphibians and Reptiles. *Int J Dev Biol*. 1990 Mar;34(1):81-92. PMID: 2393628

- Dufresnes, C., Brelsford, A., Baier, F., y Perrin, N. (2021). When Sex Chromosomes Recombine Only in the Heterogametic Sex: Heterochiasmy and Heterogamety in Hyla Tree Frogs. *Molecular Biology and Evolution*, 38(1), 192–200. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa201>
- Edmands, S. (2021). Sex Ratios in a Warming World: Thermal Effects on Sex-Biased Survival, Sex Determination, and Sex Reversal. *Journal of Heredity*, 155–164. <https://doi.org/10.1093/jhered/esab006>
- Eggert, C. (2004). Sex determination: the amphibian models. *Reproduction, nutrition, development*, 44(1), 341–352. <https://doi.org/10.1051/rnd>
- Evans, B. J., Furman, B. L. S., Cauret, C. M. S., Knytl, M., Song, X.Y., Premachandra, T., Ofori-Boateng, C., Jordan, D. C., y Horb, M. E. (2020). A frog with three sex chromosomes that co-mingle together in nature: *Xenopus tropicalis* has a degenerate W and a Y that evolved from a Z chromosome. *PLoS Genetics*, 16(11), 1–27. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009121>
- Evans, B. J., Pyron, R. A., y Wiens, J. J. (2012). Polyploidy and genome evolution. *Polyploidy and Genome Evolution*, 9783642314(October 2012), 1–415. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31442-1>
- Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F., y Marshall Graves, J. A. (2006). Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems. *Current Biology*, 16(17), 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.021>
- Faber, J., y Nieuwkoop, P. (1994). Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin): A Systematical y Chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. Garland Science. ISBN 9780815318965
- Falconi, R., Dalpiaz, D., y Zaccanti, F. (2004). Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura) 1. Sex differentiation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(5), 378–388. <https://doi.org/10.1002/jez.a.20069>
- Farias, C. F., Carvalho-e-Silva, S. P., y De Brito-Gitirana, L. (2002). Bidder's organ of *Bufo ictericus*: A light and electron microscopy analysis. *Micron*, 33(7–8), 673–679. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(02\)00022-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(02)00022-7)
- Flament, S. (2016). Sex Reversal in Amphibians. *Sexual Development*, 10(5–6), 267–278. <https://doi.org/10.1159/000448797>
- Flament, S. A., Chardard, D., Chesnel, A., y Dumond, H. G. A. (2011). Sex Determination and Sexual Differentiation in Amphibians. *Hormones and Reproduction of Vertebrates - Volume 2*, 2, 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374931-4.10001-X>
- Fujii, J., Kodama, M., Oike, A., Matsuo, Y., Min, M. S., Hasebe, T., Ishizuya-Oka, A., Kawakami, K., y Nakamura, M. (2014). Involvement of androgen receptor in sex determination in an amphibian species. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093655>

- Ge, C., Ye, J., Weber, C., Sun, W., Zhang, H., Zhou, Y., Cai, C., Qian, G., y Capel, B. (2018). The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science*, *360*(6389), 645–648. <https://doi.org/10.1126/science.aap8328>
- Ge, C., Ye, J., Zhang, H., Zhang, Y., Sun, W., Sang, Y., Capel, B., y Qian, G. (2017). Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development (Cambridge)*, *144*(12), 2222–2233. <https://doi.org/10.1242/dev.152033>
- Goldberg, J. (2013). A first case of bilateral hermaphroditism in a wild-caught tadpole (*Scinax fuscovarius*). *Herpetological Journal*, *23*(3), 167–169.
- Grafe, T. U., y Linsenmair, K. E. (1989). Protogynous Sex Change in the Reed Frog *Hyperolius viridiflavus*. *Copeia*, *1989*(4), 1024. <https://doi.org/10.2307/1445989>
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., y Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 352–366. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.002>
- Guzman, K., y Ballejos, M. (2017). *Análisis citogenético y olecular del ADN repetitivo en anfibios*. Universidad de Jaén.
- Haczkiwicz, K., y Ogielska, M. (2013). Diferenciación sexual de gónada en anfibios: Cómo los testículos se vuelven más cortos que los ovarios. *Ciencia Zoológica*, *30*(2), 125–134. <https://doi.org/10.2108/zsj.30.125>
- Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, *281*(5), 373–399. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<373::AID-JEZ4>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<373::AID-JEZ4>3.0.CO;2-L)
- Hecker, M., Murphy, M., Coady, K., Villeneuve, D., Jones, P., Carr, J., Solomon, K., Smith, E., Van der Kraak, G., Gross, T., Du Preez, L., Kendall, R., y Giesy, J. (2006). *Reviews of environmental contamination and toxicology* (G. Ware (ed.); 187a ed.). Springer.
- Hillis, D. M., y Green, D. M. (1990). Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *Journal of Evolutionary Biology*, *3*(1–2), 49–64. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1990.3010049.x>
- Ito, M. (2020). Instability of Sex-Determining Systems in Frogs. *Gene Expression and Phenotypic Traits*, 1–7. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89050>
- Jansson, E., Mattsson, A., Goldstone, J., y Berg, C. (2016). Sex-dependent expression of anti-Müllerian hormone (amh) and amh receptor 2 during sex organ differentiation and characterization of the Müllerian duct development in *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology*, *229*, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.018>

- Kettlewell, J. R., Raymond, C. S., & Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26(3), 174. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1526-968x\(200003\)26:3<174::aid-gene2>3.3.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1526-968x(200003)26:3<174::aid-gene2>3.3.co;2-a)
- Lambert, M. R., Tran, T., Kilian, A., Ezaz, T., y Skelly, D. K. (2019). Molecular evidence for sex reversal in wild populations of green frogs (*Rana clamitans*). *PeerJ*, 2019(2), 1–21. <https://doi.org/10.7717/peerj.6449>
- Li, X.Y., y Gui, J. F. (2018). An epigenetic regulatory switch controlling temperature-dependent sex determination in vertebrates. *Science China Life Sciences*, 61(8), 996–998. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9314-3>
- Luckenbach, J. A., y Yamamoto, Y. (2018). Genetic & Environmental Sex Determination in Cold-blooded Vertebrates : Fishes , Amphibians , and Reptiles. En *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edi, Vol. 6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20553-0>
- Ma, W. J., y Veltsos, P. (2021). The diversity and evolution of sex chromosomes in frogs. *Genes*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040483>
- Mawaribuchi, S., Ikeda, N., Fujitani, K., Ito, Y., Onuma, Y., Komiya, T., Takamatsu, N., y Ito, M. (2014). Cell-mass structures expressing the aromatase gene *Cyp19a1* lead to ovarian cavities in *Xenopus laevis*. *Endocrinology (United States)*, 155(10), 3996–4005. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1096>
- Merchnt-Larios, H., y Villalpando, I. (1981). Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *The Anatomical Record*, 199(3), 349–360. <https://doi.org/10.1002/ar.1091990305>
- Mitchell, N. J., y Janzen, F. J. (2010). Temperature-Dependent sex determination and contemporary climate change. *Sexual Development*, 4(1–2), 129–140. <https://doi.org/10.1159/000282494>
- Miura, I. (2008). An evolutionary witness: The frog *Rana rugosa* underwent change of heterogametic sex from XY male to ZW female. *Sexual Development*, 1(6), 323–331. <https://doi.org/10.1159/000111764>
- Miura, I., Takase, M., y Nakamura, M. (2018). Sex determination and differentiation in amphibians. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, 43(4), 462–469.
- Miura, I. (2017). Sex determination and sex chromosomes in Amphibia. *Sexual Development*, 11(5–6), 298–306. <https://doi.org/10.1159/000485270>
- Miura, I., Ohtani, H., Ogata, M., y Ezaz, T. (2016). Evolutionary Changes in Sensitivity to Hormonally Induced Gonadal Sex Reversal in a Frog Species. *Sexual Development*, 10(2), 79–90. <https://doi.org/10.1159/000445848>
- Montero, R. (2009). Sistemática y filogenia de los Vertebrados Sistemática y filogenia de los Vertebrados. *Tercera edición*. Tucumán. Editorial independiente 1–4. ISBN: 978-987-42-9556-9.

- Munday, P. L., Buston, P. M., y Warner, R. R. (2006). Diversity and flexibility of sex-change strategies in animals. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(2), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.020>
- Nagahama, Y., Chakraborty, T., Paul-Prasanth, B., Ohta, K., y Nakamura, M. (2021). Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological reviews*, 101(3), 1237–1308. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2019>
- Nakamura, M. (2013). Is a sex-determining gene(s) necessary for sex-determination in amphibians? Steroid hormones may be the key factor. *Sexual Development*, 7(1–3), 104–114. <https://doi.org/10.1159/000339661>
- Nakamura, M. (2009). Sex determination in amphibians. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(3), 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.003>
- Navara, K. J. (2018). *Mechanisms of Environmental Sex Determination in Fish, Amphibians, and Reptiles*. 213–240. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71271-0_10
- Nemesházi, E., Gál, Z., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Mikó, Z., Üveges, B., Lefler, K. K., Jeffries, D. L., Hoffmann, O. I., y Bókony, V. (2020). Novel genetic sex markers reveal high frequency of sex reversal in wild populations of the agile frog (*Rana dalmatina*) associated with anthropogenic land use. *Molecular Ecology*, 29(19), 3607–3621. <https://doi.org/10.1111/mec.15596>
- Nemesházi, E., Kövér, S., y Bókony, V. (2021). Evolutionary and demographic consequences of temperature-induced masculinization under climate warming: the effects of mate choice. *BMC ecology and evolution*, 21(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01747-3>
- Nunes De almeida, C. H. L., Haddad, C. F. B., y Toledo, L. F. (2021). A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra*, 57(3), 413–427.
- Ogielska, M., y Kotusz, A. (2004). Pattern and Rate of Ovary Differentiation with Reference to Somatic Development in Anuran Amphibians. *Journal of Morphology*, 259(1), 41–54. <https://doi.org/10.1002/jmor.10162>
- Ogielska, M. (2009). *Reproduction of amphibians*. New Hampshire, EEUU: Science publishers.
- Olmstead, A. W., Kosian, P. A., Korte, J. J., Holcombe, G. W., Woodis, K. K., y Degitz, S. J. (2009). Sex reversal of the amphibian, *Xenopus tropicalis*, following larval exposure to an aromatase inhibitor. *Aquatic Toxicology*, 91(2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.aquatoXenopus2008.07.018>
- Panthum, T., Singchat, W., Laopichienpong, N., Ahmad, S. F., Kraichak, E., Duengkae, P., Muangmai, N., Kitana, N., y Srikulnath, K. (2021). Genome-Wide SNP Analysis of Male and Female Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus*, Supports a Non-Genetic Sex Determination System. *Diversity*. 1–12. <https://doi.org/10.3390/d13100501>

- Perrin, N. (2021). Sex-chromosome evolution in frogs: What role for sex-antagonistic genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1832). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0094>
- Piprek, R. P., Damulewicz, M., Kloc, M., y Kubiak, J. Z. (2018). Transcriptome analysis identifies genes involved in sex determination and development of *Xenopus laevis* gonads. *Differentiation*, 100, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.02.004>
- Piprek, R. P., Pecio, A., Laskowska-Kaszub, K., Kubiak, J. Z., y Szymura, J. M. (2013). Sexual dimorphism of AMH, DMRT1 and RSPO1 localization in the developing gonads of six anuran species. *International Journal of Developmental Biology*, 57(11–12), 871–875. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130192rp>
- Raymond, C. S., Kettlewell, J. R., Hirsch, B., Bardwell, V. J., y Zarkower, D. (1999). Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Developmental Biology*, 215(2), 208–220. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9461>
- Roco, Á. S., Ruiz-García, A., y Bullejos, M. (2021). Testis development and differentiation in amphibians. *Genes*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/genes12040578>
- Ruiz-García, A., Roco, Á. S., y Bullejos, M. (2021). Sex Differentiation in Amphibians: Effect of Temperature and Its Influence on Sex Reversal. *Sexual Development*, 15(1), 157–167. <https://doi.org/10.1159/000515220>
- Sallaberry, M. (2008). *Desarrollo larvario y estrategias reproductivas en anfi bios. Herpetología en Chile*. 333-357. <https://www.researchgate.net/publication/269404306>
- Sánchez, A., Rincón, E. J., y Rueda, L. A. (2021). Histology and structure of the testicles in three species of atelopus frogs (Anura: Bufonidae) endemic to the sierra nevada de Santa Marta, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 69(3), 811–828. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i3.44727>
- Sarre, S. D., Ezaz, T., y Georges, A. (2011). Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12, 391–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082410-101518>
- Schartl, M. (2015). Sex determination by multiple sex chromosomes in *Xenopus tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10575–10576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513518112>
- Schmid, M., Steinlein, C., Feichtinger, W., y Bogart, J. P. (2014). Chromosome banding in amphibia. XXXI. the neotropical anuran families centrolenidae and allophrynidae. *Cytogenetic and Genome Research*, 142(4), 268–285. <https://doi.org/10.1159/000362216>
- Shibata, K., Takase, M., y Nakamura, M. (2002). The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *General and Comparative Endocrinology*. 127, 232–241. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12225764/>

- Silberschmidt Freitas, J., Franco-Belussi, L., y De Oliveira, C. (2015). Morphological and histochemical studies of Bidder's organ in *Rhinella schneideri* (Amphibia: Anura) males. *Italian Journal of Zoology*, 82(4), 479–488. <https://doi.org/10.1080/11250003.2015.1042934>
- Slaby, S., Marin, M., Marchand, G., y Lemiere, S. (2019). Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environmental Pollution*, 248, 478–495. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.014>
- Stelkens, R. B., y Wedekind, C. (2010). Environmental sex reversal, Trojan sex genes, and sex ratio adjustment: Conditions and population consequences: INVITED REVIEW. *Molecular Ecology*, 19(4), 627–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04526.x>
- Storrs-Méndez, S. I., y Semlitsch, R. D. (2010). Intersex gonads in frogs: Understanding the time course of natural development and role of endocrine disruptors. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314(1 B), 57–66. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21310>
- Tamschick, S. (2016). Sex-linked molecular markers and their application to endocrine disruption research in Amphibian. *Scientific reports*.144. https://www.researchgate.net/publication/299526601_Sex_reversal_assessments_reveal_different_vulnerability_to_endocrine_disruption_between_deeply_diverged_anuran_lineages
- Tarvin, R. D., Peña, P., y Ron, S. R. (2014). Changes in Population Size and Survival in *Atelopus spumarius* (Anura: Bufonidae) Are Not Correlated with Chytrid Prevalence. *Journal of Herpetology*, 48(3), 291–297. <https://doi.org/10.1670/11-269>
- Tezak, B., Sifuentes-Romero, I., Milton, S., y Wyneken, J. (2020). Identifying Sex of Neonate Turtles with Temperature-dependent Sex Determination via Small Blood Samples. *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61984-2>
- Tolosa, A. (2021). Cromosomas: Qué son los cromosomas y por qué son importantes. *Genotipia*. Recuperado de: <https://genotipia.com/cromosomas/>
- Urban, M. C., Richardson, J. L., y Freidenfelds, N. A. (2014). Plasticity and genetic adaptation mediate amphibian and reptile responses to climate change. *Evolutionary Applications*, 7(1), 88–103. <https://doi.org/10.1111/eva.12114>
- Valenzuela, N., Literman, R., Neuwald, J. L., Mizoguchi, B., Iverson, J. B., Riley, J. L., y Litzgus, J. D. (2019). Extreme thermal fluctuations from climate change unexpectedly accelerate demographic collapse of vertebrates with temperature-dependent sex determination. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40597-4>
- Veloso, A., e Iturra, P. (1979). Posibilidades Del Analisis Citogenetico En Un Estudio De Bando Cromosomico En Dos Especies De Anfibios (Anura-Leptodactylidae). *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, 12(1), 91–96.

- Viguera, A. O. (2010). Mecanismos de Determinación Sexual. *Universidad Zaragoza*.
<https://docplayer.es/14902153-Mecanismos-de-determinacion-sexual-aida-olivan-viguera.html>
- Wallace, H., Badawy, G. M. I., y Wallace, B. M. N. (1999). Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55(6–7), 901–909.
<https://doi.org/10.1007/s000180050343>
- Witschi, E. (1929a). Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. I. Development and sexual differentiation of the gonads of *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology*, 52(2), 235–265. <https://doi.org/10.1002/jez.1400520202>
- Witschi, E. (1929b). Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. III. rudimentary hermaphroditism and Y chromosome in *Rana temporaria*. *Journal of Experimental Zoology*, 54(2), 157–223. <https://doi.org/10.1002/jez.1400540202>
- Wylie, C. C. (1980). Primordial Germ Cells in Anuran Embryos: Their Movement and Its Guidance. *American institute of biological sciences*, 30(1), 27–31.
- Wylie, C. C., Bancroft, M., y Heasman, J. (1976). The formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*. II. A scanning electron microscope study. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35(1), 139–148.
- Zechner, U., y Hameister, H. (2011). Sex chromosomes in vertebrates: XX/XY against ZZ/ZW. *Sexual Development*, 5(5), 266–271. <https://doi.org/10.1159/000331233>