

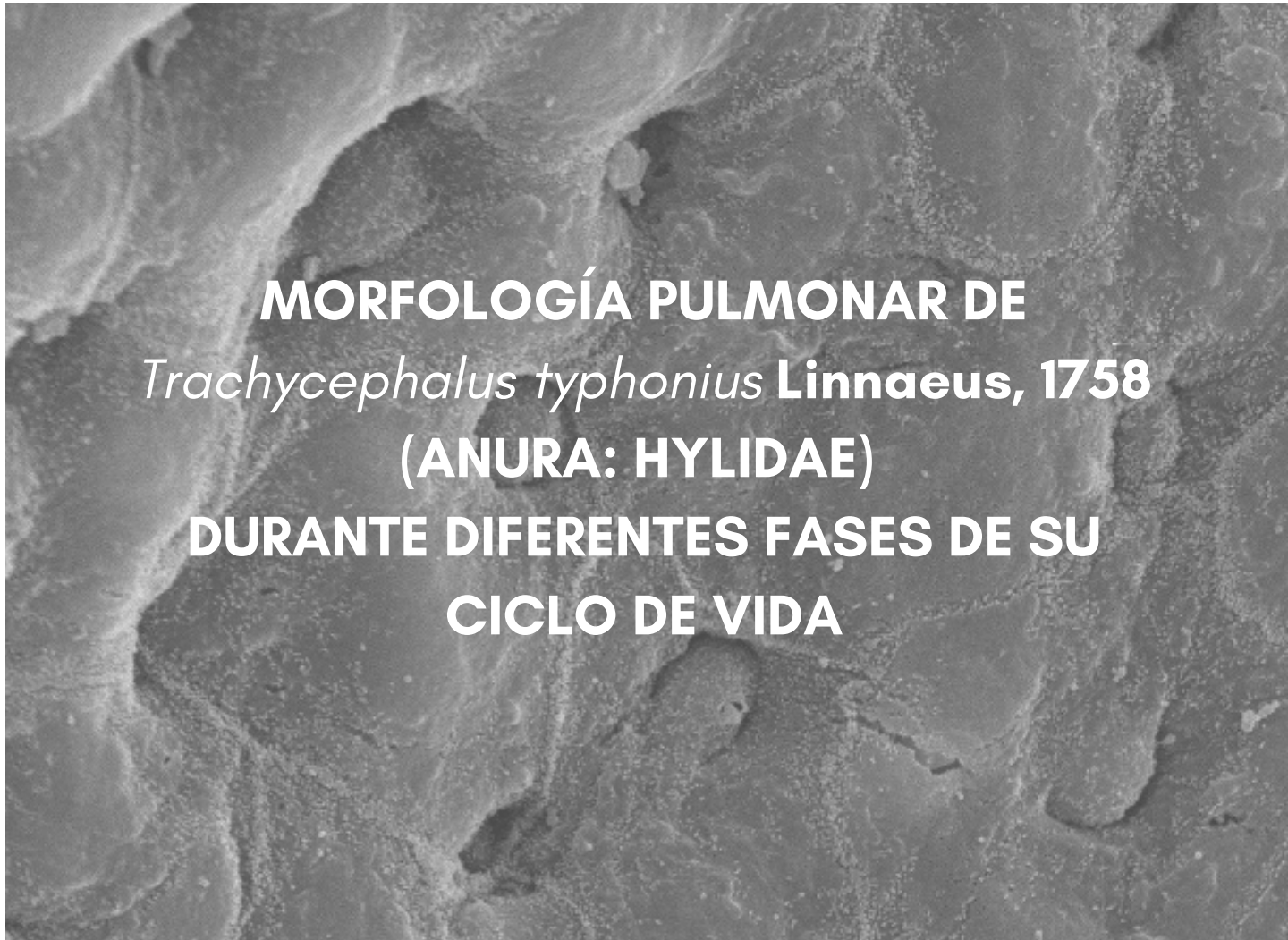


Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Trabajo Final de Graduación



MORFOLOGÍA PULMONAR DE
Trachycephalus typhonius **Linnaeus, 1758**
(ANURA: HYLIDAE)
DURANTE DIFERENTES FASES DE SU
CICLO DE VIDA

Alumna: Lenain, Victoria Malvina

Director: Zaracho, Víctor Hugo

Co-director: Sandoval, María Teresa

Laboratorio de Herpetología

Año: 2019

ÍNDICE

Contenido

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
Origen y fundamentos de la investigación.....	5
Antecedentes del tema	6
OBJETIVOS	8
Objetivo general.....	9
Objetivos particulares	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Descripción de la especie en estudio.....	9
Material de estudio	10
Técnicas de preparación y observación de muestras	10
RESULTADOS	11
Periodo prometamórfico	11
Periodo de clímax metamórfico.....	21
Adulto	26
DISCUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	34

AGRADECIMIENTOS

Muchos son los motivos por los cuales agradecer el haber tenido la posibilidad de transitar este camino que me forjó de experiencias que me ayudaron a crecer en lo personal y en lo profesional.

Estoy muy agradecida de haber tenido la oportunidad de formarme profesionalmente en el sistema de educación pública de mi país en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste. Asimismo, con los docentes que participaron de mi construcción, tanto en conocimientos como en valores.

Agradezco profundamente a mis directores, Víctor y Teté, por su buena predisposición, su tiempo, su paciencia y su confianza desde mis inicios como alumna adscripta y becaria.

A mis compañeras y amigas del laboratorio, que en mayor o en menor medida, todas aportaron a mi formación. Especialmente a Fiama y Fernanda que me acompañan desde mis comienzos.

A uno de los mejores regalos de estos años, mis queridos amigas y amigos: personas excepcionales e incondicionales con las que amo compartir y construir.

A mis amigas y amigos de siempre, que a veces más lejos, a veces más cerca, de alguna u otra manera, compartieron conmigo y me acompañaron durante estos años.

A mi familia, que me apoya y acompaña desde siempre, e intenta comprender mis ausencias y lo que esta vocación significa para mí. Especialmente, a mi hermana Lucía y a mi mamá, por su inquebrantable incondicionalidad, a pesar de tanto, todos estos años.

RESUMEN

Los estudios morfológicos son de gran importancia ya que permiten realizar análisis con enfoques taxonómicos, filogenéticos, ecológicos, fisiológicos y evolutivos. Asimismo, son la base de estudios ontogenéticos. La ontogenia de un organismo comprende su ciclo de vida completo, desde la fecundación hasta su muerte. Los anfibios, particularmente los anuros, son excelentes modelos para el estudio del desarrollo ya que, entre otras características, tienen alta fecundidad, son de fácil obtención y cría en el laboratorio. Estrictamente, en cuanto a la fisiología respiratoria, también son interesantes dado que durante el ciclo de vida, los anfibios llevan a cabo el intercambio gaseoso a través de distintas estructuras como las branquias, la piel o los pulmones. En el periodo larval, los anuros pueden realizar el intercambio gaseoso a través de las branquias, la piel y/o los pulmones. Esto dependerá, por ejemplo, del tipo de larva, condiciones del hábitat, entre otros factores. Este trabajo aborda particularmente el desarrollo de los pulmones, órganos que, si bien son característicos de los periodos juvenil y adulto, empiezan a desarrollarse desde el periodo larval. El periodo larval, en el cual los pulmones comienzan a ser funcionales, varía entre los grupos de anuros, pudiendo ocurrir en etapas larvales tempranas previas a la metamorfosis o durante el clímax metamórfico. Pocos estudios abordaron la morfología y desarrollo pulmonar en estadios larvales, y en general, los estudios realizados en adultos, un poco más numerosos, se enfocan en descripciones de la macroestructura y de la estructura histológica. En este contexto, se analizó la estructura pulmonar de *Trachycephalus typhonius* Linnaeus, 1758 durante diferentes fases de su ciclo de vida a través de la descripción y comparación de la morfología pulmonar externa, la ultraestructura del epitelio y de la organización histológica de la pared pulmonar. Se utilizaron individuos en estadios larvales, metamórficos, postmetamórficos y adultos fijados en formol al 10% y Bouin, y conservados en alcohol al 70%. Para los análisis macroscópicos se utilizaron una lupa binocular Leica EZ4 con cámara digital incorporada. Para el análisis y la descripción de la ultraestructura del epitelio se utilizaron técnicas convencionales de MEB; y para los análisis histológicos, se siguió el protocolo convencional de histología y las observaciones se realizaron bajo microscopio Leica DM500 con cámara Leica ICC 50 HD incorporada. Se observó que la estructura pulmonar de *T. typhonius* varía en diferentes periodos de su ciclo de vida, con diferencias marcadas en la estructura pulmonar de los estadios larvales y de clímax metamórfico en comparación con la fase adulta. Estas diferencias están relacionadas con el incremento de la vascularización y el desarrollo secuencial de los septos pulmonares de distintos órdenes. La maduración y el desarrollo completo del pulmón ocurriría en el periodo juvenil. En este sentido, sería interesante profundizar el estudio de la morfología pulmonar durante este periodo a fin de completar la secuencia de eventos morfogenéticos del desarrollo pulmonar. Complementariamente, se espera que estos resultados contribuyan a futuros estudios que aborden de manera integral el desarrollo de los pulmones en vertebrados.

INTRODUCCIÓN

Origen y fundamentos de la investigación

La morfología es una fuente tradicional de caracteres en estudios taxonómicos y filogenéticos, y una herramienta fundamental para comprender los procesos ontogenéticos. La ontogenia es el proceso vital completo del individuo desde el momento de la fecundación, pasando por todas las etapas del periodo embrionario, las etapas juveniles, subadultas, de madurez sexual, vejez hasta el final de su vida (Lobo 2010). Estas etapas, en la práctica, han sido estandarizadas en estadios discretos para una identificación más clara de los eventos del desarrollo, y para poder realizar comparaciones válidas entre estudios, así como también entre diferentes taxones (Tubbs *et al.* 1993). Entre los vertebrados, los anfibios particularmente los anuros, son excelentes modelos para el estudio del desarrollo ya que, entre otras características, tienen alta fecundidad y son de fácil obtención y cría en el laboratorio.

Los anfibios realizan el intercambio gaseoso a través de diferentes órganos a lo largo de su vida. Estos órganos incluyen los pulmones, las branquias internas y externas, la piel interna de la boca y la faringe (epitelio bucofaríngeo) y la piel externa que pueden especializarse en distintas estructuras respiratorias (Duellman & Trueb 1986). Mientras que la piel puede funcionar tanto en la respiración acuática como en la aérea, las branquias solo funcionan en el agua y los pulmones solo en el aire. En la mayoría de los anfibios anuros, las estructuras que participan en el intercambio gaseoso varían durante el ciclo de vida, siendo las branquias características del periodo larval y los pulmones, exclusivos del estado juvenil y adulto. Sin embargo, las larvas pueden utilizar las branquias, la piel y/o los pulmones para el intercambio gaseoso (Burggren & West 1982, Burggren & Infantino 1994, Viertel & Richter 1999, Ultsch *et al.* 1999, Hoff *et al.* 1999). El uso de estas superficies respiratorias varía según el tipo de larva, las características del hábitat (uso de pulmones en ambientes anóxicos, por ejemplo) o cuando la cavidad bucofaríngea y las branquias están obstruidas por una alimentación intensa (Downie *et al.* 2009).

Los pulmones, si bien son estructuras características del adulto, se desarrollan durante el periodo larval como sacos simples de paredes delgadas. Aunque las larvas ventilan sus pulmones en desarrollo mediante bombeos producidos por la cavidad bucofaríngea, su función respiratoria no ha sido confirmada (Viertel & Richter 1999). El momento específico del desarrollo en el cual comienza la ventilación pulmonar, varía ampliamente, pero ocurre previamente a la metamorfosis en muchas especies (Burggren & Pinder 1991, Rose & James 2013) y puede estar determinado por factores ambientales, tales como la temperatura, disponibilidad de oxígeno, riesgo de predación o el modo de alimentación (Burggren & Infantino Jr. 1994). Se ha observado que cuando la concentración de oxígeno en el agua disminuye, las larvas de algunas especies responden aumentando sus migraciones a la superficie para ventilar los pulmones (Ultsch *et al.* 1999), lo que

sugiere que los pulmones complementarían la respiración branquial. Por ejemplo, en condiciones normales de oxígeno, las larvas de *Pseudis platensis* Gallardo, 1961 obtienen el 96% del oxígeno del agua a través de branquias y la piel, pero bajo condiciones de hipoxia, pueden obtener hasta el 76% del oxígeno del aire a través de los pulmones (De Souza & Kuribara 2006). En *Lithobates catesbeianus* (Shaw 1802), el momento en el que empiezan a respirar aire atmosférico está determinado por factores ambientales tales como la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (Burggren & Infantino Jr. 1994). La morfología pulmonar de los anuros, particularmente durante el periodo larval y metamórfico del ciclo de vida, es poco conocida. En este contexto, los aportes acerca de su estructura en diferentes momentos del desarrollo son de utilidad para caracterizar la morfogénesis de este órgano y podrían servir de base para interpretar aspectos de la anatomía funcional.

Antecedentes del tema

El desarrollo y la morfología del pulmón solo se conoce para algunas especies como *Xenopus laevis* Daudin, 1802 (Viertel & Richter 1999, Rose & James 2013), *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 (Müller & Sprumont 1972) y *Lithobates pipiens* Schreber, 1782 (Waterman 1939). Estos trabajos detallan características macroestructurales, como también la estructura histológica.

En *Xenopus laevis*, los pulmones aparecen como dos evaginaciones en forma de bolsillos ventrolaterales del intestino anterior aproximadamente en el E. 35-36 Nieuwkoop/Faber, el cual se corresponde con el E. 19-20 de la Tabla de Gosner (1960). Estos primordios se originan a partir de una cresta transversal que separa la región bucofaríngea del tracto digestivo. Una cresta horizontal divide la cavidad ventral primaria del hígado y la cavidad dorsal de la tráquea. Durante el desarrollo, los pliegues del epitelio pulmonar, el tejido conectivo y los vasos sanguíneos rodean los sacos pulmonares. Los pulmones se expanden posterodorsolateralmente y se extienden hasta los pronefros (Viertel & Richter 1999). Antes de las primeras inspiraciones, la tráquea y los bronquios están bien formados, los pulmones se extienden a lo largo de casi toda la longitud de la cavidad pleuroperitoneal, y las superficies ventrales de la tráquea, bronquios, pulmones y esófago, están recubiertos por un peritoneo fuertemente pigmentado. Luego de las primeras inspiraciones hay una marcada expansión del lumen de la tráquea, de los bronquios y pulmones, y un adelgazamiento de las paredes anteriores de los pulmones en una membrana delgada con células aplanadas; las paredes pulmonares en el extremo posterior permanecen con varias células de grosor. Cada bronquio adquiere forma de bolsa (divertículo bronquial) y se extiende dorsalmente hasta la región de la ventana oval de la cápsula ótica y músculos dorsales (Rose & James 2013).

En *Pelophylax ridibundus*, evaginaciones ventrolaterales del esófago son visibles antes que el primer nefrostoma. Posteriormente, los sacos pulmonares se extienden más allá de los pronefros y la cámara de la laringe se hace visible. Las paredes lateral y ventral del esófago constituyen el

esbozo del aditus laríngeo. Cuando el músculo dilatador de la laringe abre el aditus laríngeo, los cartílagos de la laringe aún están ausentes (Muller & Sprumont 1972).

Waterman (1939) describe para *Lithobates pipiens* que el pulmón se origina como una evaginación endodérmica del piso de la faringe. En un estadio de opérculo tardío, esta evaginación consiste en una capa simple de células cúbicas. Posteriormente, los esbozos pulmonares consisten en una sola capa de células aplanadas rodeadas por tejido conjuntivo laxo y no se observan células musculares. Cuando la larva alcanza una longitud de 13,5 mm se observan células musculares ahusadas debajo del tejido epitelial todavía plano. Asimismo, se distinguen algunas hebras de tejido conectivo entre la capa de células musculares y la pleura. Cuando la larva alcanza los 40,1 mm las células musculares se extienden en toda la longitud del pulmón y el epitelio se vuelve cúbico. Debajo del tejido muscular, se encuentran en desarrollo venas que forman un plexo rudimentario. Las mismas posteriormente, quedan rodeadas por hebras de tejido epitelial y muscular que crecen entre los espacios del plexo venoso y se extienden como procesos hacia la luz de la cavidad pulmonar. Es así como inicia el crecimiento de los septos pulmonares. Cuando emergen las extremidades posteriores, la musculatura que rodea los vasos venosos se engrosa en sus márgenes internos y forma una red que permanece asociada a los bordes internos del plexo venoso. Hacia el ápice de los pulmones, la musculatura y los vasos sanguíneos se observan bien desarrollados. El epitelio es casi columnar pero aún no se observan cilios, como en el estado adulto.

Otros trabajos hacen referencias a algunas características morfológicas e histológicas de algunos estadios larvales. Por ejemplo, Downie *et al.* (2009), describe la estructura del pulmón de *Pseudis paradoxa* (Linnaeus, 1758) a partir del estadio 37, y hasta el 45. En dichos estadios, los pulmones están bien desarrollados, con una gran cantidad de subdivisiones internas y paredes bien vascularizadas. Por otra parte, según Downie *et al.* (2009), en algunos bufónidos, los pulmones permanecen como esbozos hasta la metamorfosis, por lo que la ventilación de los pulmones iniciaría durante el clímax metamórfico (Burggren e Infantino Jr. 1994). En *Rana esculenta* Linnaeus, 1758 se observó que la red capilar se hace más densa durante la metamorfosis (Strawinski 1956).

La estructura pulmonar de los anuros, a semejanza de lo descrito para “reptiles” es de tipo faveolar. El lumen está subdividido por septos que aumentan la superficie respiratoria y se interconectan y delimitan cámaras pequeñas denominadas faveolos. Los faveolos son subdivisiones internas que se abren a una única cámara central del pulmón (Kardong 2018). Hermida (2003) caracterizó la anatomía e histología del sistema respiratorio de adultos de *Rhinella arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*. En su trabajo clasifica a los pulmones de estas especies teniendo en cuenta el tipo de parénquima y la distribución del parénquima.

La morfología e histología de los pulmones adultos ha sido descrita para *Lithobates pipiens* (Waterman 1939), *Hyla arborea* Linnaeus, 1758 (Goniakowska-Witalinska 1986), *Chiromantis petersii* Boulenger, 1882 (Maina 1989), *Rhinella arenarum* Hensel, 1867 (Hermida *et*

al. 1998), *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* Weyenbergh, 1875 (Hermida *et al.* 2002), *Pseudis paradoxa* (Downie *et al.* 2009) y en *Xenopus laevis* (Meban 1973, Rose & James 2013). Estos trabajos demuestran semejanzas en la estructura histológica de la pared pulmonar, el epitelio respiratorio y los septos. Sin embargo, existen diferencias en el tipo de septos presentes en las especies.

La pared del pulmón está constituida de afuera hacia adentro por: un epitelio de células planas (pleuroperitoneo), una delgada capa de tejido conjuntivo con fibroblastos, células musculares, cromatóforos y vasos sanguíneos y un epitelio respiratorio formado por neumocitos y capilares sanguíneos (Atkinson & Just 1975, Goniakowska- Witalinska 1986, Viertel & Richter 1999). Los septos se desarrollan como repliegues del epitelio respiratorio y del tejido conjuntivo. De modo general, presentan un eje central y un ápice constituido por un vaso sanguíneo rodeado por un casquete de células musculares lisas. Los septos se clasifican de acuerdo al tipo de epitelio que rodea el casquete muscular el cual puede ser cilíndrico ciliado con células caliciformes (septos primarios), cilíndrico ciliado sin células caliciformes (septos secundarios) o epitelio respiratorio (septos terciarios) (Hermida *et al.* 1998, 2002).

En este trabajo se abordan aspectos de la morfología y ontogenia pulmonar de *Trachycephalus typhonius* con el fin de profundizar los conocimientos acerca del desarrollo de los pulmones. Asimismo, se pretende aportar datos que en futuros estudios contribuyan a interpretar aspectos de la fisiología respiratoria pulmonar durante la fase acuática del ciclo de vida y sus adaptaciones a diferentes condiciones ambientales en relación a la disponibilidad de oxígeno en el agua.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Conocer la estructura y ultraestructura pulmonar de *Trachycephalus typhonius* durante diferentes fases de su ciclo de vida.

Objetivos particulares

1. Analizar la morfología macroscópica del pulmón durante la fase larval, metamórfica y adulta.
2. Comparar la ultraestructura interna entre las distintas fases.
3. Describir la estructura histológica del pulmón en diferentes fases del ciclo ontogenético.

Hipótesis de trabajo

- La macro y microestructura del pulmón varían a lo largo de la ontogenia del individuo.

Predicción

- Conforme avanza el desarrollo del individuo la estructura pulmonar adquiere una mayor complejidad, expresada en un incremento de la vascularización y de la aparición secuencial de los septos pulmonares de distintos órdenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la especie en estudio

Trachycephalus typhonius es una rana nocturna que se refugia en bromelias, agujeros de árboles o debajo de la corteza de éstos. También en fundas de heliconias o plátanos durante la estación seca. En cuanto a su reproducción, es explosiva después de fuertes lluvias, encontrándose cerca de estanques temporales (Savage 2002). El desarrollo larval hasta llegar a la metamorfosis demora entre 37 y 47 días (Zweifel 1964, Pyburn 1967). Después de que el amplexo ocurre en el agua, las hembras ponen huevos en una película en la superficie del agua. En estadios larvales tempranos (E. 21) sus larvas tienen branquias externas muy grandes, probablemente como adaptación a la vida en aguas cálidas con bajo nivel de oxígeno (Zweifel 1964). Además, cuentan con grandes pulmones que los hacen aptos para la vida en estanques pequeños. Las larvas, se alimentan de algas planctónicas y raspando superficies debajo del agua (Savage 2002), mientras que los adultos se alimentan de diferentes insectos pequeños (Zweifel 1964, Pyburn 1967). Su distribución abarca un amplio rango en el centro y norte de Sudamérica y vive en bosques de tierras bajas que pueden ser secos o húmedos (Savage 2002).

Material de estudio

Las larvas utilizadas provienen de una puesta de *Trachycephalus typhonius* juntada en un área periurbana de la ciudad de Corrientes, Argentina en enero de 2018. Embriones y larvas fueron criados en laboratorio en recipientes plásticos con agua declorinada y alimentadas *ad libitum* con lechuga hervida. Periódicamente, las larvas fueron sacrificadas en distintos estadios del desarrollo hasta completar la metamorfosis por una sobredosis de solución de aminobenzoato de etilo al 5% (Muelitas ®) agregada al agua de cría, según lo recomendado por el Committee of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists (Beaupre *et al.* 2004). Para el análisis macroscópico, las larvas fueron fijadas en formol al 10% y para los análisis histológicos, en solución de Bouin y conservadas en alcohol 70%. Los estadios (E.) larvales fueron determinados de acuerdo a la tabla de Gosner (1960). Para el estudio se seleccionaron larvas premetamórficas (E. 25), prometamórficas (E. 26, 27, 28, 29, 35 y 38) y en climax metamórfico (E. 42 y 46). Asimismo, se analizaron dos individuos adultos colectados en la misma localidad de procedencia de las larvas, que fueron sacrificados por una sobredosis de solución de aminobenzoato de etilo al 5% (Muelitas ®) aplicada de forma tópica en la región abdominal y región interna de muslos. Posteriormente, se procedió a la extracción de pulmones, que fueron seccionados en varias partes y fijados en formol al 10% para los análisis anatómicos, o en solución de Bouin para los análisis histológicos. Los individuos fueron conservados en alcohol 70%. La terminología empleada para la descripción del parénquima pulmonar adulto sigue a Hermida (2003). Los especímenes analizados serán incorporados a la Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Noreste (UNNEC).

Técnicas de preparación y observación de muestras

Para la observación y análisis macroscópico de los pulmones se realizaron disecciones ventrales, removiendo diferentes órganos y dejando expuestos los pulmones. Las observaciones y fotografías se tomaron con lupa binocular Leica EZ4 con cámara digital incorporada.

Para la obtención de preparados histológicos de los pulmones en distintos estadios del desarrollo, se prosiguió de acuerdo al protocolo convencional de histología consistente en: deshidratación en soluciones crecientes de alcohol etílico (70, 80, 96 y 100%), alcohol butílico (100%), impregnación en alcohol butílico-parafina (50-50%) e inclusión en parafina (100%). Se realizaron cortes seriados de 5 y 7 micras con micrótopo rotatorio y las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE). Las observaciones se realizaron en microscopio Leica DM500 con cámara Leica ICC 50 HD incorporada. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el software ImageJ 1.48v.

La preparación de las muestras para MEB se realizó según el siguiente protocolo: lavado con solución buffer-fosfato 0,1 M, deshidratación en soluciones crecientes de acetona y agua destilada (12,5; 25; 50; 75; 100%), secado a punto crítico y metalización con oro-paladio. Las observaciones se realizaron en un Microscopio JEOL JSM-5800 perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la SGCyT-UNNE.

RESULTADOS

De manera general, los pulmones se observaron como dos evaginaciones dorsolaterales en la región anterior de la cavidad pleuroperitoneal, con forma de saco y de longitud variable según el estadio de desarrollo. Se ubicaron a ambos lados de la aorta dorsal en la región anterior y a ambos lados de la musculatura epiaxial en la región media y posterior. Histológicamente, en la pared del pulmón, se reconocieron: 1, una membrana pleuroperitoneal externa muy delgada conformada por mesotelio uniestratificado de células planas; 2, una capa de tejido conjuntivo laxo con fibras musculares lisas dispersas, fibroblastos, vasos sanguíneos y cromatóforos; 3, un epitelio respiratorio interno formado por neumocitos con procesos citoplasmáticos que recubren los capilares sanguíneos. Los neumocitos presentaron forma redondeada o plana y se caracterizaron por tener un núcleo intensamente basófilo y cromatina granular.

Periodo prometamórfico

Morfología externa

En los E. 27- 28 los pulmones presentaron una forma irregular, con el extremo anterior más ensanchado que el extremo posterior, de aspecto traslúcido y con escasos cromatóforos dispersos en la superficie externa. En la región anterior se reconocieron pequeñas lobulaciones, mientras que la posterior es de contorno liso. En la cara ventromedial se reconoció la vena pulmonar en desarrollo, acompañada por cromatóforos a su alrededor (Figura 1a). En esta etapa, este vaso se extiende hasta la región media del pulmón.

En los E. 29, 35 y 38 los pulmones se observaron más conspicuos que en estadios previos y con mayor número de cromatóforos en la pared. Se observó un mayor desarrollo de la vena pulmonar que, a diferencia del E. 27, se reconoce como una estructura conspicua desde la región anterior hasta la posterior, más pigmentada y con múltiples ramificaciones laterales dispuestas a intervalos más o menos regulares (Figura 1b, c y d).

Histología y MEB

Estadios 27-28

A nivel histológico el pulmón presenta una pared delgada, constituida por: mesotelio pleuroperitoneal, tejido conjuntivo con cromatóforos y epitelio respiratorio con abundantes capilares sanguíneos, y una luz pulmonar amplia (Figura 2a, b y d). En la cara ventromedial se observó la vena pulmonar mientras que en la cara dorsolateral se reconoció la arteria pulmonar (Figura 2b), ambos vasos constituidos por un endotelio rodeado por una delgada capa de tejido conjuntivo, con cromatóforos (Figura 2e). Bajo MEB se reconoció una extensa red de capilares en la cara interna de la pared pulmonar. Los cuerpos celulares de los neumocitos no son evidentes (Figura 4a y b).

Teniendo en cuenta la estructura de la pared pulmonar y tamaño de la luz pulmonar, se reconocieron tres regiones: anterior, media y posterior.

La región anterior (Figura 2a-e) presentó forma irregular, una luz amplia y una delgada pared de la cual se originaron algunos septos primarios constituidos por tejido conjuntivo con fibroblastos y cromatóforos, rodeados por epitelio respiratorio con abundantes capilares sanguíneos. En el ápice de los septos se observó un pequeño grupo de células acidófilas, dispuestas a modo de casquete (Figura 2c).

La región media (Figura 2f y g) presentó similares características que la región anterior, aunque no se observaron septos. En la cara ventromedial y dorsolateral, y en asociación con la respectiva vena y arteria pulmonar, se observó una delgada capa células musculares lisas (Figura 2g).

La región posterior (Figura 3a-c), en comparación con las otras regiones, presentó una luz reducida, y contorno irregular debido a los pliegues de la pared pulmonar. Se observó un tejido conectivo más desarrollado que en otras regiones, constituido por células globosas (Figura 3c). Al igual que en la región media, no se observaron septos. Asimismo, hacia la luz pulmonar se reconocieron grupos de células de intensa acidofilia dispuestas a modo de bandas en distintas zonas de la pared pulmonar (Figura 3b y c).

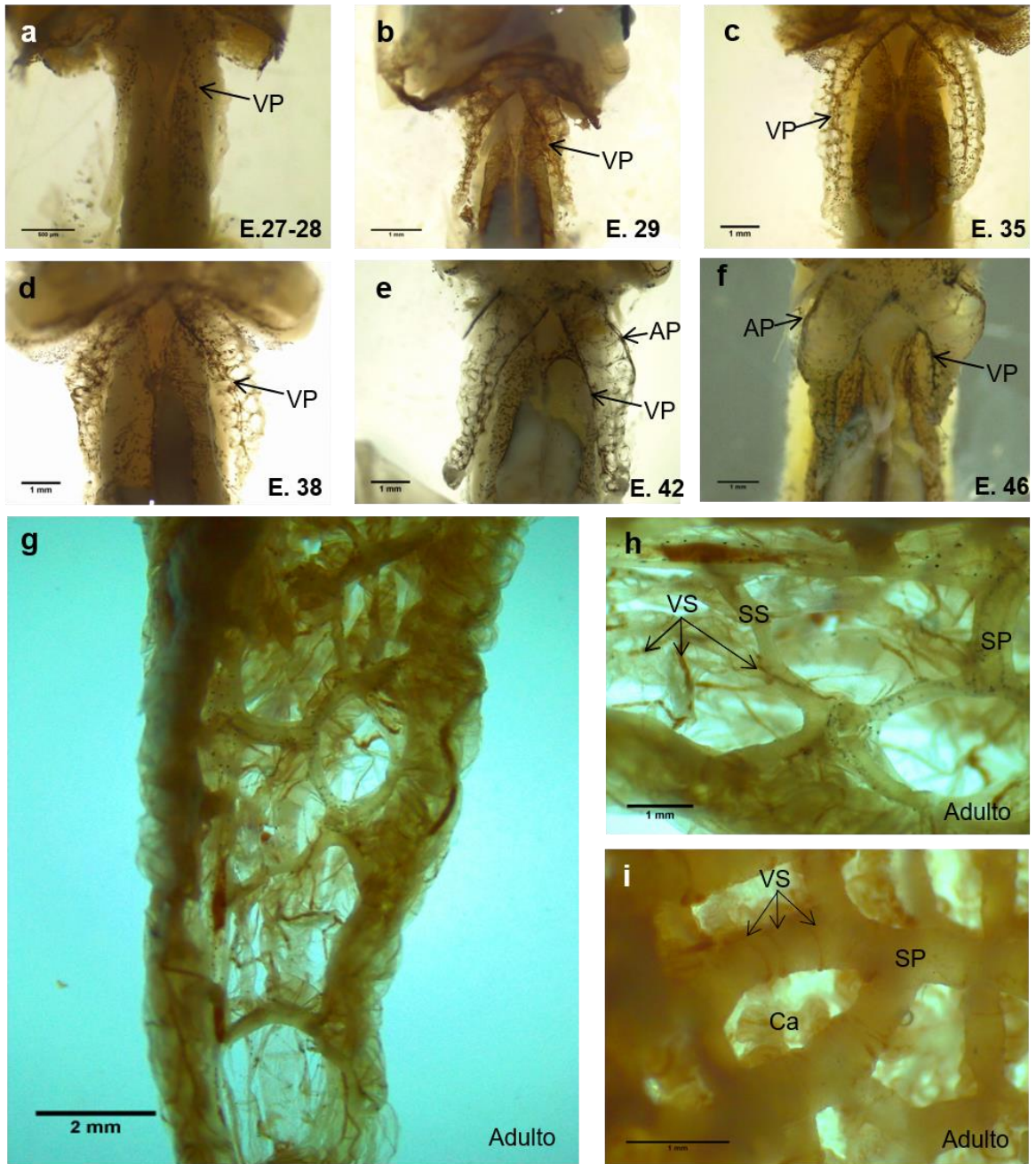


Figura 1. Vista externa de pulmones de *Trachycephalus typhonius* en estadios larvales prometamórficos (a-d), estadios de climax metamórfico (e y f). g-i) Vista interna del pulmón del adulto. h) Detalle de la cara interna de la pared pulmonar. i) Detalle de septos primarios. Referencias: **AP:** Arteria pulmonar, **Ca:** Cámara, **SP:** Septo primario, **SS:** Septo secundario, **VP:** Vena pulmonar, **VS:** Vaso sanguíneo.

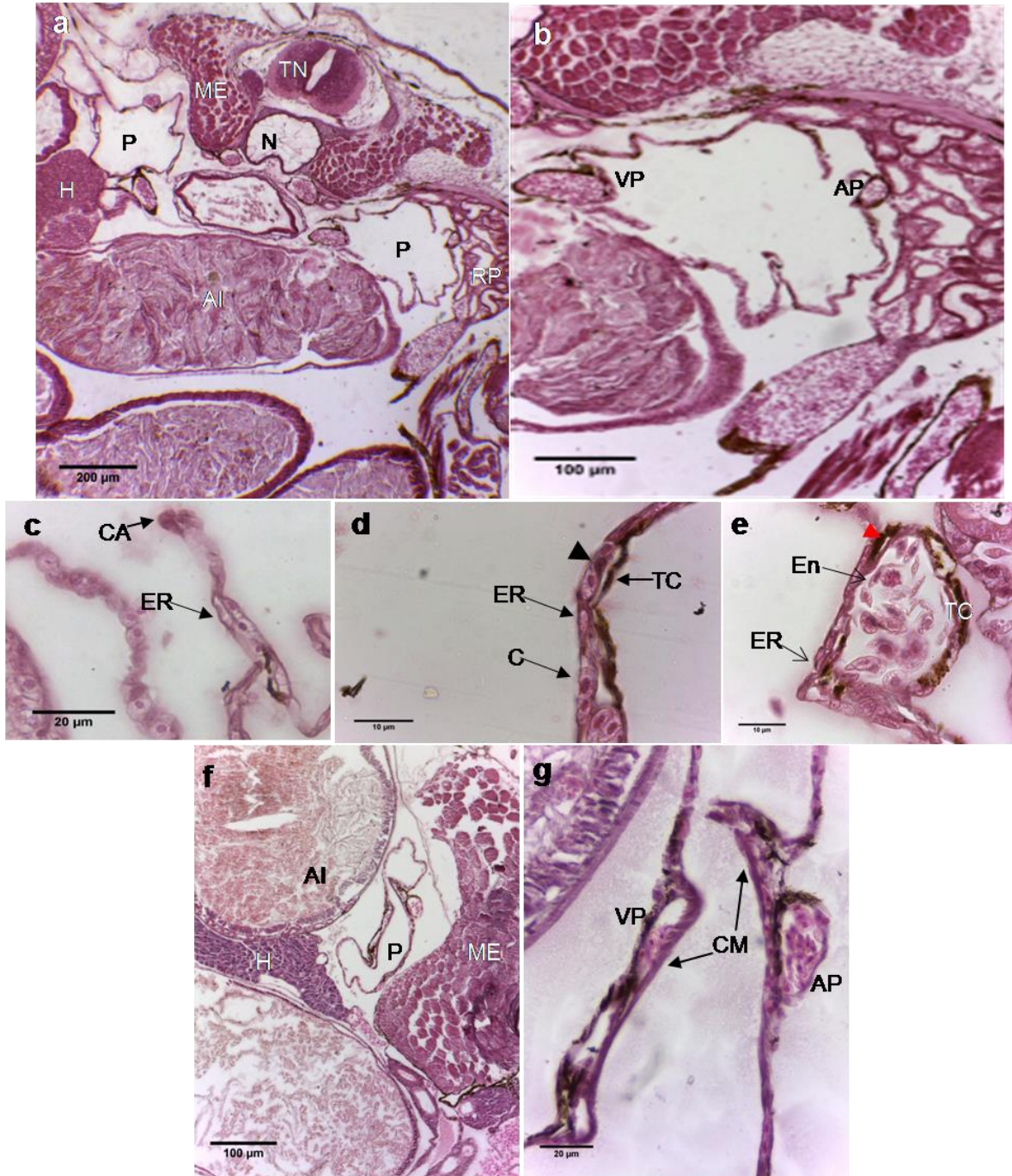


Figura 2. Secciones histológicas de la región anterior (a-e) y media (f y g) del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 28. a) Vista general de la sección de la larva. b) Detalle del pulmón. c) Detalle de vaso sanguíneo. d) Detalle de septo primario. e) Detalle de la pared pulmonar. f) Vista general del pulmón. g) Detalle de la pared pulmonar. Referencias: AI: Asas intestinales, AP: Arteria pulmonar, C: Capilares, CA: Células acidófilas, CM: Células musculares, En: Endotelio, ER: Epitelio respiratorio, H: Hígado, ME: Musculatura epiaxial, N: Notocorda, P: Pulmón, RP: Riñón Pronéfrico, TC: Tejido conectivo, TN: Tubo neural, VP: Vena pulmonar, *: Vasos sanguíneos, ▲: Cromatóforos, ▲: Neumocito.

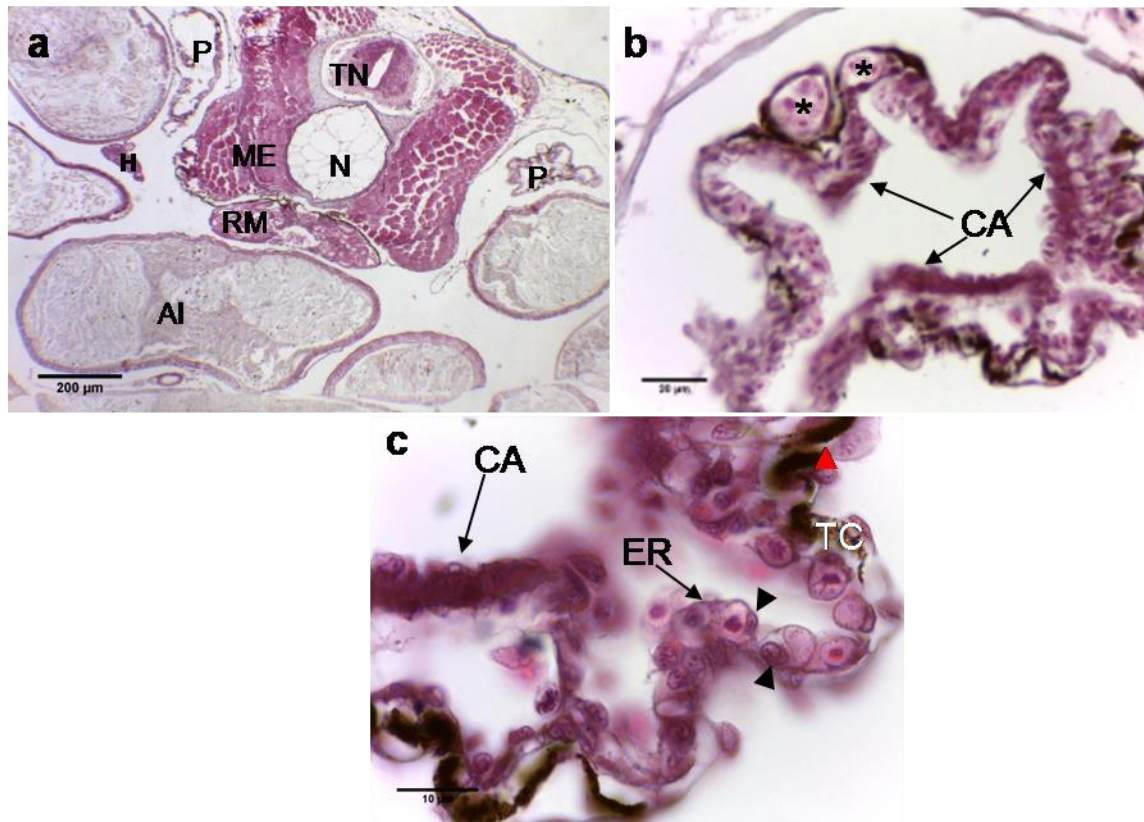


Figura 3. Secciones histológicas de la región posterior del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 28. a) Vista general de la sección de la larva. b) Vista general del pulmón. c) Detalle de la pared del pulmón. Referencias: **AI**: Asas intestinales, **CA**: Células acidófilas, **ER**: Epitelio respiratorio, **H**: Hígado, **ME**: Musculatura epiaxial, **N**: Notocorda, **P**: Pulmón, **RM**: Riñón mesonéfrico, **TC**: Tejido conectivo, **TN**: Tubo neural, *: Vasos sanguíneos, ▲: Cromatóforo, ▲: Neumocito.

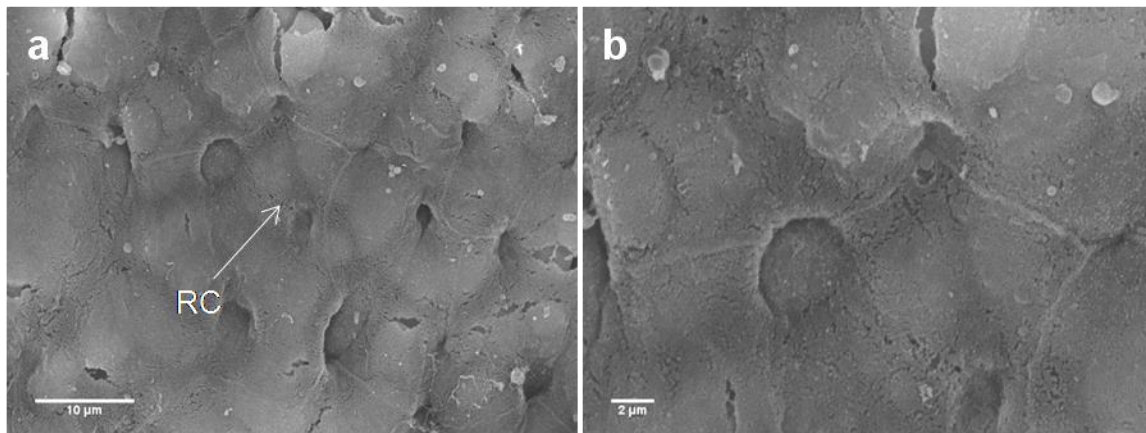


Figura 4. Microfotografías de MEB de la superficie interna del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 28. a) Vista general de la red capilar. b) Detalle de la red capilar. Referencias: **RC**: Red capilar.

Estadios 35 y 38

En estos estadios, la estructura histológica de la pared y la luz del pulmón fue similar a lo descrito para el E. 28 (Figura 5d). Se observó mayor número de vasos en la pared pulmonar, los cuales, al igual que estadios previos, presentaron únicamente una capa endotelial y escaso tejido conjuntivo (Figura 5c).

En la región anterior (Figuras 5a-d y 7a-d), se observaron septos primarios más desarrollados que en estadios previos, delimitando cámaras (Figura 5a y 7a). En el E. 35 el ápice de dichos septos presentó características semejantes a lo observado en el E. 28 (Figura 5b). En el E. 38 el ápice del septo presentó un vaso sanguíneo rodeado por células musculares dispuestas a modo de casquete (Figura 7c y d).

La región media de ambos estadios presentó bandas de músculo liso en las caras ventromedial y en la cara dorsolateral, al igual que en el E. 28 (Figuras 5f, g y 7e, f).

La región posterior en el E. 35 presentó similares características a lo descrito para el E. 28. Se reconocieron bandas musculares localizadas en distintas zonas de la pared del pulmón (Figura 6a-e).

Bajo MEB, en la superficie interna del pulmón se reconocieron septos primarios sin cilios, interconectados, delimitando cámaras (8a, d, e y f). En la pared de dichas cámaras, se distinguió una entramada red de capilares entre los cuales se distinguieron los cuerpos celulares de los neumocitos (Figura 8b, c y g).

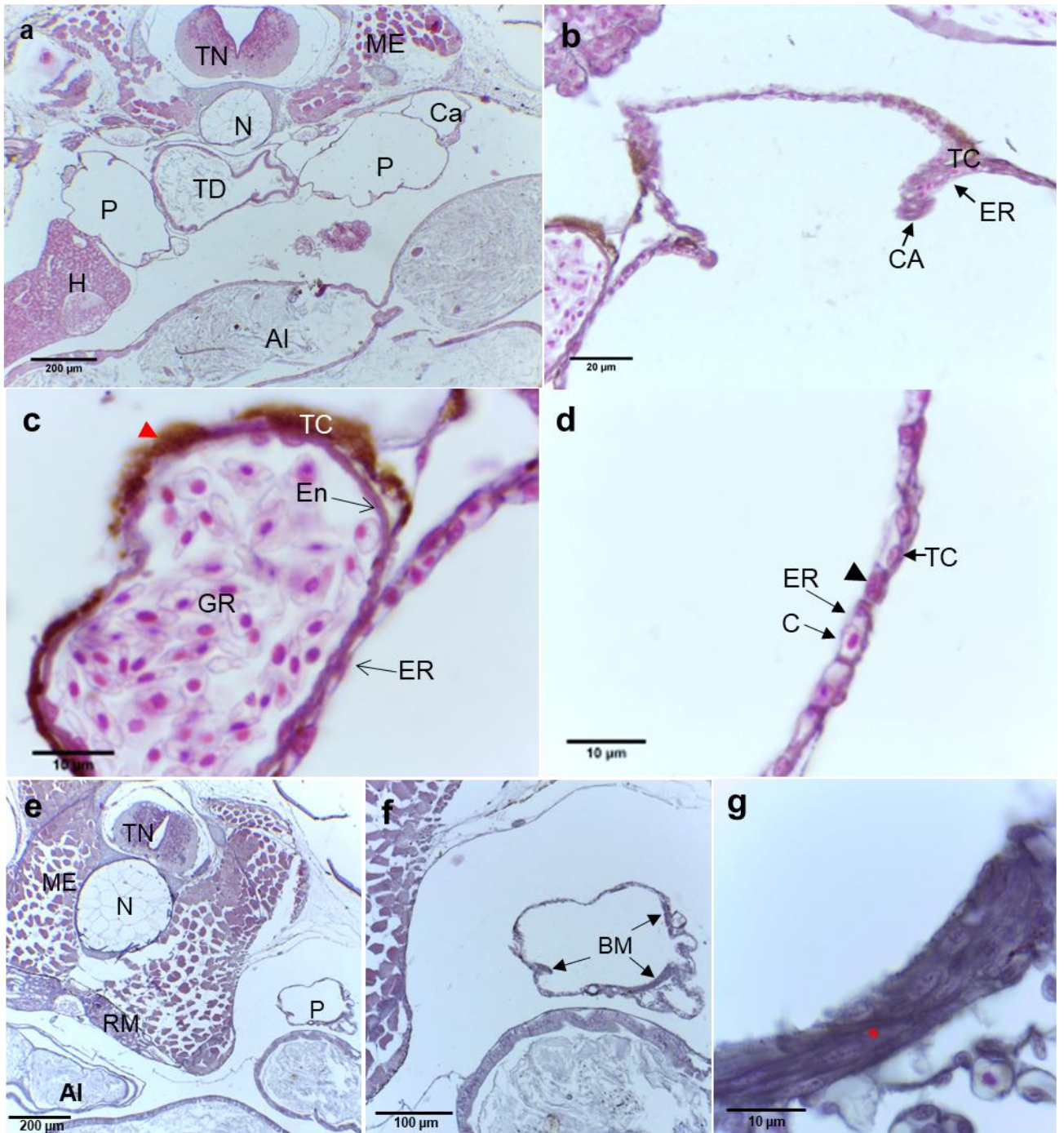


Figura 5. Secciones histológicas de la región anterior (**a-d**) y media (**e-g**) del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 35. **a)** Vista general de la sección de la larva. **b)** Detalle de un septo primario. **c)** Detalle de vaso sanguíneo. **d)** Detalle del epitelio respiratorio. **e)** Vista general de la sección de la larva. **f)** Detalle del pulmón. **g)** Detalle de la banda muscular. Referencias: **AI:** Asas intestinales, **BM:** Banda muscular, **C:** Capilar, **CA:** Células acidófilas, **En:** Endotelio, **ER:** Epitelio respiratorio, **GR:** Glóbulos rojos, **H:** Hígado, **ME:** Musculatura epiaxial, **N:** Notocorda, **P:** Pulmón, **RM:** Riñón mesonéfrico, **TC:** Tejido conectivo, **TD:** Tubo digestivo, **TN:** Tubo neural, *****: Célula muscular, **▲:** Neumocito, **▲:** Cromatóforos.

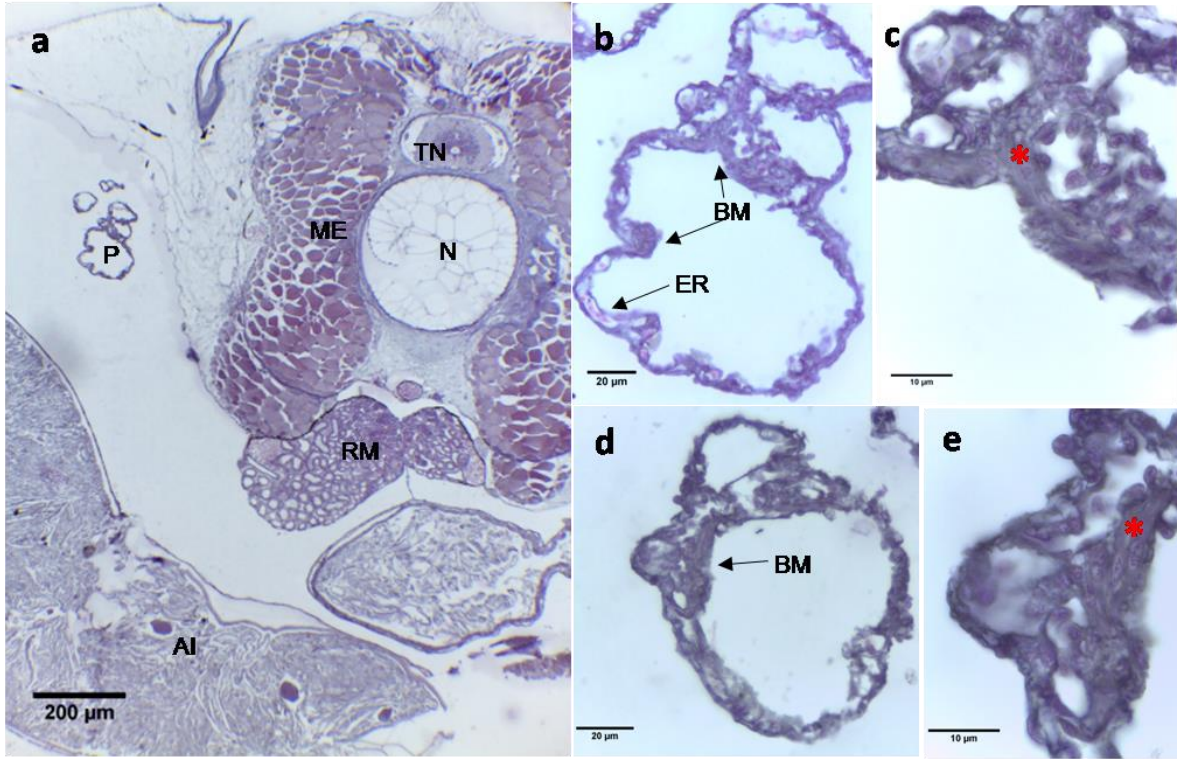


Figura 6. Secciones histológicas de la región posterior del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 35. **a)** Vista general de la sección de la larva. **b y d)** Detalle del epitelio respiratorio y bandas musculares. **c y e)** Detalle de la banda muscular. Referencias: **AI:** Asas intestinales, **BM:** Banda muscular **ER:** Epitelio respiratorio, **ME:** Musculatura epiaxial, **N:** Notocorda, **P:** Pulmón, **RM:** Riñón mesonéfrico, **TN:** Tubo neural, *****: Célula muscular.

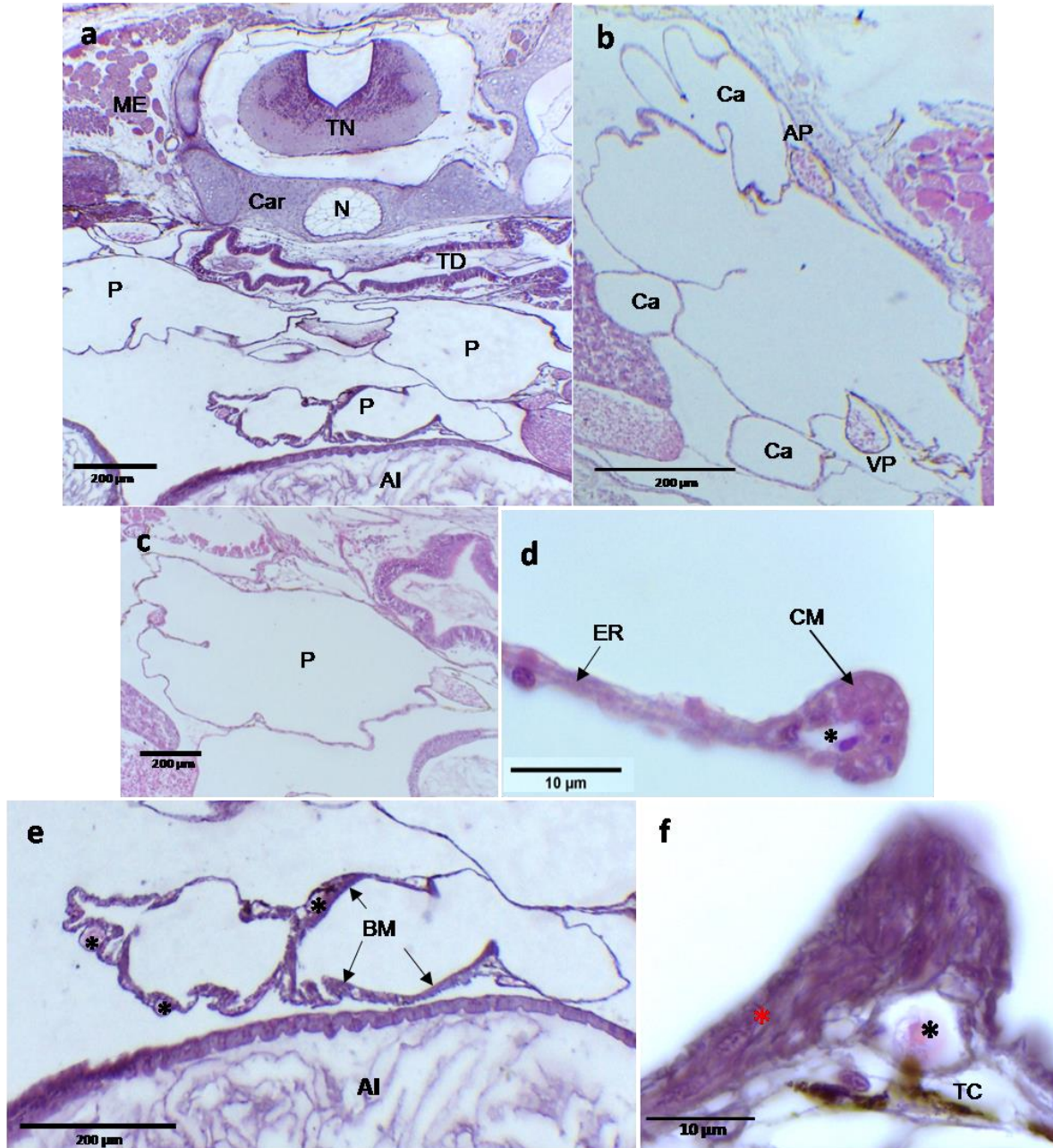


Figura 7. Secciones histológicas de la región anterior (a-d) y media (a, e y f) del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 38. a) Vista general de la sección de la larva. b) Detalle del pulmón. c) Sección del pulmón donde se observa un septo primario. d) Detalle de septo primario. e) Detalle del pulmón. f) Detalle de la banda muscular. Referencias: **AI:** Asas intestinales, **AP:** Arteria pulmonar, **BM:** Banda muscular, **Ca:** Cámara, **Car:** Cartilago, **CM:** Casquete muscular, **ER:** Epitelio respiratorio, **H:** Hígado, **ME:** Musculatura epiaxial, **N:** Notocorda, **P:** Pulmón, **TC:** Tejido conectivo, **TD:** Tubo digestivo, **TN:** Tubo neural, **VP:** Vena pulmonar, *,*: Célula muscular, *,*: Vasos sanguíneos.

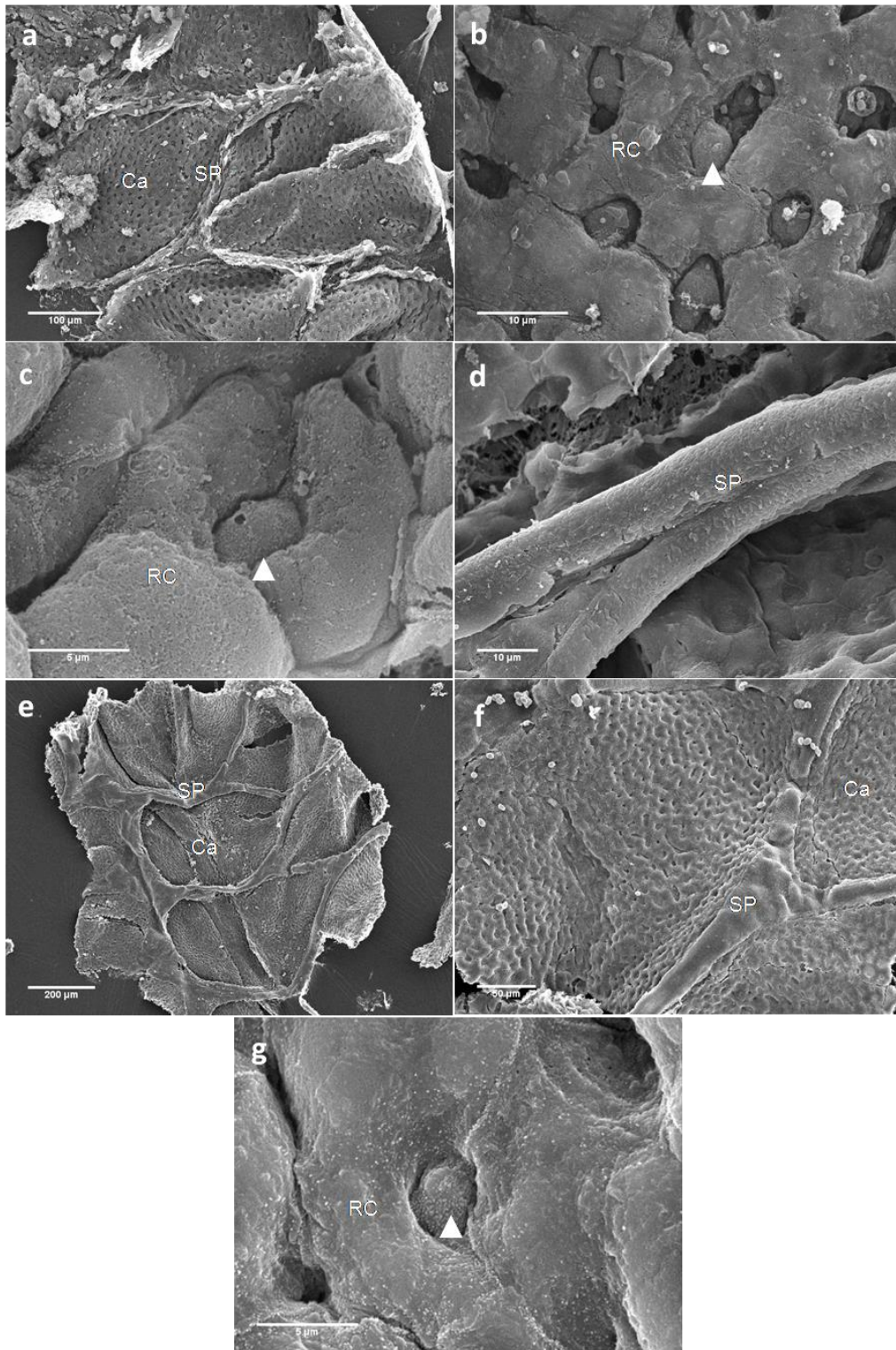


Figura 8. Microfotografías de MEB del pulmón de *Trachycephalustyphonius* en los E. 35 (a-d) y 38 (e-g). a) Vista general de la superficie interna. b) Detalle de la red capilar. c) Detalle de neumocito. d) Detalle de septo. e) Vista general de la superficie interna. f) Detalle de la superficie interna. g) Detalle de neumocito. Referencias: **Ca:** Cámara, **RC:** Red capilar, **SP:** Septo primario Δ : Neumocito.

Periodo de clímax metamórfico

Morfología Externa

En los E. 42 y 46 los pulmones presentaron un aspecto similar al descrito para estadios previos (Figura 1e y f). En el E. 46 la región anterior del pulmón se observó más ensanchada que las regiones media y posterior. Asimismo, fue posible distinguir tanto la vena como la arteria pulmonar, de posición ventromedial y dorsolateral, respectivamente.

Histología y MEB

La pared presentó una organización y constitución similar a la descrita en estadios anteriores, con abundantes vasos sanguíneos de distinto calibre (9b y 11b, g). En el E. 46, los vasos sanguíneos de mayor calibre presentaron una delgada túnica adventicia con algunas células musculares rodeada por tejido conjuntivo con cromatóforos (Figura 11e). Se observaron bandas de musculatura lisa en distintas zonas de la pared del pulmón en las tres regiones del pulmón (Figuras 9b, c, e y g, 10a-e, 11b, c e i).

En la región anterior y media, en el E. 42, la pared pulmonar presentó septos primarios, semejantes a lo observado en el E. 38 (Figuras 9d, h y 11f, g). En el E. 46 se reconocieron células ciliadas rodeando un vaso sanguíneo (Figura 11c y d).

La morfología de la región posterior, en ambos estadios, fue similar a la descrita en estadios previos (Figuras 10a-e y 11h, i).

Bajo MEB, en la superficie pulmonar interna se observó una estructura semejante a estadios anteriores (Figura 12a, b, e, f y h). En el E. 42 se observaron pequeños grupos de cilios distribuidos a lo largo de los septos (Figura 12c y d). En el E. 46, estos cilios se dispusieron a modo de bandas en la superficie de los septos (Figura 12g).

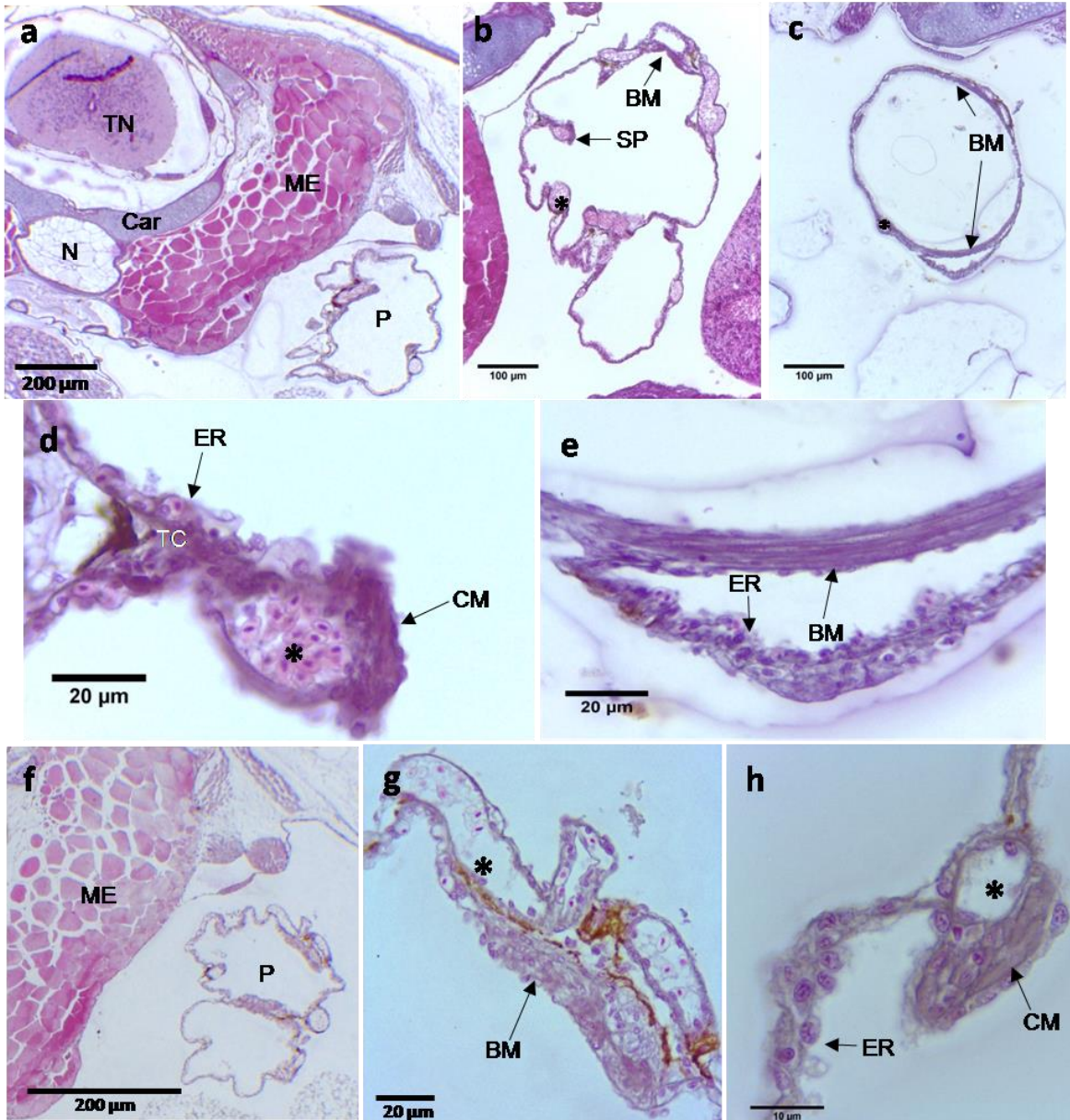


Figura 9. Secciones histológicas de la región anterior (**a-e**) y media (**g-h**) del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 42. **a)** Vista general de la sección de la larva. **b y c)** Detalles del pulmón. **d)** Detalle de un septo primario. **e)** Detalle de la banda muscular. **f)** Vista general del pulmón. **g)** Detalle de la banda muscular. **h)** Detalle de septo primario. Referencias: **BM:** Banda muscular, **Car:** Cartilago, **CM:** Casquete muscular, **ER:** Epitelio respiratorio, **ME:** Musculatura epiaxial, **N:** Notocorda, **P:** Pulmón, **SP:** Septo primario, **TC:** Tejido conectivo, **TN:** Tubo neural, *: Vasos sanguíneos.

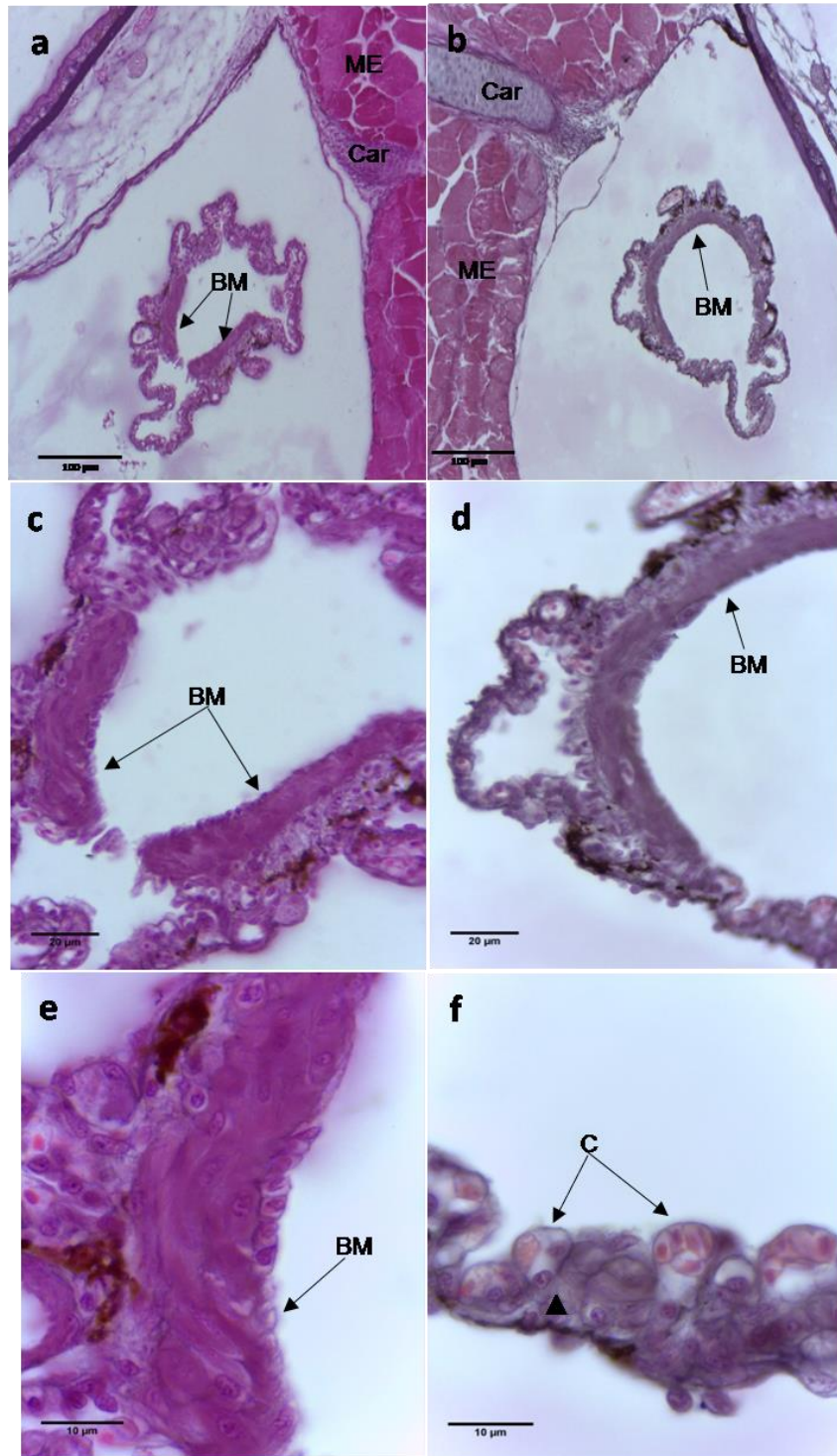


Figura 10. Secciones histológicas de la región posterior del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 42. **a y b)** Vista general del pulmón en dos zonas de la región posterior. **c y d)** Detalles de la localización de las bandas musculares. **e)** Detalle de la banda muscular. **f)** Detalle del epitelio respiratorio. Referencias: **BM:** Banda muscular, **Car:** Cartilago, **ER:** Epitelio respiratorio, **ME:** Musculatura epiaxial, **C:** Capilares. **▲:** Neumocito.

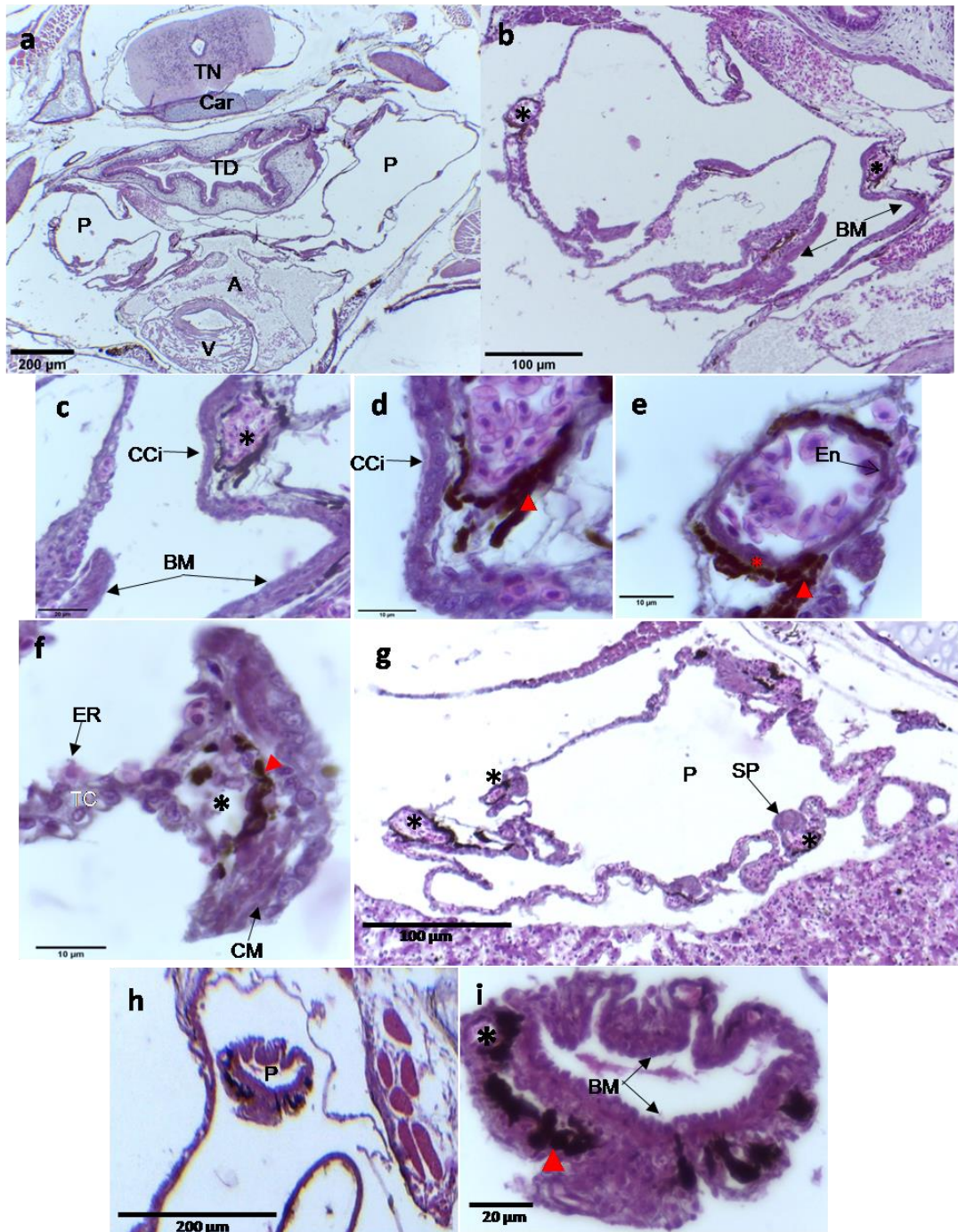


Figura 11. Secciones histológicas de las regiones anterior (a-f), media (g) y posterior (h e i) del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en el E. 46. a) Vista general del pulmón. b) Detalle del pulmón donde. c) Detalle de la pared pulmonar. d) Detalle de las células ciliadas. e) Detalle de vaso sanguíneo. f) Detalle de un septo primario g) Detalle del pulmón. h) Vista general del pulmón. i) Detalle del pulmón. Referencias: A: Aurícula, BM: Banda muscular, Ca: Cámara, Car: Cartílago, CCI: Células ciliadas, CM: Casquete muscular, ER: Epitelio respiratorio, ME: Musculatura epiaxial, N: Notocorda, P: Pulmón, SP: Septo primario, TC: Tejido conectivo, TD: Tubo digestivo, TN: Tubo neural, V: Ventrículo, *: Vasos sanguíneos, *: Células musculares, ▲: Cromatóforo.

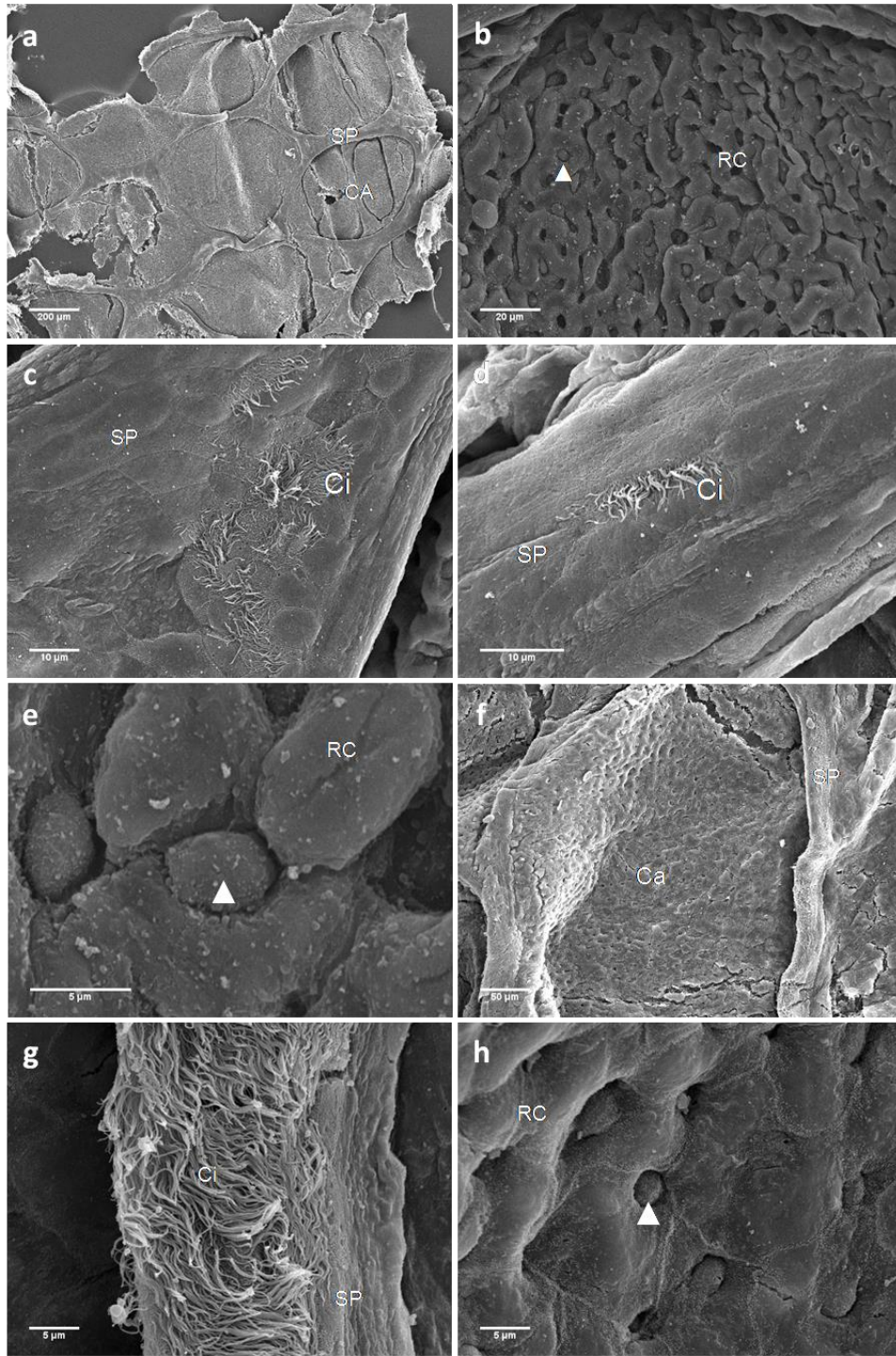


Figura 12. Microfotografías de MEB de la superficie interna del pulmón de *Trachycephalus typhonius* en los E. 42 (a-e) y 46 (f-h). a) Vista general del pulmón. b) Detalle de la superficie interna. c y d) Detalle de septo primario con grupos de células ciliadas. e) Detalle de la red capilar y neumocito. f) Detalle de una cámara del pulmón. g) Detalle de septo primario con células ciliadas dispuestas en bandas. h) Detalle de la red de capilares y neumocitos. Referencias: Ca: Cámara, Ci: Cilios, RC: Red de Capilares, SP: Septo Primario Δ : Neumocito.

Adulto

Morfología general

En los pulmones de adultos se reconoció una luz central y una pared subdivida en cámaras de diferentes tamaños, delimitadas por septos primarios, comunicadas con la luz central (Figura 1g). A su vez, estas cámaras se subdividieron por septos secundarios y terciarios. Se reconoció una importante red vascular formada por vasos sanguíneos de distintos calibres. Asimismo, se observaron cromatóforos dispersos en la cara interna y externa del pulmón (Figura 1h e i). El pulmón presentó un parénquima del tipo edicular, en el que las cámaras delimitadas por los septos son más anchas que profundas. Asimismo, dicho parénquima fue homogéneo dado que toda la superficie pulmonar interna presentó el mismo tipo de parénquima.

Histología y MEB

En la sección transversal del pulmón se reconoció una pared externa, de la cual parten los septos primarios que delimitan las cámaras amplias (Figura 13a). Se reconocen además septos secundarios y terciarios hacia el interior de las cámaras. En esta pared se identificó una delgada membrana pleuroperitoneal, una delgada capa de tejido conjuntivo con fibras basófilas, cromatóforos y abundantes vasos sanguíneos de distinto calibre, y una capa de epitelio respiratorio con neumocitos y numerosos vasos capilares (Figura 13a, b y c).

La pared de los septos mostró escaso tejido conjuntivo con vasos sanguíneos dispersos, tapizado por epitelio respiratorio muy vascularizado (Figura 13a, b y c). Los septos primarios presentaron el ápice con un vaso sanguíneo rodeado por un casquete muscular recubierto por epitelio cilíndrico o cúbico ciliado con células caliciformes. El ápice de los septos secundarios fue semejante a los primarios, pero no presentaron células caliciformes. El ápice de los septos terciarios presentó solamente el casquete muscular rodeado por epitelio respiratorio (Figura 14a-e).

Con respecto a los vasos sanguíneos y a diferencia de lo observado en estadios larvales que solo presentaron endotelio y una delgada túnica media, en el adulto se pudieron distinguir una túnica íntima, una túnica media formada por músculo liso y una túnica adventicia de tejido conjuntivo laxo. El grosor de las túnicas media y adventicia varió dependiendo del calibre y del tipo de vaso sanguíneo (Figura 14f).

Por otra parte, se observaron fascículos musculares rodeados por un epitelio plano simple dispersos en la pared de los tabiques asociado a vasos sanguíneos (Figuras 13d).

En observaciones bajo MEB, la pared pulmonar presentó una profusa red de capilares, la cual se extiende y rodea a los septos (Figura 15b y c). Se distinguieron los septos primarios, secundarios y terciarios por su distinto diámetro (Figura 15a). Sobre los septos primarios y secundarios se distinguieron abundantes cilios. En los septos primarios, éstos se distribuyeron a modo de bandas y de parches aislados (Figura 15e-h).

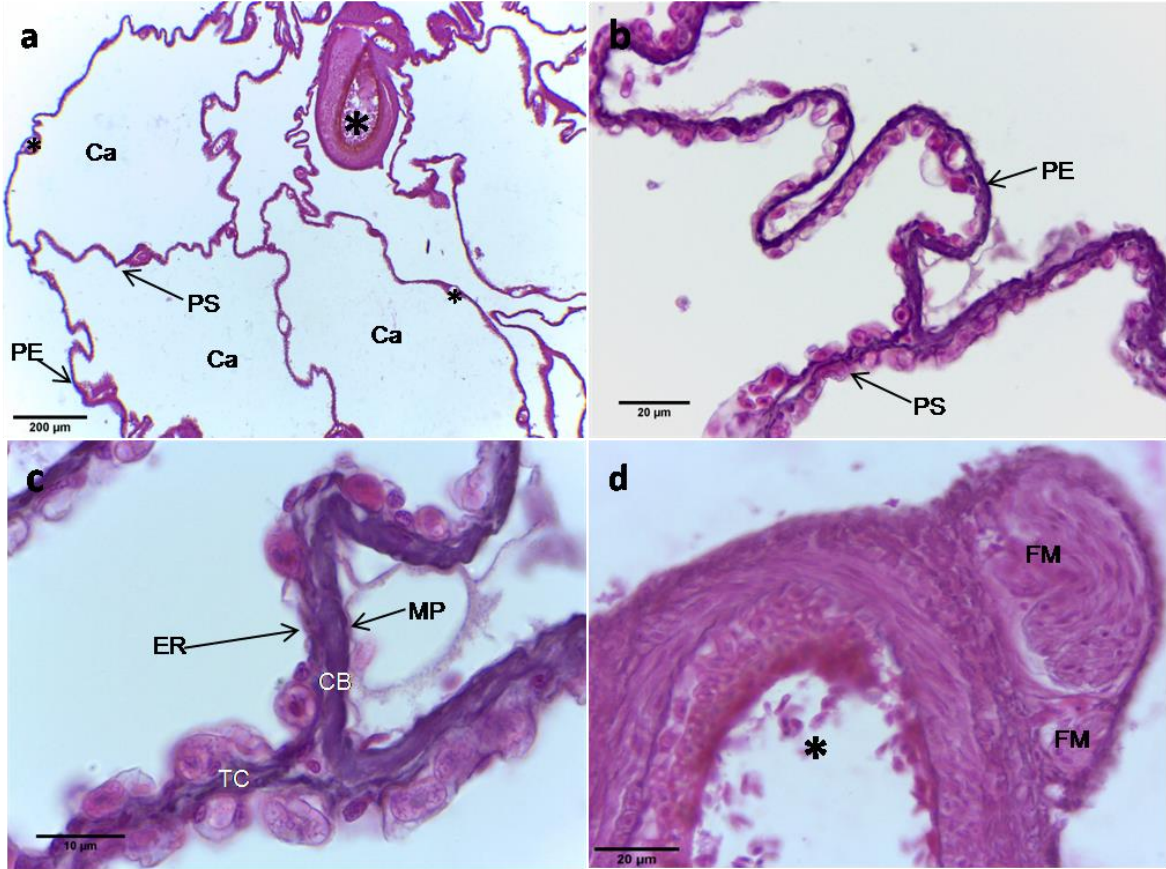


Figura 13. Secciones histológicas del pulmón del adulto de *Trachycephalus typhonius*. a) Vista general del pulmón. b) Vista general de la pared externa y de un septo. c) Detalle de la pared externa y del septo. d) Detalle de fascículos musculares asociados a un vaso sanguíneo. Referencias: **Ca:** Cámara, **CB:** Células basófilas, **ER:** Epitelio respiratorio, **FM:** Fascículos musculares, **MP:** Membrana pleuroperitoneal, **PE:** Pared externa, **PS:** Pared del septo, **S:** Septo, **TC:** Tejido conectivo, *: Vasos Sanguíneos.

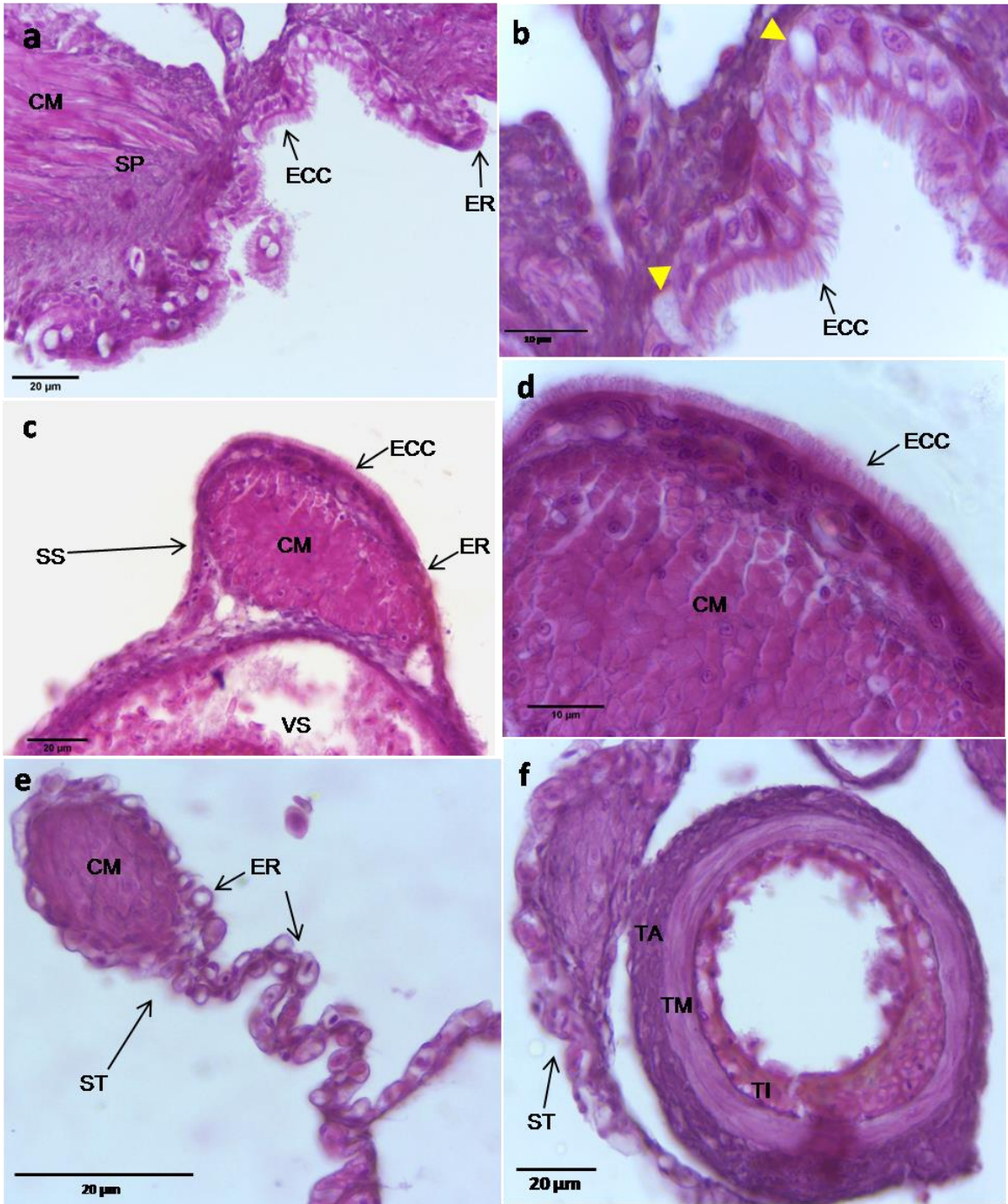


Figura 14. Secciones histológicas del pulmón del adulto de *Trachycephalus typhonius*. **a)** Vista general de septo primario. **b)** Detalle de epitelio cilíndrico ciliado y células caliciformes en el epitelio respiratorio. **c)** Vista general de septo secundario. **d)** Detalle de septo secundario. **e)** Vista general de septo terciario. **f)** Detalle de un vaso sanguíneo y un fascículo muscular asociado. Referencias: **CM:** Casquete muscular, **ECC:** Epitelio cilíndrico ciliado, **ER:** Epitelio respiratorio, **SP:** Septo primario, **SS:** Septo secundario, **ST:** Septo terciario, **TA:** Túnica adventicia, **TI:** Túnica íntima, **TM:** Túnica media, **VS:** Vaso sanguíneo, **▲:** Célula caliciforme.

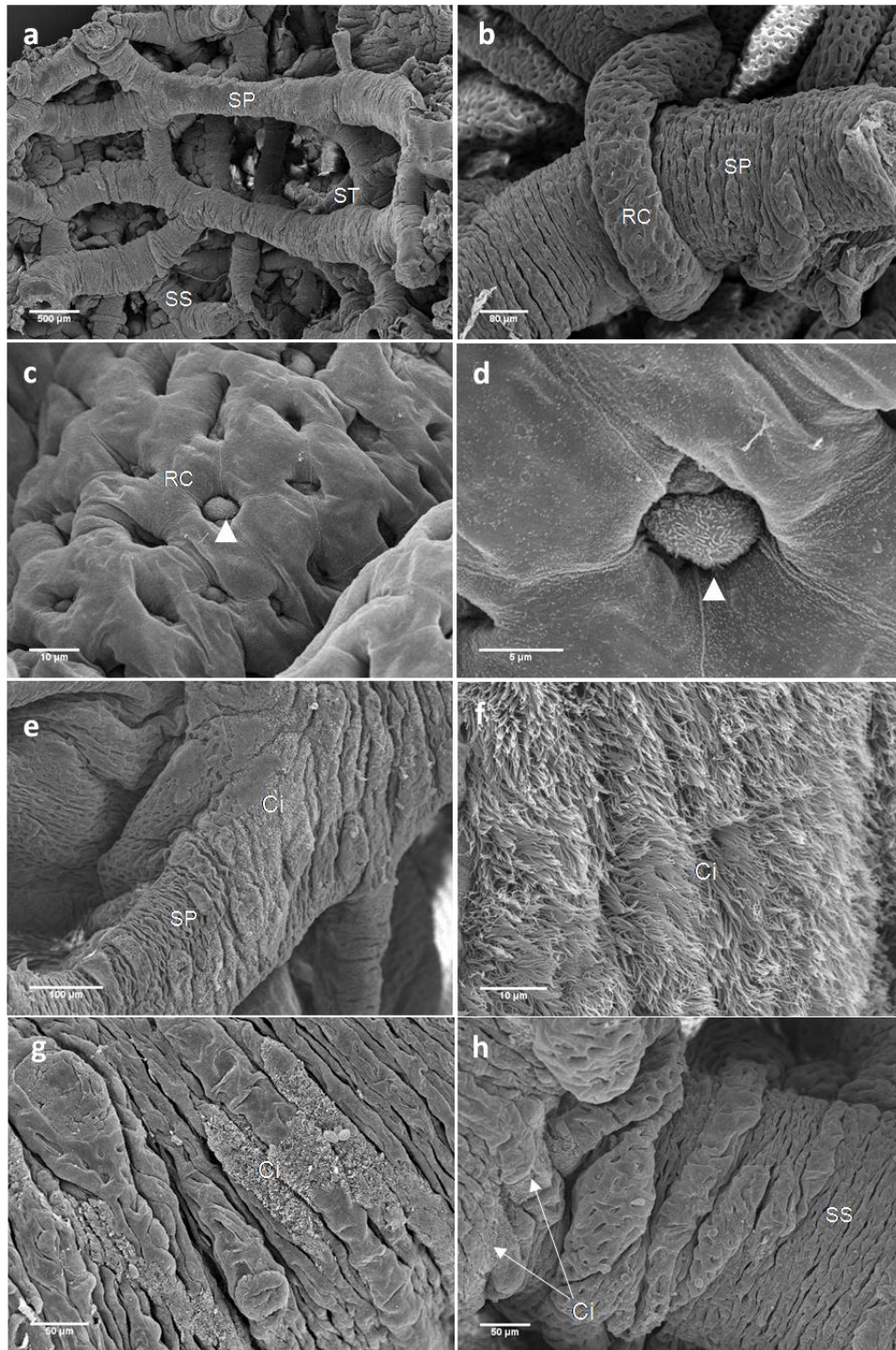


Figura 15. Microfotografías de MEB de la superficie interna del pulmón del adulto de *Trachycephalus typhonius*. **a)** Vista general del pulmón. **b)** Detalle de la red capilar rodeando a un septo primario. **c)** Detalle de la red capilar. **d)** Detalle de neumocito. **e)** Vista general de un septo primario donde se distinguen células ciliadas dispuestas en bandas. **f)** Detalle de las células ciliadas dispuestas en bandas. **g)** Detalle células ciliadas dispuestas en grupos. **h)** Vista general de células ciliadas en un septo secundario. Referencias: **Ca:** Cámara, **Ci:** Cilios, **RC:** Red capilar, **SP:** Septo primario, **SS:** Septo secundario, **ST:** Septo terciario, \triangle : Neumocito.

DISCUSIÓN

Este trabajo aporta información sobre la morfología externa, estructura histológica y la ultraestructura de los pulmones de *Trachycephalus typhonius* durante el periodo larval prometamórfico, metamórfico y estado adulto. En los anuros, el grado de desarrollo de los pulmones durante la etapa larval varía entre los diferentes grupos. Para *Xenopus laevis*, se ha descrito que los pulmones inician su desarrollo al final del periodo embrionario, alrededor del E. 19-20 (Viertel & Richter 1999) continuando su crecimiento y diferenciación durante el periodo larval. Para *Trachycephalus typhonius* en el estadio 27-28 los pulmones son estructuras saculares de luz amplia, cuya pared pulmonar está conformada por un epitelio respiratorio bien desarrollado y vascularizado sugiriendo que el inicio de su formación ocurre en estadios previos. Sin embargo, el análisis de estadios más temprano permitirá determinar con mayor precisión el momento en el que se inicia el desarrollo del pulmón.

En *Trachycephalus typhonius* se observaron esbozos de septos primarios en el estadio 27-28 en la región anterior. Entre los E.35-46 los septos primarios están más desarrollados en la región anterior y delimitan pequeñas cámaras. Estos septos están menos desarrollados en la región media. Con respecto a la formación de los septos primarios, se logró caracterizar una secuencia de su desarrollo. Inicialmente, estos septos están conformados por una porción central de tejido conjuntivo con cromatóforos rodeados por epitelio respiratorio y abundantes capilares sanguíneos. El ápice de estos septos está constituido por tejido conjuntivo rodeado por un grupo de células acidófilas hasta el E. 35. A partir del E. 38, en el ápice de estos septos las células acidófilas forman un casquete muscular y se desarrolla un vaso sanguíneo. En relación a la formación de los septos, Viertel & Richter (1999) describieron que el desarrollo de los mismo se inicia durante el clímax metamórfico y continúa después de la metamorfosis. De manera similar, Burggren & Infantino (1994) describen que en algunas larvas de bufónidos, el desarrollo completo del pulmón y la respiración aérea ocurren en el clímax metamórfico. En *Trachycephalus typhonius*, a semejanza de lo descrito para algunas especies de ránidos como *Lithobates pipiens*, los septos primarios se desarrollan durante el periodo larval prometamórfico (Waterman 1939, Burggren & Infantino 1994). Asimismo, en *Pseudis paradoxa* (Downie, Sams & Walsh 2009) al final de la metamorfosis los pulmones están bien desarrollados y vascularizados y presentan muchas subdivisiones internas, semejante al estado adulto. Para *Xenopus laevis* (Rose & James 2013) se reportó la presencia de septos de primer orden en el periodo prometamórfico (54 NF, correspondiente al E. 35 de Gosner) y de segundo orden en el climax metamórfico (63 NF, correspondiente al E. 42 de Gosner). Por otra parte, se observó la vena y arteria pulmonar en posición ventromedial y dorsolateral respectivamente, similar a lo reportado para adultos de *Lithobates pipiens* (Waterman 1939), *Hyla arborea* (Goniakowska- Witalinska 1986) y *Melanophriniscus stelzneri stelzneri* (Hermida *et al.* 2002).

En estadios larvales de *Trachycephalus typhonius* se distinguieron bandas de células musculares en la pared pulmonar, principalmente en las regiones media y posterior. La presencia de bandas musculares en la pared pulmonar ha sido reportada en *Lithobates pipiens* (Waterman 1939). En estadios prometamórficos de ésta última, se describieron células musculares ahusadas subyacentes al tejido epitelial constituido por células planas, y algunas hebras de tejido conectivo entre la capa de células musculares y la pleura. En estadios prometamórficos posteriores, las células musculares se extienden en toda la longitud del pulmón y el epitelio se vuelve cúbico. Debajo del tejido muscular, se encuentran en desarrollo venas que forman un plexo rudimentario. Posteriormente, durante el desarrollo de los septos, las venas quedan rodeadas por el tejido epitelial y muscular que crecen entre los espacios del plexo venoso y se extienden hacia la luz del pulmón. En el periodo de clímax metamórfico, la musculatura que rodea los vasos venosos se engrosa en sus márgenes internos, formando un casquete muscular.

Las funciones que le han asignado a la musculatura del pulmón del adulto son variadas. Waterman (1939), en base a lo descrito por distintos autores, nombra algunas como, a) soporte de las arterias y los nervios y regulador de tensión, en referencia a la presión intrapulmonar (Küttner 1874, en Waterman 1939); b) disminuir el tamaño de la cavidad pulmonar para que cuando se cierre la glotis, el aire en esta cavidad sea expulsado a las cámaras dispuestas periféricamente (Konigstein 1903); c) regulación de la presión de los sacos pulmonares (Brown 1909); y d) reducción del tamaño de la cavidad pulmonar y aumento de la presión intrapulmonar (Carlson y Luckhardt 1920). Estas funciones han sido descritas para anuros adultos y no existe bibliografía disponible que haga referencia a la función que esta musculatura tendría durante el estadio larval del desarrollo. Las bandas musculares observadas en *Trachycephalus typhonius* durante el estadio larval parecerían ser parte de la capa muscular de la pared pulmonar que, posteriormente, contribuirían a formar el casquete muscular asociado al vaso sanguíneo de los septos, como lo describió Waterman (1939).

La estructura pulmonar adulta, a diferencia de la larval, es más compleja debido a la presencia de un mayor número de septos que tienen la función de aumentar la superficie respiratoria y pueden ser de distintos órdenes. En el adulto de *Trachycephalus typhonius* se reconocieron septos primarios, secundarios y terciarios como los observados en *Rana dybowskii* Gunther, 1876, *Rana ulma* Matsui, 2011, *Hyla arborea*, *Chiromantis petersii* y *Rhinella arenarum* (Dierich 1975, Goniakowska- Witalinska 1986, Maina 1989, Hermida & Fiorito 1994). De manera excepcional, sólo en *Melanophrhyniscus stelzneri stelzneri* se ha descrito únicamente septos terciarios (Hermida *et al.* 2002). Los septos de *Trachycephalus typhonius* presentaron una estructura histológica similar como la observada en *Hyla arborea* y *Melanophrhyniscus stelzneri stelzneri* (Goniakowska- Witalinska 1986, Hermida *et al.* 2002). De manera distintiva, *Xenopus laevis* (Rose & James 2013) y *Pipa pipa* Linnaeus 1758 presentan un cartílago hialino característico en los septos que según Goniakowska- Witalinska (1995) ayudaría a evitar que éstos

colapsen debido a un aumento de la presión hidrostática cuando los animales permanecen sumergidos en el agua.

Hermida (2003) basándose en lo propuesto para lagartos (Duncker 1972 y Perry 1999, en Hermida 2003), clasifica al parénquima pulmonar de los anuros en tres tipos: edicular, faveolar o trabecular. El tipo de parénquima trabecular, se caracteriza porque las fibras musculares lisas y elásticas que forman el eje de los septos forman parte de la pared pulmonar. Esto determina una red poligonal, donde cada polígono constituye una cámara. En el parénquima edicular, las cámaras son más anchas que profundas, y en el faveolar, éstas son más profundas que anchas. Por otra parte, la distribución del parénquima puede ser homogénea si está formada por un solo tipo o heterogénea si resulta de la combinación de éstos. Según lo descrito en este trabajo, el pulmón de *Trachycephalus typhonius*, semejante a lo descrito para *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Hermida 2003), presenta un parénquima del tipo edicular de distribución homogénea.

La presencia de células caliciformes y ciliadas dispuestas en bandas o en grupos en los septos primarios parece ser variable en anuros. Han sido registradas en varias especies, tales como *Rana kobai* Matsui, 2011 y *Strauchbufo raddei* (Strauch, 1876) (Okada *et al.* 1962), *Rana dybowskii* y *Rana ulma* (Dierichs 1975), *Bufo pageoti* Bourret, 1937, *Sclerophrys pantherina* (Smith, 1828) *Bombina microdeladigitora* Liu, Hu & Yang, 1960 (Goniakowska- Witalinska 1981), adicionando ahora *Trachycephalus typhonius*. Las células caliciformes tienen la función de secretar mucus hacia la luz del pulmón (Goniakowska- Witalinska 1981) para mantener húmeda la superficie epitelial y ayudar a prevenir el daño causado por agentes infecciosos y por partículas (Faillard y Schauer 1972, en Hermida 2003). Asimismo, el mucus de estas células, en conjunto con las células ciliadas, podría contribuir a la eliminación de partículas extrañas (Stratton *et al.* 1980). Sin embargo, estas células no fueron encontradas en otras especies como, *Hyla arborea* (Goniakowska- Witalinska 1981), *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Hermida *et al.* 2002) y *Chiromantis petersii* (Maina 1989). Adicionalmente, en *Chiromantis petersii*, tampoco se observaron células ciliadas en los septos. Hermida *et al.* (1998) sugiere que en *Hyla arborea* el aumento de la superficie respiratoria en detrimento de las células ciliadas y caliciformes, estaría relacionado a una mayor tasa metabólica de esta especie. Para *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*, esto se explicaría por una mayor demanda de oxígeno en ambientes de altura (Hermida *et al.* 2002). Para el caso de *Chiromantis petersii*, Maina (1989) se sugiere que el rol de las células ciliadas y caliciformes estaría reemplazado por el gran número de macrófagos alveolares presentes en la superficie pulmonar interna.

Con respecto al epitelio respiratorio, y la diferenciación de diferentes tipos de neumocitos, Maina (1989) distingue en *Chiromantis petersii* la presencia de neumocitos de tipo I y tipo II. Los de tipo I (o escamosos), se caracterizan por ser células planas con procesos citoplasmáticos que envuelven a los capilares. Los de tipo II (o granulares) son células cuboidales con numerosas microvellosidades y cuerpos lamelares en su citoplasma. Esta diferenciación no siempre es clara, y en algunas especies como *Hyla arborea* (Goniakowska- Witalinska 1986), *Rhinella arenarum*

(Hermida *et al.* 1998) y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Hermida *et al.* 2002) se describieron un solo tipo de neumocito que combina las características ultraestructurales de las células alveolares tipo I y II presentes en los pulmones de mamíferos, y similares en estructura a los neumocitos de tipo II de *Chiromantis petersii* (Hermida 2003). En *Trachycephalus typhonius*, se reconocieron neumocitos en el epitelio respiratorio, aunque no fue posible distinguir a qué tipo corresponden. Para esto, es necesario realizar estudios con microscopía electrónica de transmisión que permitan analizar la ultraestructura de la célula.

Otras estructuras características del pulmón del adulto de algunas especies son los cuerpos neuroepiteliales. Consisten en células con características endócrinas asociadas a terminaciones nerviosas intraepiteliales (Goniakowska- Witalinska 1986, Hermida *et al.* 2002). Pueden encontrarse dispersas individualmente o formando grupos en el epitelio pulmonar no ciliado de los septos primarios y secundarios. Protruyen hacia la luz del pulmón y generalmente están separadas del lumen pulmonar por una sola capa de neumocitos y sus procesos citoplasmáticos. Su citoplasma contiene dos tipos de gránulos: un tipo es de tamaño pequeño, cargado de una sustancia de densidad moderada; el otro tipo es de forma ovalada o redonda, de contenido oscuro y homogéneo. Han sido descritos para *Hyla arborea* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri*, pero su presencia en *Trachycephalus typhonius* necesita ser revisada, ya que las técnicas empleadas en este trabajo no permiten su identificación.

En conclusión, la estructura del pulmón de *Trachycephalus typhonius* durante los estadios larvales y de clímax metamórfico es considerablemente diferente a la del estadio adulto. Durante el periodo larval, el pulmón presentó únicamente septos primarios con escasas células ciliadas y vasos sanguíneos con una pared vascular constituida por un endotelio y escaso tejido conjuntivo. En el adulto se observaron septos de distintos órdenes y un mayor desarrollo de los vasos sanguíneos los cuales, además, presentaron una pared vascular bien desarrollada con las túnicas íntima, media y adventicia bien diferenciadas. Esto plantea que en *Trachycephalus typhonius* el desarrollo y maduración del pulmón ocurre luego de la metamorfosis. La transición de la vida acuática a la vida terrestre, como sucede en muchas larvas de anuros, implica importantes cambios morfológicos y fisiológicos. Algunos cambios que ocurren en el desarrollo del sistema respiratorio en larvas de anfibios durante la transición de una respiración exclusivamente branquial a una con respiración pulmonar y branquial han sido estudiados por Burggren e Infantino Jr. (1994). Estos cambios incluyen, por ejemplo, modificaciones en los mecanismos o las superficies respiratorias, como la pérdida de branquias o la ventilación pulmonar. Asimismo, pueden estar influenciados por factores ambientales tales como la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, el riesgo de predación o el modo de alimentación. Al respecto, sería interesante profundizar el estudio de la morfología pulmonar durante el periodo juvenil del ciclo de vida de *Trachycephalus typhonius* para completar la secuencia de eventos morfogénicos del desarrollo pulmonar.

Finalmente, es importante señalar que existen escasas referencias bibliográficas acerca de la morfología pulmonar de los anuros durante el periodo larval, por lo que este trabajo contribuye a

profundizar el conocimiento acerca de la morfogénesis del pulmón en anuros, complementando estudios previos y resaltando la necesidad de realizar nuevos estudios que conduzcan a una visión integral acerca de la ontogenia de los pulmones en vertebrados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Atkinson, B.G. y J.J. Just. 1975. Biochemical and histological changes in the respiratory system of *Rana catesbeiana* larvae during normal and induced metamorphosis. *Developmental Biology*. 45:151-165.
2. Brown, T. G. 1909. Die Atembewegungen des Frosches und ihre Beeinflussung durch die nervösen Zentren und durch das Labyrinth. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 130: 193-218.
3. Burggren, W.W. y A.W. Pinder. 1991. Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. *Annual Review of Physiology*. 53: 107- 135.
4. Burggren, W.W. y N.H. West. 1982. Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Respiration Physiology*. 47: 151-164.
5. Burggren, W.W. y R.L. Infantino Jr. 1994. The respiratory transition from water to air breathing during amphibian metamorphosis. *American Zoologist*. 34: 238-246.
6. Carlson, A. J. y A. B. Luckhardt. 1920. Lung automatism and lung reflexes in the frog. *American Journal of Physiology*. 55.
7. De Souza, S.C.R. y C.M. Kuribara. 2006. Metabolic scaling associated with unusual size changes during larval development of the frog, *Pseudis paradoxus*. *Journal of Experimental Biology*. 209: 1651–1661.
8. Dierichs, R. 1975. Electron microscopic studies of the lung of the frog. *Cell and tissue research*, 160: 399-410.
9. Downie, J.R, K. Sams y P.T. Walsh. 2009. The paradoxical frog *Pseudis paradoxa*: larval anatomical characteristics, including gonadal maturation. *Herpetological Journal*. 19: 1–10.
10. Duellman, W.E. y L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Publishing Company, New York. 217.
11. Duncker, H.R. 1972. Structure of avian lungs. *Respiration Physiology*. 14:44-63.
12. Gilbert, S. F. 2010. *Developmental Biology*. 9^o ed. Sinauer Associates, Inc. 245 p.
13. Goniakowska-Witalińska, L. 1981. Neuroepithelial bodies in the lung of the tree frog, *Hyla arborea*. *Cell and tissue research*, 217:435-441.
14. Goniakowska-Witalinska, L. 1986. Lung of the tree frog, *Hyla arborea* L. A scanning and transmission electron microscopic study. *Anatomy and embryology*. 174: 379-389.

15. Goniakowska-Witalinska, L. 1995. The histology and ultrastructure of the amphibia lung. En: García, L. M. P. Histology and ultrastructure and immunohistochemistry of the respiratory organs in non-mammalian vertebrates, pp. 233. L.M. Pastor. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia, España.
16. Gosner, K.L. 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetológica*. 16: 183-190.
17. Hermida, G. N. 2003. Microanatomía del sistema respiratorio en *Bufo arenarum* y *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Anura, Bufonidae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
18. Hermida, G. N., A. Farías y L.E. Fiorito. 2002. Ultrastructural characteristics of the lung of *Melanophryniscus stelzneri stelzneri* (Weyenberg. 1875) (Anura: Bufonidae). *Biocell*. 26: 347- 355.
19. Hermida, G. y L.E. Fiorito. 1994. Estereoultraestructura del pulmón de Anuros Bufónidos. I. *Bufo arenarum*. *Cuadernos de Herpetología (A.H.A.)*, 8:25-29.
20. Hermida, G.N., L.E. Fiorito y A. Farías. 1998. The Lung of the Common Toad *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae). A Light and Electron Microscopy Study. *Biocell*. 22: 19-26.
21. Hoff, K. V. S., A. R. Blaustein, R. W. McDiarmid. y R. Altig. 1999. Behaviour: interactions and their consequences. En: McDonald, R.W. y R. Altig (eds). Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae, pp. 215–239. Chicago University Press, Chicago.
22. Kardong, K. V. 2018. Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution. 8º ed. MacGraw-Hill, 430, 433 p.
23. Königstein, H. 1903. Die Function der Muskulatur in der Amphibienlunge. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 95:616-624.
24. Lobo, F. 2010. Diccionario de anatomía de los cordados. 1º ed. Ed. Eudene, Corrientes. 236 p.
25. Maina, J.N. 1989. The morphology of the lung of the East African tree frog *Chiromantis petersi* with observations on the skin and the buccal cavity as secondary gas exchange organs. A TEM and SEM study. *Journal of anatomy*. 165: 29-43.
26. Meban, C. 1973. The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*. *Journal of anatomy*. 114: 235-244.
27. Müller, F. y P. Sprumont. 1972. Entwicklung des Aditus laryngis bei *Rana ridibunda*. Licht- und elektronenoptische Befunde. *Revue Suisse Zoologie*. 79: 1114-1120.
28. Okada, Y., S. Ishiko, S. Daido, J. Kim y S. Ikeda. 1962. Comparative morphology of the lung with special reference to the alveolar epithelial cells: I. Lung of the amphibia. *Acta Tuber Jap*. 11: 63-72.
29. Pyburn, W. F. 1967. Breeding and larval development of the hylid frog *Phrynohyas spilomma* in southern Veracruz, Mexico. *Herpetologica*. 184-194.

30. Rose, C.S. y B. James. 2013. Plasticity of lung development in the amphibian, *Xenopus laevis*. *Biology Open*. 2: 1324-1335.
31. Savage, J.M. 2002. The Amphibians and Reptiles of Costa Rica. University of Chicago Press, Chicago and London. 927.
32. Strawinski, S. 1956. Vascularization of respiratory surfaces in ontogeny of the edible frog, *Rana esculenta* L. *Zoologica Poloniae*. 7: 327-365.
33. Tubbs, O.E., R. Stevens, M. Wells y R. Altig, 1993. Ontogeny of the oral apparatus of the tadpole of *Bufo americanus*. *Amphibia-Reptilia* 14: 333-340.
34. Ultsch, G.R., D.F. Bradford y J. Freda. 1999. Physiology: coping with the environment. En: McDonald, R.W. y R. Altig (eds). *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*, pp. 189–214. Chicago University Press, Chicago.
35. Viertel, B. y S. Richter. 1999. Anatomy: Viscera and Endocrines. En: McDonald, R.W. y R. Altig (eds). *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*, pp. 104-107. Chicago University Press, Chicago.
36. Waterman, F.A. 1939. The Origin and Development of the Internal Musculature of the Frog Lung (*Rana Pipiens*). *The Ohio Journal of Science*. 39: 97-109.
37. Zweifel, R.G. 1964. Life History of *Phrynohyas venulosa* (Salientia: Hylidae) in Panama. *Copeia*. 1: 201-208.