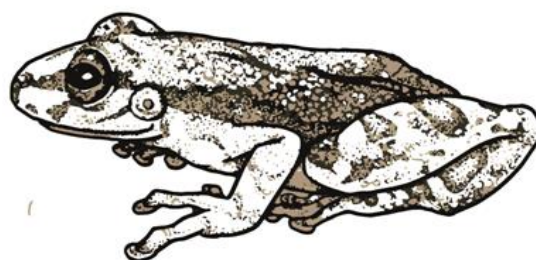
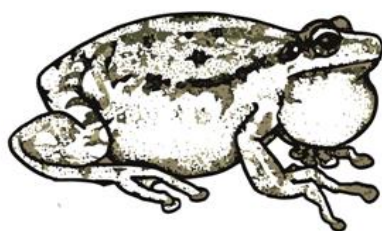


**Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales y  
Agrimensura-UNNE**

**Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Trabajo Final de Graduación**

**Estudio del desarrollo y  
diferenciación gonadal  
de *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae)**



**Autora: Ayelen Denise Vaca**

**Directora: María Teresa Sandoval**

**2023**



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que han sido parte fundamental de mi viaje de aprendizaje y resiliencia durante mi carrera.

En primer lugar, mi directora de tesis merece un reconocimiento especial. Su guía, experiencia y dedicación fueron esenciales para la realización de este trabajo. Y a los jurados que ayudaron a mejorar el desarrollo de este trabajo. A mis compañeros de laboratorio, les agradezco su excelente compañerismo y su generosa contribución de conocimiento y experiencia. Siempre estuvieron dispuestos a brindar consejos y apoyo en los momentos de mayor necesidad. Su colaboración fue fundamental para mi desarrollo profesional.

Mi madre merece un agradecimiento profundo por su apoyo inquebrantable. A pesar de no comprender todos los detalles de mis estudios, siempre estuvo llena de orgullo por mis logros. Su incansable trabajo y sacrificio para brindarme la oportunidad de estudiar la profesión que amo han sido fundamentales en mi vida. Sin su apoyo y amor incondicional, nada de esto habría sido posible. Mi tía, quien compartió conmigo su amor por la vida y las ciencias, merece un agradecimiento especial. Su aliento constante y estímulo me motivaron a aspirar a logros significativos y a no rendirme en la búsqueda de mis metas académicas.

A mi hermana, le agradezco su colaboración incansable en mis trabajos de la facultad y su apoyo emocional en los momentos más difíciles que conlleva la vida de estudiante. Al igual que mi novio merece un agradecimiento especial. Su buen humor ha sido un bálsamo para calmar la ansiedad que la vida universitaria puede generar, y su constante apoyo me ha mantenido en pie en los momentos en que consideraba rendirme. Su orgullo por mis logros ha sido una fuente constante de inspiración.

Finalmente, a mi amiga, quien ha sido una compañera inestimable en este recorrido, le agradezco su colaboración constante y su amistad inquebrantable. Juntas enfrentamos exámenes, superamos miedos y obstáculos.

En resumen, a cada una de estas personas le debo una parte de mi éxito académico y personal. Sus contribuciones han sido invaluable y han hecho posible mi desarrollo profesional y personal.



## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| <b>DENOMINACIÓN</b> .....                         | 4  |
| <b>RESUMEN</b> .....                              | 4  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                         | 5  |
| <b>OBJETIVOS</b> .....                            | 8  |
| OBJETIVO GENERAL .....                            | 8  |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                       | 8  |
| <b>MATERIALES Y MÉTODO</b> .....                  | 9  |
| Obtención de material de estudio .....            | 9  |
| Obtención y cría de larvas .....                  | 9  |
| Obtención de ejemplares adultos .....             | 10 |
| Selección y fijación del material biológico ..... | 10 |
| Análisis de ejemplares .....                      | 11 |
| Análisis macroscópico de las gónadas .....        | 11 |
| Análisis histológico de las gónadas .....         | 12 |
| Análisis e interpretación de los datos .....      | 13 |
| Análisis estadístico .....                        | 13 |
| <b>RESULTADOS</b> .....                           | 14 |
| Descripción morfo-histológica .....               | 16 |
| Etapa indiferenciada .....                        | 16 |
| Diferenciación del ovario .....                   | 17 |
| Diferenciación del testículo .....                | 21 |
| <i>Periodo prometamórfico</i> .....               | 21 |
| Cuerpos grasos .....                              | 22 |
| Análisis estadístico .....                        | 29 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....                            | 33 |
| Morfogénesis gonadal .....                        | 33 |
| Etapa indiferenciada .....                        | 33 |
| Etapa de diferenciación .....                     | 34 |
| Cuerpos grasos .....                              | 36 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....                         | 38 |
| <b>ANEXO I</b> .....                              | 43 |



## DENOMINACIÓN

### Estudio del desarrollo y diferenciación gonadal de *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae)

## RESUMEN

Los anfibios anuros presentan diversos patrones de desarrollo gonadal, que se caracterizan en base a los mecanismos de diferenciación de ovarios y testículos (patrón diferenciado e indiferenciado). Asimismo, la tasa de desarrollo gonadal, puede ser variable dependiendo del momento en que ocurre la diferenciación gonadal y se reconocen tres tasas, básica, acelerada y retardada. Estos tipos de tasa han sido relacionados con los tiempos de madurez sexual en machos y hembra. El conocimiento de los eventos que ocurren durante el desarrollo de ovarios y testículos, es fundamental para caracterizar la morfogénesis gonadal normal en una especie, y aporta información de base que sirve para evaluar posibles alteraciones en la morfología o fisiología gonadal por efecto de factores ambientales. En este trabajo se realizó la descripción de los eventos de la morfogénesis gonadal y se caracterizó el patrón de desarrollo de ovarios y testículos en *Scinax nasicus*, una especie común en nuestra región, que habitualmente se encuentra en ambientes urbanos y periurbanos. Para ello, se realizó un análisis morfológico e histológico de las gónadas y cuerpos grasos de larvas, en diversos estadios de desarrollo prometamórfico y clímax metamórfico, juveniles y adultos de dicha especie. El análisis morfométrico incluyó el registro del área, ancho y largo de la gónada y área de los cuerpos grasos, y su análisis estadístico para evaluar variaciones a lo largo del desarrollo y entre sexos. El análisis histológico, incluyó el reconocimiento de la estructura y los tipos celulares característicos de la gónada indiferenciada y de ovarios y testículos y la interpretación de los eventos del desarrollo en cada etapa. Los resultados obtenidos permitieron reconocer que *Scinax nasicus* presenta un tipo de desarrollo gonadal diferenciado, que las hembras tienen una tasa de desarrollo acelerada, con presencia de folículos previtelogénicos desde el periodo prometamórfico y los machos, una tasa de desarrollo básica, con túbulos seminíferos con cistos de espermatogonias bien definidos al final de la metamorfosis. En el período juvenil, el ovario mantuvo su dinámica de crecimiento folicular, mientras que el testículo mostró una actividad espermatogénica limitada. En los individuos adultos, se reconocieron las fases avanzadas de la vitelogénesis en las hembras, y las distintas fases de la espermatogénesis en los machos. Se registraron, tanto para machos como para hembras, asimetría y heterocronía en el desarrollo de los cuerpos grasos izquierdo y derecho. Esta información, contribuye a ampliar los conocimientos de los patrones de desarrollo gonadal en anuros y aporta información de base para otros estudios que aborden aspectos y características de la reproducción en esta especie, como por ejemplo la edad de madurez sexual y la dinámica de los cuerpos grasos, durante el periodo reproductivo. Asimismo, pone de manifiesto la relevancia de profundizar estos estudios en otras especies de la región con distintos patrones morfogenéticos.



## INTRODUCCIÓN

El sistema reproductor de los vertebrados muestra una íntima relación morfológica y funcional con el sistema urinario, resultado de su origen común a partir del mesodermo intermedio o mesómero embrionario. La morfología testicular y ovárica es muy similar entre diferentes clases filogenéticas, sin embargo los mecanismos celulares y genético-moleculares que subyacen a la morfogénesis gonadal resultan ser muy disímiles, particularmente entre vertebrados amniotas y anamniotas (De Falco & Capel 2009; Nagahama et al. 2021). En los últimos años, se realizaron diversos estudios con el objetivo de interpretar los patrones morfogenéticos implicados en la organización y diferenciación gonadal en diversos grupos de vertebrados (Guigon et al. 2005; Stöck et al. 2021; Nicol et al. 2022).

En los anfibios, el aparato reproductor, está conformado por las gónadas, los cuerpos grasos y los conductos asociados (Méndez Tepepa et al. 2023). En la mayoría de los anfibios, las gónadas y cuerpos grasos, se organizan a partir de la cresta genital de posición ventro-medial-anterior a la porción mesonéfrica de la cresta urinaria (Witschi 1929; Viertel & Richter 1999), sin embargo hay variaciones entre los clados. En urodelos y anuros, la porción craneal de las crestas genitales, o progonio, da origen a los cuerpos grasos, la porción central, o mesogonio, da origen al tejido gonadal, mientras que el extremo posterior o epigonio permanece como un apéndice estéril, que puede, ocasionalmente, originar un cuerpo graso adicional (Witschi 1929, Viertel & Richter 1999). En gimnofiones, la gónada deriva de la porción proximal de la cresta y los cuerpos grasos, de la porción distal, teniendo éstas una disposición paralela (Wake 1968, Anjubault & Exbrayat 2004). Simultáneamente con la organización de la cresta genital, ocurre la migración de las células germinales primordiales (CGP's) desde el endodermo presuntivo, en los anuros y gimnofiones, o desde la placa mesodérmica lateral, en los urodelos (Sammouri et al. 1990; Humphrey 1925; Viertel & Richter 1999; Ogielska 2009; Piprek et al. 2017). Las CGP's se localizan primariamente en la zona cortical de la cresta genital donde comienzan a proliferar y forman un epitelio germinal primitivo junto con las células de soporte o esteroideogénicas (López 1989; Ogielska & Warner 1990; Ogielska 2009; Nicol et al. 2022).

La morfogénesis gonadal de los anfibios se divide en dos etapas, una etapa indiferenciada, donde la gónada se encuentra conformada por CGP's y células somáticas y una etapa de diferenciación ovárica y testicular que comprende eventos característicos como proliferación de células germinales, diferenciación de ovogonias y espermatogonias, formación de la cavidad medular (solo en anuros y urodelos), o cordones sexuales, inicio de meiosis (Anjubault & Exbrayat 2004; Ogielska & Kotusz 2004; Ogielska 2009; Mali & Gramapurohit 2015; Mendoza-Cruz et al. 2017). En los anuros se reconocen dos tipos de diferenciación gonadal: un tipo diferenciado, en el cual la gónada indiferenciada se diferencia directamente en ovario o testículo, y un tipo indiferenciado, en el cual el esbozo gonadal se organiza, inicialmente, como ovario, en todos los individuos, y luego se diferencia en testículo en los machos, con la consecuente degeneración de ovocitos (Flament et al. 2011; Mali & Gramapurohit 2015). Ogielska & Kotusz (2004) describieron que la diferenciación ovárica puede variar según tres tipos de tasa de desarrollo: acelerado, básico y retardado. De acuerdo a si la diferenciación gonadal ocurre durante el periodo prometamórfico, metamórfico o post metamórfico. Asimismo algunos autores establecen una tasa de desarrollo testicular acelerada, básica o retardada basándose en el tiempo en que ocurre la diferenciación de los cordones sexuales (Goldberg 2015; Mali & Gramapurohit 2015; Traijit et al. 2020).





Asimismo autores, plantean que los eventos asociados con la diferenciación gonadal y el desarrollo de testículos y ovarios en anfibios pueden correlacionarse con el tiempo que el individuo alcanza la edad de madurez sexual (Phuge & Gramapurohit 2013).

La diferenciación sexual en anfibios está bajo el control de procesos endocrinos y, por lo tanto, podría verse perturbada por la exposición a sustancias que alteran el equilibrio hormonal. Los estrógenos y los andrógenos son fundamentales en la diferenciación de las gónadas y en el desarrollo de los rasgos sexuales secundarios en los vertebrados (Ottinger et al. 2001; Devlin & Nagahama 2002; 2010; Flament 2016). En el transcurso de estos procesos, se configura un mecanismo de señalización intrínseca entre las células sexuales y las células esteroidogénicas, encargado de supervisar y dirigir la formación definitiva de ovarios y testículos, y de regular su funcionamiento. Asimismo, las hormonas sexuales desempeñan un rol fundamental en la diferenciación de los órganos reproductivos característicos de cada sexo (Saunders et al. 2000; Britt et al. 2002, 2004; Pepe et al. 2002; Juengel et al. 2006; Arias-Álvarez et al. 2007; Burkhart et al. 2010; Nagahama et al. 2021). Los disruptores endocrinos son compuestos que pueden influir en el organismo al imitar la función de las hormonas naturales o al interferir en su producción, liberación, metabolismo o eliminación, provocando alteraciones en el equilibrio homeostático o la regulación del desarrollo embrionario (Carranza 2021). Los estrógenos ambientales, también conocidos como xenoestrógenos, representan una de las principales clases de disruptores endocrinos que se encuentran en el ambiente. Estos compuestos presentan una estructura molecular similar a la de los estrógenos endógenos (Wan et al. 2021). De modo general se unen a los receptores celulares interfiriendo la acción estrogénica (Jobling & Sumpter 1993; White et al., 1994; Jobling et al. 1996; Wojnarowski et al. 2022), aunque también pueden actuar a través de mecanismos independientes del receptor (Gillesby & Zacharewski 1998; Lutz & Kloas 1999). En este contexto, la desregulación de las funciones normales de las hormonas sexuales puede tener un impacto significativo no solo en la configuración y diferenciación del sistema reproductivo, sino también en los patrones de comportamiento de los individuos, lo que potencialmente podría dar lugar a eventos de reversión del género. Este proceso se desarrolla durante la etapa larval en ambientes acuáticos, donde los organismos pueden estar expuestos a una variedad de sustancias que se acumulan en el agua (Kolpin et al. 2002; Curi et al. 2021). Se ha constatado que la exposición a sustancias con efectos parecidos a los estrógenos o con propiedades anti androgénicas durante el periodo crítico de desarrollo y diferenciación gonadal induce cambios en la apariencia sexual de las gónadas o en su histología, así como en las características secundarias en renacuajos y juveniles de anfibios, que a la larga podrían afectar el rendimiento reproductivo de la especie (Kloas et al. 1999; Hayes et al. 2002; Mackenzie et al. 2003; Curi et al. 2021; Rezende et al. 2021).

Los anuros son considerados buenos bioindicadores ambientales, gracias a su alta dependencia del medio en el que habitan, falta de migraciones, piel desnuda con elevada permeabilidad, huevos sin cáscara, imposibilidad de regular su temperatura corporal (ectotermia), y ciclo de vida bifásico dependiente tanto del medio acuático como del medio terrestre (Rabb 1990; Blaustein & Kiesecker 2002; Blaustein et al. 2003), asimismo, las larvas de anfibios, adultos y peces son vulnerables a la contaminación de los medios acuáticos, ecosistemas con compuestos disruptores endocrinos (Tamschick et al. 2016; Martyniuk et al. 2020). Por este motivo, es importante conocer la morfogénesis



gonadal en los anuros, ya constituye información de base que permitiría reconocer posibles alteraciones causadas por factores ambientales.

La familia Hylidae comprende alrededor de 700 especies de distribución en toda América, Europa, extremo noreste de África y este de Asia (Montero & Autino 2018). En Argentina, se reconocen 33 especies de las cuales 22 se encuentran en la provincia de Corrientes (Zaracho et al. 2012). La morfogénesis gonadal se conoce para pocas especies de esta familia, como es el caso de *Pseudis platensis* (Fabrezi et al. 2010), *Dendropsophus labialis* (Pinto-Eraza et al. 2016), y *Boana riojana* (Goldberg et al. 2019). Para el género *Scinax*, el desarrollo y diferenciación de ovarios y testículos solo se ha caracterizado para *Scinax fuscovarius* (Goldberg 2015) y *Scinax acuminatus* (Fabrezi et al. 2010), siendo desconocida para la especie objeto de estudio de este plan de trabajo. *Scinax nasicus* es una especie de amplia distribución en la provincia de Corrientes con hábitos arborícolas, saltadores y de alimentación insectívora (Zaracho et al. 2012). Las larvas presentan un tamaño medio de 28.1 mm de longitud total y cuerpo triangular, con una cola amplia, estas se encuentran en hábitats acuáticos temporales o estacionales, como pozos, abrevaderos y charcos. Las larvas a menudo se adhieren a la vegetación o se mimetizan con su entorno para evitar la detección y depredación (Schulze et al. 2015). Esta especie se encuentra habitualmente cerca de cultivos y ambientes antropizados (Laufer et al. 2021), por lo que su desarrollo puede verse afectado por factores ambientales, como la temperatura o agroquímicos (Lajmanovich et al. 2003; Gómez 2023). Su estado de conservación en Argentina es No Amenazada (Kwet et al. 2004).

En este contexto, este estudio tiene como objetivo contribuir al conocimiento de los patrones de desarrollo gonadal de los anuros y aportar información de base que permita interpretar las estrategias reproductivas de *Scinax nasicus*, mediante la caracterización del patrón de formación de ovarios y testículos durante el periodo larval, juvenil y adulto es esta especie. Se espera que los resultados complementen y amplíen los conocimientos acerca del desarrollo y la dinámica gonadal en anfibios anuros y que puedan servir de base para interpretar la estrategia reproductiva de la especie. Asimismo, los datos aportados acerca del patrón normal de desarrollo y diferenciación gonadal podrían servir de base para interpretar alteraciones de la morfogénesis gonadal, provocada por contaminantes del ambiente.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Contribuir al conocimiento de los patrones de desarrollo gonadal y de los cuerpos grasos de los anuros y aportar información de base que permita interpretar las estrategias reproductivas de *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el patrón de formación de ovarios y testículos durante el periodo larval, metamórfico y post metamórfico de *Scinax nasicus*.
- Determinar el estado de desarrollo y diferenciación gonadal al finalizar la metamorfosis.
- Describir los cambios de la estructura gonadal luego de la metamorfosis.



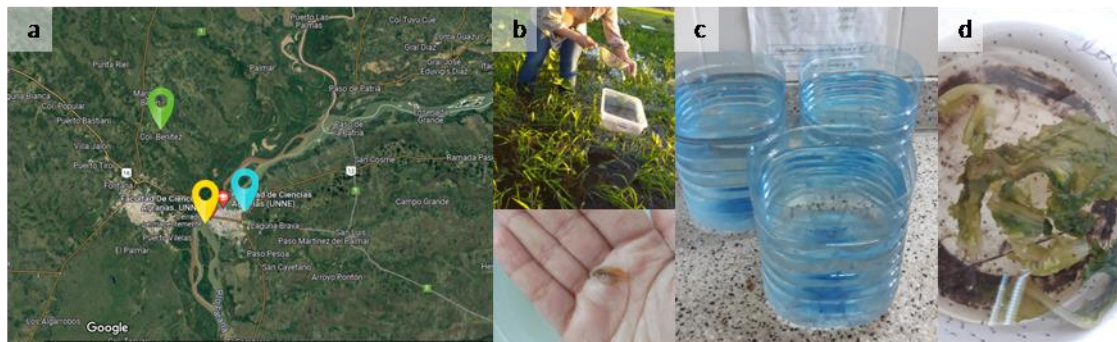


## MATERIALES Y MÉTODO

### Obtención de material de estudio

#### Obtención y cría de larvas

Se colectaron larvas de *Scinax nasicus* desde septiembre 2022 hasta abril 2023, en distintos sitios de la ciudad de Corrientes: Campus Universitario Deodoro Roca (27°28'4"S, 58°46'58"O) y en dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias (27°27'25.6"S 58°49'23"W) (Figura 1 a). Las larvas se capturaron con copo de mano y se transportaron al laboratorio en bateas plásticas con agua de charca (Figura 1 b), para su cría y mantenimiento. Las larvas fueron mantenidas a temperatura ambiente (24°C-35°C), en bateas plásticas de 6 L, con agua corriente declorinada, y alimentadas *ad libitum* con lechuga hervida procesada hasta iniciar la metamorfosis (Figura 1 c y d). Los individuos en clímax metamórfico, se traspasaron a bateas diseñadas con una interfaz agua-tierra, hasta completar la metamorfosis (Figura 2 a). Durante este periodo, los individuos no se alimentaron. Al finalizar la metamorfosis, los ejemplares juveniles se trasladaron a terrarios acondicionados con sustrato húmedo, rocas y vegetación (Figura 2 b). Dichos ejemplares fueron alimentados con larvas de *Drosophila sp*, termitas y ninfas de *Acheta domestica*. Estos se mantuvieron hasta 40 días post metamorfosis (Figura 2 c).



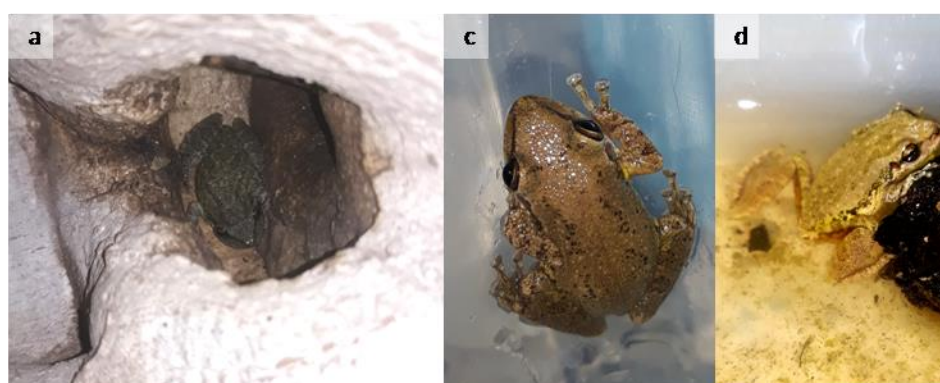
**Figura 1.** Obtención y cría de larvas. a) Ubicación geográfica de los sitios de colecta, pin amarillo: Facultad de Ciencias Veterinarias, pin celeste: Campus Universitario Deodoro Roca (Corrientes), pin verde: Colonia Benítez (Chaco); b) Obtención de larvas con copo de mano, colocadas en bateas plásticas; c) Agua declorinada; d) alimentación con lechuga *ad libitum*.



**Figura 2.** Cría y mantenimiento de metamórficos y juveniles. a) Larvas metamórficas; b) pasaje de larvas a bateas diseñadas con una interfaz agua-tierra; c) Juvenil en terrario acondicionado; d) alimentación con termitas, larvas de *Drosophila* sp. y *Acheta domestica*.

### Obtención de ejemplares adultos

Se colectaron 6 ejemplares de adultos de *Scinax nasicus* (3 hembras y 3 machos) en la localidad de Colonia Benítez (27°20'00.7"S, 58°56'19.0"W) provincia del Chaco (Figura 1 a), en noviembre 2022 y marzo 2023. Las colectas se realizaron en horarios de la tarde-noche, entre las 18 y 24 hs, posteriores a los días de lluvia. La localización de los ejemplares se realizó mediante la escucha de los cantos de apareamiento en bromeliáceas, o en pequeñas cavidades de árboles próximos a cuerpos de agua (Figura 3). La colecta de los ejemplares se realizó mediante captura manual. Posteriormente, fueron transportados al laboratorio en frascos acondicionados, para mantener la humedad y la oxigenación.



**Figura 3.** Obtención de ejemplares adultos. a) Ejemplar de *Scinax nasicus*, en la cavidad de un árbol; b) Ejemplar hembra; c) Ejemplar macho.

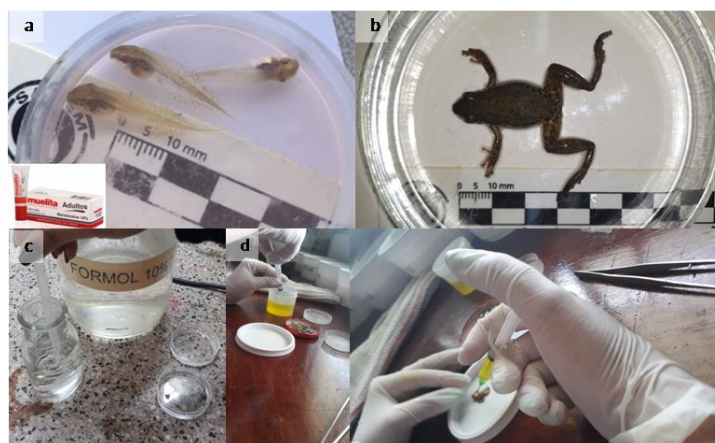
### Selección y fijación del material biológico

Los ejemplares fueron anestesiados y sacrificados siguiendo el protocolo de la American Veterinary Medical Association (Leary et al., 2013) aprobado por el comité de ética de FaCENA UNNE. La identificación de los estadios (E.) larvales se realizó en base a Gosner (1960). La categorización de



los periodos larvales, se realizó siguiendo el criterio morfológico propuesto por Altig (1970) (periodo prometamórfico: E. 26 al 41 y clímax metamórfico: E. 42 al 46).

Las larvas, juveniles y adultos fueron fijados siguiendo el protocolo de la American Veterinary Medical Association (Leary et al. 2013). Grupos de 10 larvas en diferentes estadios del periodo prometamórfico y clímax metamórfico, fueron anestesiadas con una solución de Benzocaína al 10% (Muelita®), agregada al agua de cría. Posteriormente, se fijaron, en formol 10 % (para los estudios anatómicos) y en solución de Bouin (para los estudios histológicos), y se conservaron en alcohol 70 %. Los ejemplares juveniles de 10, 30 y 40 días post metamorfosis y adultos, fueron anestesiados tópicamente, fijados con solución de Bouin y conservados en alcohol 70% (Figura 4). Los desechos químicos (formol, alcohol, ácido pícrico y ácido acético) se depositaron en bidones de polietileno con tapa hermética, pertinentemente rotulados (según lo dispone el Procedimiento para la Disposición de Residuos de la FaCENA-UNNE), para ser transportados por el Servicio Recolector de Residuos Peligrosos Municipal, quienes se encargarán de su destino final.



**Figura 4.** Fijación del material biológico. a) Larvas anestesiadas con una solución de Benzocaína agregada al agua de cría.; b) Ejemplar adulto anestesiado tópicamente con Benzocaína; c) Larvas fijadas en Formol 10%; d) Larvas, juveniles y adultos, fijados en solución de Bouin.

### **Análisis de ejemplares**

Se tomaron medidas de la longitud hocico-cloaca (LHC), utilizando el Software ImageJ (V. 1.52) a partir de fotografías obtenidas con lupa estereoscópica LEICA EZ4E. Estos datos fueron utilizados para análisis estadísticos.

### **Análisis macroscópico de las gónadas**

Se realizaron disecciones del material biológico, en la cual, se extrajo los intestinos y vísceras de la cavidad abdominal, dejando el sistema urogenital, para la observación macroscópica de las gónadas bajo lupa estereoscópica o MEB. Para esto último se prepararon las muestras, siguiendo el protocolo de: deshidratación en soluciones de concentración creciente de acetona, secado a punto crítico y metalización con oro-paladio. Las observaciones se realizaron en un Microscopio JEOL JSM-5800 LV

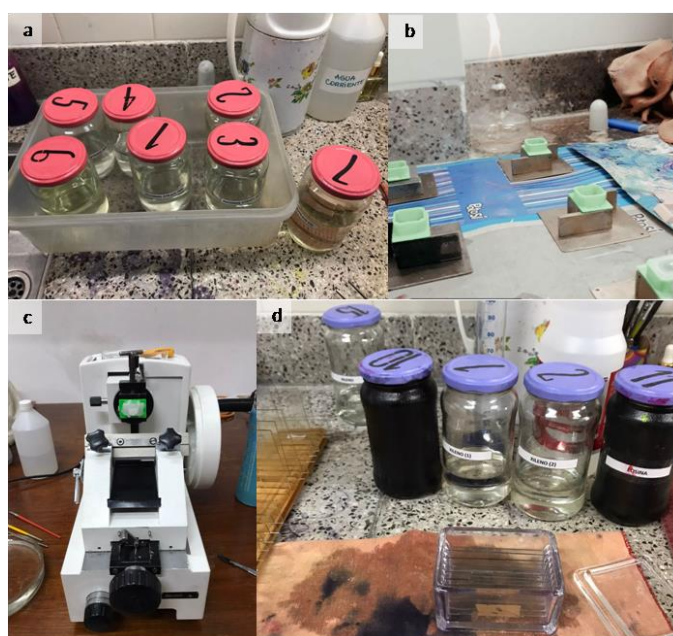




perteneciente al servicio de microscopía electrónica de barrido de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE. Los desechos biológicos que se generaron fueron depositados en bolsas impermeables de color rojo atados con doble nudo (según lo dispone el Procedimiento para la Disposición de Residuos de la FaCENA-UNNE), los cuales, se recolectaron por el Servicio de Recolección de Residuos Patológicos Municipal, quienes se encargaron de su destino final. Se analizó y caracterizó la topografía y morfología de las gónadas en diferentes estadios del desarrollo. A cada ejemplar se le midió el ancho, largo y área de la gónada y área de los cuerpos grasos derechos e izquierdos, utilizando el software ImageJ (V. 1.52) a partir de fotografías tomadas con lupa estereoscópica. Se examinaron 10 ejemplares de cada estadio a fin de minimizar las variaciones morfológicas individuales derivadas de diferencias en el tiempo de desarrollo de cada estadio particular.

### **Análisis histológico de las gónadas**

Se analizó la estructura histológica de las gónadas en distintos estadios del desarrollo larval, metamórfico y postmetamórfico, incluyendo estadios juveniles y adultos en edad reproductiva. Para ello se confeccionaron preparados histológicos siguiendo el protocolo convencional de histología consistente en: deshidratación en soluciones crecientes de alcohol etílico 70%, 80%, 96% (Figura 5 a). Para este procedimiento, los ejemplares prometamórficos y juveniles, se dejaron 20 minutos en cada paso de deshidratación, en cambio los ejemplares adultos se dejaron 30 minutos, debido a la diferencia de tamaño. Posteriormente, las muestras se pasaron a una solución de alcohol butílico (100%) por 12 horas e impregnación en alcohol butílico - parafina (50-50%) e inclusión en parafina (100%), por dos horas cada una. En la confección de tacos (Figura 5 b), las piezas fueron orientadas para realizar cortes transversales con un micrótomoto rotatorio ARCANO KD-1508Am (Figura 5 c). Las secciones de 5  $\mu$ m de espesor fueron montadas y coloreadas con coloración convencional de hematoxilina-eosina (H-E) o coloración de May-Grünwald Giemsa (Figura 5 d). Se examinaron en total 3 ejemplares de cada sexo con el fin de identificar diferencias individuales en el tiempo de desarrollo de las estructuras gonadales. Las muestras analizadas se fotografiaron con cámara digital. A partir de estas fotografías se realizaron mediciones de células germinales primordiales, ovogonias, ovocitos y folículos en distintas fases del crecimiento con el software Image J (V. 1.52).





**Figura 5.** Protocolo convencional de histología. a) Deshidratación en soluciones crecientes de alcohol etílico 70%, 80%, 96%; b) Confección de tacos c) Micrótopo rotatorio ARCANO KD-1508Am; d) Coloración convencional de H-E o coloración de May-Grünwald Giemsa.

### **Análisis e interpretación de los datos**

A partir de los datos obtenidos, se caracterizó y secuenció el desarrollo de ovarios y testículos y se determinó el patrón de desarrollo gonadal. La descripción de la morfología e histología ovárica y testicular, se realizó a partir de lo sugerido por Ogielska & Kotusz (2004) y Haczkiwicz & Ogielska (2013), respectivamente. Asimismo los estadios de los eventos de la ovogénesis, se realizaron a partir de lo sugerido por Aranzábal (2011). Los estadios sugeridos por estos tres autores mencionados, fueron modificados y adaptados de acuerdo a lo observado en la especie en estudio. Además se realizaron ilustraciones y esquemas de lo observado con técnicas de entintado y digitalización.

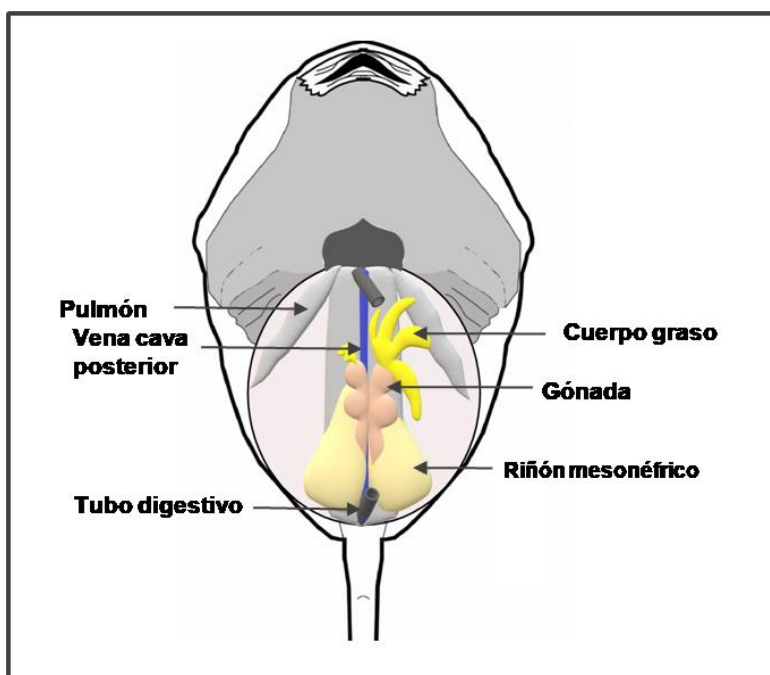
### **Análisis estadístico**

Se realizó el análisis estadístico, a partir de los datos obtenidos utilizando en el software Infostat (V 2020e). Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre la LHC de los ejemplares, el área de la gónada y el área de los cuerpos grasos, y ANCOVA con comparaciones de Tukey, para determinar la variación de la morfología gonadal en los distintos periodos del desarrollo con la Co-variante LHC. Como valores significativos se tomaron valores de  $p < 0,05$ . Se realizaron gráficos de barra para la representación gráfica de los datos obtenidos.



## RESULTADOS

En el estado larval y juvenil de *Scinax nasicus*, el sistema reproductor, presentó un par de gónadas, ubicadas a ambos lados de la vena cava posterior en posición ventro-medial anterior a los riñones mesonéfricos y cuerpos grasos que se localizaron en la región anterior de éstas (Figura 6). Durante el desarrollo gonadal se reconoció una etapa indiferenciada, tanto a nivel morfológico como histológico y una etapa de diferenciación ovárica y testicular. En esta etapa se reconocieron distintos estadios de diferenciación gonadal (Tabla 1), en base a características histológicas de la gónada masculina y femenina. Asimismo, se reconocieron distintos estadios de la ovogénesis y del desarrollo y crecimiento folicular, que comprende una etapa de crecimiento primario o previtelogénesis y una etapa de crecimiento secundario o vitelogénesis (Tabla 2).



**Figura 6.** Esquema en vista ventral de larva de *Scinax nasicus*, mostrando la ubicación topográfica del sistema urogenital en la cavidad abdominal. Ilustración: Vaca D. Ayelen.





**Tabla 1.** Estadios del desarrollo y diferenciación gonadal, en base a las características histológicas.  
Modificado de Ogielska & Kotusz (2004) y Haczkiwicz & Ogielska (2013).

| ESTADIO |                      | DIFERENCIACIÓN OVÁRICA   | DIFERENCIACIÓN TESTICULAR  |
|---------|----------------------|--|--|
| I       | Etapa indiferenciada | Células germinales primordiales (CGP) con plaquetas vitelinas en el citoplasma. Proceso de migración (desde el endodermo a la cresta genital), activa mitosis y vitelolisis. |  |
| II      |                      | Llegada de las CGP a la cresta genital y culminación de la vitelolisis.  |  |
| III     |                      | Células somáticas se disponen entre las células germinales.  |  |
| IV      |                      | Formación de una región medular con células somáticas y una cortical con ovocitos en profase meiótica. Inicio de la foliculogénesis.   | Inicia la actividad mitótica y se forman nidos de espermatogonias.   |
| V       |                      | Surge la cavidad medular, producto del reordenamiento de las células somáticas de la médula. Células prefoliculares se asocian a los ovocitos.                               | Células somáticas comienzan a organizarse en cordones sexuales entre las espermatogonias. Formación de una región medular con células somáticas (rete testis prospectivo). |
| VI      |                      | Ovocitos en diplotene asociados a células foliculares. Inicio del crecimiento primario de los folículos.   | Los cordones sexuales delimitan los túbulos seminíferos y se unen a la rete testis.  |
| VII     |                      | Los ovocitos, próximos a la cavidad medular, aumentan su contenido citoplasmático y la comienzan a obliterar.  | Formación del cisto por asociación de la célula de Sertoli y una espermatogonia.   |
| VIII    |                      | Cavidad medular muy reducida. Corteza, con predominio de folículos con ovocitos con citoplasma muy basófilo, y núcleo con numerosos nucléolos.                               | Activa mitosis de las espermatogonias y presencia de espermatogonias secundarias.  |
| IX      | a                    | Aumento de la corteza por presencia de folículos en crecimiento. Folículos tempranos y nidos germinales, permanecen en la periferia.   | Inicio de meiosis. Se observan espermatocitos primarios.   |
|         | b                    | Nidos germinales y folículos tempranos, presentes a modo de parches en la periferia de la corteza.   |  |
| X       |                      | Folículos en crecimiento primario y secundario, obliteran por completo la cavidad ovárica.   | Se observa toda la línea espermática. Activa meiosis. Y células de Leydig entre los túbulos seminíferos.   |



| ETAPA                | INICIO FOLICULOGÉNESIS   |  | CRECIMIENTO PRIMARIO O VITELOGÉNESIS      |  |  |   |  | CRECIMIENTO SECUNDARIO O VITELOGÉNESIS           |   |
|----------------------|--|--|---|--|--|---|--|--|---|
| Estadio              | 1  |  | 2   |  |  | 3   |  | 4  | 5   |
| Sub estadio          | a  | b  | a   | b  | c  | a   | b  |  |   |
| Diámetro del ovocito | 14 $\mu\text{m}$   | 23 $\mu\text{m}$   | 48 $\mu\text{m}$                          | 48 $\mu\text{m}$   | 53 $\mu\text{m}$   | 77 $\mu\text{m}$                            | 87 $\mu\text{m}$                         | 225 $\mu\text{m}$                                | 615 $\mu\text{m}$                                     |
| Núcleo               | Central voluminoso. Condensación y apareamiento de cromosomas. | Central voluminoso. Condensación y apareamiento de cromosomas. | Central voluminoso. Un nucléolo.          | Central voluminoso. Dos o más nucléolos y cromosomas plumosos. | Central voluminoso. Dos o más nucléolos y cromosomas plumosos. | Central voluminoso. Más de cinco nucléolos. | Central voluminoso. Numerosos nucléolos. | Central voluminoso. Nucléolos en la periferia.   | Excéntrico hacia el polo animal. Numerosos nucléolos. |
| Citoplasma           | Hialino  | Hialino  | Tenue basofilia                           | Tenue basofilia  | Tenue basofilia  | Aumento de basofilia                        | Muy basófilo                             | Plaquetas de vitelo eosinófilas en la periferia. | Plaquetas de vitelo en todo el citoplasma.            |
| Célula folicular     | Ausentes. Células somáticas rodeando nidos de ovocitos.        | Células prefoliculares asociadas al ovocito.                   | Tres a cinco células foliculares cúbicas. | Aumento del número de foliculares. Capa incompleta.            | Células foliculares escamosas. Capa folicular completa.        | Células foliculares escamosas.              | Células foliculares escamosas.           | Células foliculares escamosas.                   | Células foliculares escamosas.                        |

**Tabla 2.** Estadios de la ovogénesis y desarrollo y crecimiento folicular. Basado en características histológicas del ovocito y las células prefoliculares y foliculares. Modificado de Aranzábal (2011).

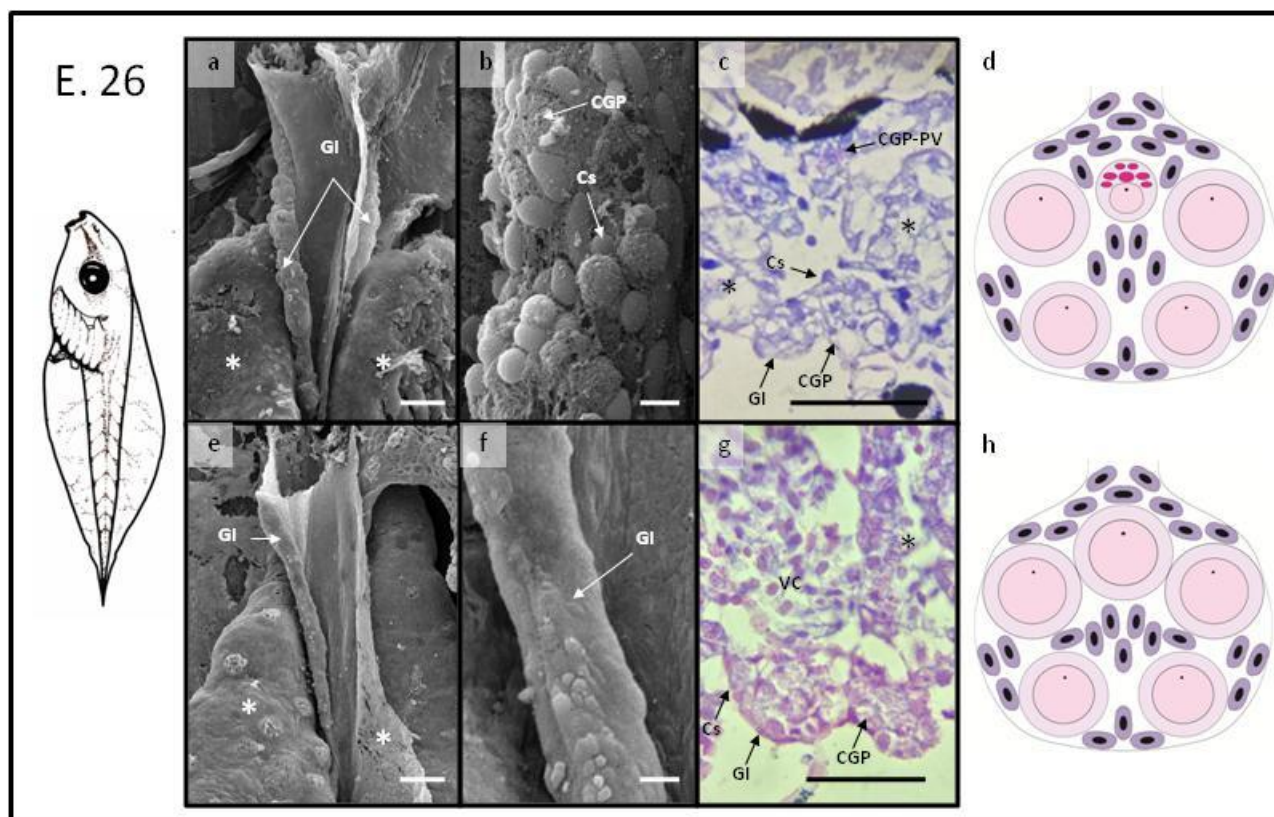
## Descripción morfo-histológica

### Etapas indiferenciadas

Se observó variación en la morfología de la gónada, entre los ejemplares, en E. 26, analizados. En algunos individuos, se observaron los esbozos gonadales indiferenciados, como delgados cordones de contorno irregular. Bajo MEB, estos cordones, no mostraron una organización definida, y se reconocieron dos tipos celulares, células germinales, caracterizadas por su gran tamaño (diámetro media: 16  $\mu\text{m}$ ) y células somáticas más pequeñas (Figura 7 a y b). En estos esbozos gonadales, no se reconoció un epitelio de recubrimiento, observándose dichas células en superficie. A nivel histológico, en los esbozos gonadales, se reconocieron células germinales primordiales (CGP) con núcleo globoso traslúcido de cromatina laxa, caracterizadas por su gran tamaño (diámetro media: 14  $\mu\text{m}$ ) (Gráfico 1), asociadas con células somáticas pequeña, de forma oval con núcleo intensamente basófilos (Figura 7 c y d). Se reconocieron dos tipos morfológicos de CGP, según su estado de diferenciación celular: células con plaquetas vitelinas eosinófilas (diámetro media: 5  $\mu\text{m}$ ) (Gráfico 1), en etapa temprana de la vitelolisis, y células sin plaquetas vitelinas, levemente más grandes que las anteriores, en etapa final de la vitelolisis. Las primeras se observaron, también, fuera de los esbozos gonadales, próximos al tejido mesonéfrico. Esta morfología de la gónada, se corresponde al estadio II del desarrollo gonadal (Tabla 1).



En otros individuos, la gónada presentó un epitelio de recubrimiento, también observado bajo MEB (Figura 7 e y f), células germinales, en mayor número que en la etapa previa, intercaladas con células somáticas (Figura 7 g y h). Esta morfología se corresponde con el estadio III del desarrollo gonadal (Tabla 1).



**Figura 7. Etapa indiferenciada del desarrollo gonadal de *Scinax nasicus*.** La figura muestra una fotografía de microscopía electrónica de barrido de los esbozos gonadales de individuos en E. 26, una sección histológica y un esquema representativo de esta sección. **a)** y **e)** vista general de la gónada (escala 50 µm), **b)** detalle de la gónada, observándose células germinales primordiales y células somáticas (escala 5 µm). **c)** muestra la presencia de células germinales primordiales con plaquetas vitelinas (escala 0,05 µm). **f)** detalle de la gónada, donde se observa el epitelio de recubrimiento (escala 5 µm); **g)** muestra el epitelio de recubrimiento conformado por células somáticas, nótese la ausencia de células germinales primordiales con plaquetas vitelinas (escala 0,05 µm). Referencias: **GI**: gónada indiferenciada; **CGP**: célula germinal primordial; **GCP-PV**: célula germinal primordial con plaquetas vitelinas; **Cs**: Célula somática; **VC**: vena cava posterior; \*: riñones mesonéfricos. Ilustración: Vaca D. Ayelen.

## Diferenciación del ovario

### Periodo prometamórfico

Los primeros eventos de diferenciación ovárica, se reconocieron en larvas en E. 26, tanto a nivel morfológico, como histológico. A nivel morfológico, los ovarios presentaron contorno liso y una forma alargada con el extremo anterior más ensanchado (Figura 8). En estos individuos, el área gonadal promedio fue de 0,01 mm<sup>2</sup> (Gráfico 2). A nivel histológico, el ovario presentó una zona cortical y medular, bien diferenciadas. La zona medular presentó una estructura maciza, conformada por células somáticas. La zona cortical presentó nidos germinales conformados por ovogonias (diámetro media 14 µm) y



ovocitos en estadio 1a, en leptotene, cigotene y paquitene (Gráfico 1), rodeados por células somáticas, indicativo del inicio de la foliculogénesis (Tabla 2 y Figura 8). Esta estructura, se corresponde con el estadio IV del desarrollo ovárico (Tabla 1).

El ovario de larvas en E. 27 y 28, presentó de 2 a 3 lobulaciones en la cara externa (Figura 8), siendo el área promedio de  $0,04 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, presentó una cavidad ovárica en la zona medular, tapizada por un epitelio de células somáticas. A diferencia del estadio previo, se observó mayor número de nidos germinales con ovogonias y ovocitosmeióticos. En el interior de algunos de estos nidos germinales, se observaron células somáticas (prefoliculares) asociadas a los ovocitos meióticos en estadio 1b (Figura 8; Gráfico 1). Asimismo, se reconocieron folículos primordiales, formados por el ovocitomeiótico rodeado por una capa incompleta de células prefoliculares (Tabla 2). Esta estructura es característica del estadio V del desarrollo ovárico (Tabla 1).

En el E. 31, la gónada, presentó de 3 a 4 lóbulos (Figura 8), siendo el área promedio de  $0,06 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, se observó una cavidad medular más amplia y una corteza más desarrollada. En esta, además de nidos germinales y folículos primordiales, se observaron folículos en estadio 2a del crecimiento primario (previtelogénesis) (Figura 8; Gráfico 1), formados por el ovocito en diplotene, caracterizado por un citoplasma ligeramente basófilo, y núcleo voluminoso, de posición central y nucleoplasma hialino, con un nucléolo, rodeado por una capa incompleta de células foliculares (Tabla 2). Estos, se ubicaron próximos a la cavidad medular, quedando los nidos germinales y folículos primordiales, hacia la periferia. Esta estructura se corresponde con el estadio VI del desarrollo ovárico (Tabla 1).

Entre el E. 33 y 38, el ovario, mantuvo el número de cuatro lóbulos (Figura 8), con un área promedio de  $0,091 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, además de las estructuras antes descritas, se reconocieron folículos en estadio 2b del crecimiento primario (Figura 8; Gráfico 1), formados por ovocitos cuyo núcleo presentó dos o más nucléolos, rodeados por una capa incompleta de células foliculares (Tabla 2). Estos folículos obliteraron, en parte, la cavidad medular. Esta estructura, se corresponde al estadio VII del desarrollo ovárico (Tabla 1).

Al finalizar el periodo prometamórfico, en los E. 40 al 41, los ovarios, presentaron de cinco a ocho lóbulos (Figura 8), siendo el área promedio de  $0,1 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, el ovario se diferenció de los estadios previos, por la presencia de folículos en estadio 2c del crecimiento primario (Figura 8; Gráfico 1). Estos se caracterizaron por poseer una capa completa de células foliculares (Tabla 2). Estructuras características del estadio VII del desarrollo ovárico (Tabla 1).

### **Clímax metamórfico**

En el periodo del clímax metamórfico, E. 42-46, el ovario, no mostró diferencias morfológicas con respecto a estadios previos (Figura 9) y presentó un área promedio de  $0,14 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, se observó una cavidad medular muy reducida y una corteza ovárica, formada por folículos en distintos estadios del crecimiento primario, principalmente en estadio 3ª (Figura 9; Gráfico 1). Estos se caracterizaron por presentar ovocitos con citoplasma intensamente basófilo, y núcleo con numerosos nucléolos (Tabla 2). Estas características, se corresponden al estadio VIII del desarrollo ovárico (Tabla 1).



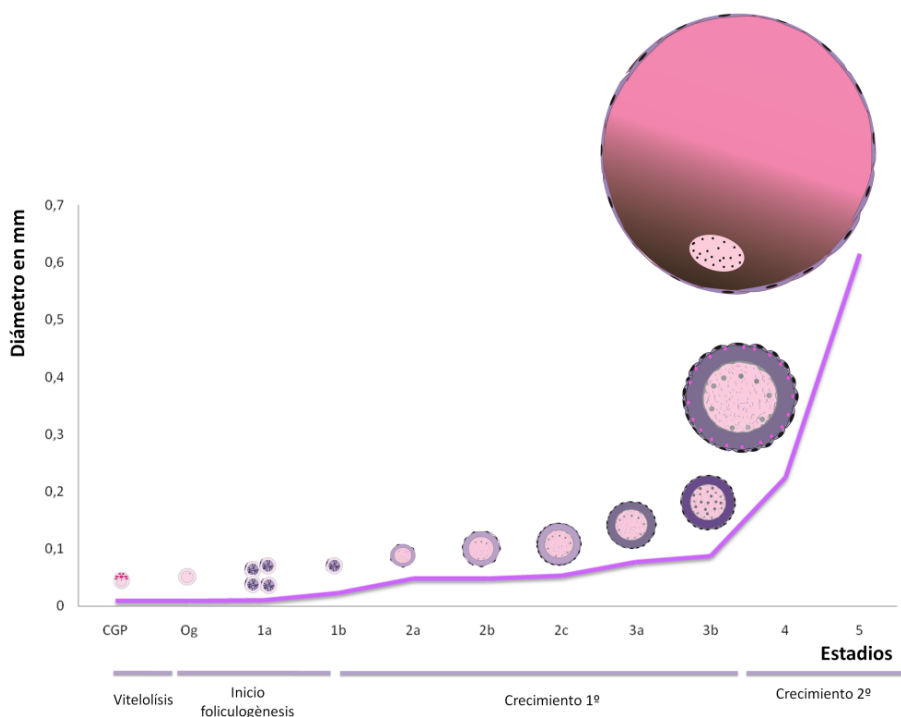
### **Periodo post metamórfico**

A los 10 y 30 días post metamorfosis, el ovario mostró entre siete a ocho lóbulos (Figura 10); y el área promedio varió entre 0,35 y 0,9 mm<sup>2</sup> (Gráfico 2). A nivel histológico, se observó una cavidad medular pequeña y una corteza ovárica bien desarrollada, formada por folículos en distintos estadios del crecimiento primario. Estos se ordenaron en gradiente, los más pequeños en la parte más externa y los más grandes próximos a la cavidad medular (Figura 10). La mayoría de estos folículos, se encontraban en estadio 3b (Gráfico 1) y se caracterizaron por presentar ovocitos con citoplasma basófilo y homogéneo y núcleo con numerosos nucléolos (Tabla 2). Estas características, se corresponden con el estadio IXa del desarrollo ovárico (Tabla 1).

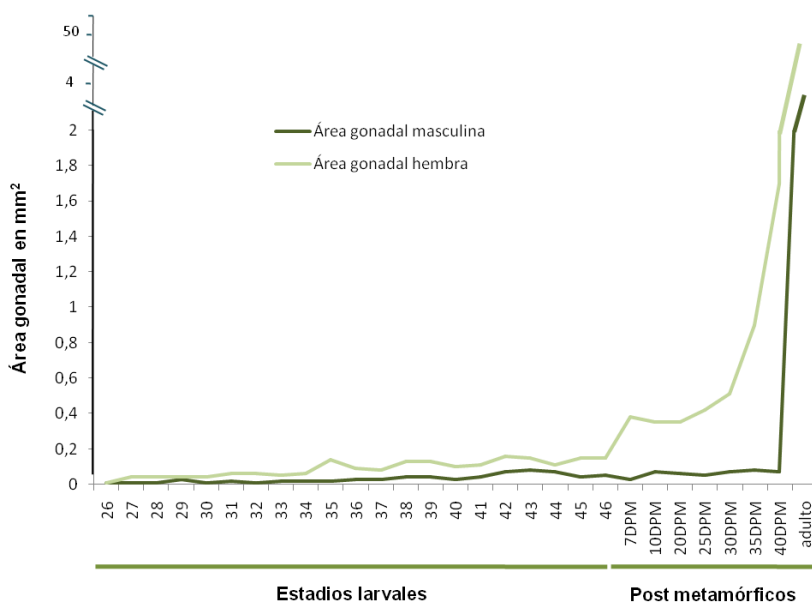
A los 40 días post metamorfosis, el ovario alcanzó un área promedio de 1,7 mm<sup>2</sup> (Gráfico 2). A nivel histológico, se caracterizó por presentar, predominantemente, folículos en estadio 3b, y parches de folículos en estadio 1 y 2 y nidos germinales, dispuestos en la región más externa de la corteza (Figura 10). Estas características, se corresponden con el estadio IXb del desarrollo ovárico (Tabla 1).

### **Hembra adulta**

En la hembra adulta, el ovario presentó lóbulos muy desarrollados con numerosos folículos vitelogénicos, visibles a simple vista y bajo lupa estereoscópica (Figura 11a). El área promedio registrada fue de 46,63 mm<sup>2</sup>. Los folículos vitelogénicos, presentaron el polo animal marrón oscuro y el polo vegetal más claro. A nivel histológico, el ovario, presentó una cavidad medular obliterada por folículos vitelogénicos en estadio 4 y 5 del crecimiento secundario, los últimos en mayor número. Los folículos en estadio 4 (Gráfico 1), se caracterizaron por presentar ovocitos con citoplasma basófilo, con pequeñas plaquetas vitelinas eosinófilas dispuestas en el córtex citoplasmático y núcleo central con numerosos nucléolos periféricos (Tabla 2; Figura 11b). Los folículos en estadio 5 (Gráfico 1), tuvieron mayor tamaño que los anteriores y presentaron abundantes plaquetas vitelinas, ocupando todo el citoplasma, núcleo de posición excéntrica, con numerosos nucléolos y pigmentos dispuestos en la periferia del citoplasma, más abundantes en el polo animal (Tabla 2; Figura 11b). Asimismo, se observaron grupos de folículos previtelogénicos y nidos germinales dispersos en la región más externa de la corteza y folículos con distintos grados de atresia (Figura 11c). Estas características se corresponden al estadio X del desarrollo ovárico (Tabla 1).



**Gráfico 1. Diferenciación de la línea germinal y desarrollo folicular de *Scinax nasicus*.** El gráfico muestra los estadios de la ovogénesis, desde la diferenciación de las ovogonias (**Og**), a partir de las células germinales primordiales (**CGP**), hasta la maduración del ovocito, previo a la ovulación. Asimismo, se representa la etapa de foliculogénesis y las etapas del crecimiento folicular. Para el detalle de los estadios de la ovogénesis, ver **Tabla 2**. Ilustración: Vaca D. Ayelen.



**Gráfico 2. Comparación del área de ovarios y testículos, durante el desarrollo de *Scinax nasicus*.** El gráfico muestra un aumento exponencial del área del ovario durante el periodo post metamórfico. Nótese que el testículo se mantiene casi constante hasta los 40 días post metamorfosis (DPM) Y presenta un incremento abrupto en el área del testículo.





## Diferenciación del testículo

### *Periodo prometamórfico*

Hasta el E. 40, el testículo presentó forma de cordones de contorno irregular (Figura 8), con un área promedio de  $0,017 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2).

A partir del E. 26 y hasta el E. 35, el testículo presentó una estructura indiferenciada, maciza con células germinales (espermatogonias) intercaladas con células somáticas. Las espermatogonias, se caracterizaron por ser células voluminosas con citoplasma homogéneo y núcleo voluminoso de posición central, con cromatina laxa y un nucléolo (Figura 8). Estas características se corresponden al estadio IV del desarrollo testicular (Tabla 1).

Los primeros signos de diferenciación testicular, se observan en el E. 35. En el testículo, se reconoce en la región central, un núcleo de células somáticas (rete testis prospectiva) y los primeros cordones sexuales. Estas características se corresponden al estadio V del desarrollo testicular (Tabla 1). En el E. 38, estos cordones sexuales están más definidos, contactan con la rete testis prospectiva y delimitan los futuros túbulos seminíferos (Figura 8). Estas características se corresponden al estadio VI del desarrollo testicular (Tabla 1).

En el E. 40, el testículo, se diferenció de los estadios previos y presentó forma alargada de contorno liso (Figura 8), siendo su área promedio de  $0,03 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, el testículo, presentó un epitelio externo incompleto formado por células somáticas planas y túbulos seminíferos bien delimitados por los cordones sexuales. En los túbulos seminíferos se observaron cinco a ocho espermatogonias, algunas de ellas asociadas con células somáticas (pre Sertoli) (Figura 8). Las células pre Sertoli, presentaron forma triangular y núcleo intensamente basófilo. Estas características se corresponden al estadio VII del desarrollo testicular (Tabla 1).

### *Clímax metamórfico*

Durante el este periodo, no se observaron variaciones morfológicas (Figura 9), siendo el área promedio de  $0,065 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, se observó un mayor número de túbulos seminíferos, y se reconocen seis a 12 cistos de espermatogonias. El rete testis prospectiva, es aún evidente como un cúmulo macizo de células somáticas en el centro del testículo. Al finalizar la metamorfosis, E. 46, el testículo mostró mayor número de túbulos seminíferos y mayor cantidad de cistos en cada uno, en comparación con los estadios anteriores (Figura 9).

### *Periodo post metamórfico*

Durante el periodo post metamórfico, hasta los 40 días post metamorfosis, no se observaron diferencias respecto a los estadios anteriores (Figura 10); el área promedio fue de  $0,061 \text{ mm}^2$  (Gráfico 2). A nivel histológico, el testículo mostró una morfología similar a los estadios metamórficos (Figura 10).

### *Macho adulto*

El testículo presento forma globosa, histológicamente, presentó numerosos túbulos seminíferos con cistos en distintas etapas del desarrollo espermiogénico. Los espermatoцитos primarios presentaron citoplasma hialino y núcleo basófilo, los espermatoцитos secundarios y espermátides tempranas,



presentaron núcleo pequeño intensamente basófilos, además se observaron espermátides con núcleos alargadas y basófilos, característicos de la espermiogénesis. En el intersticio de los túbulos seminíferos, se observaron células de Leydig. Las células de Leydig, presentaron forma poligonal, con citoplasma acidófilo y núcleo basófilo (Figura 9). Estas características se corresponden al estadio X del desarrollo testicular (Tabla 1).


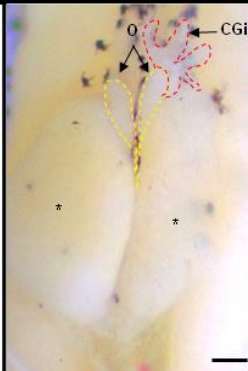
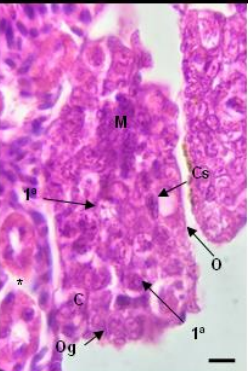
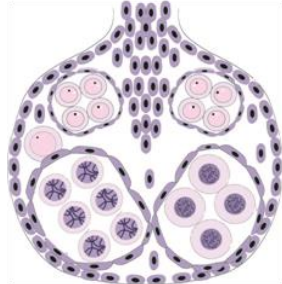
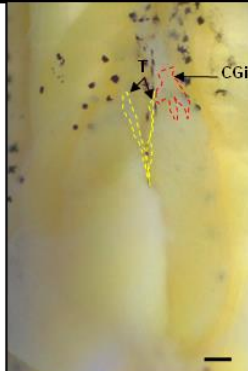
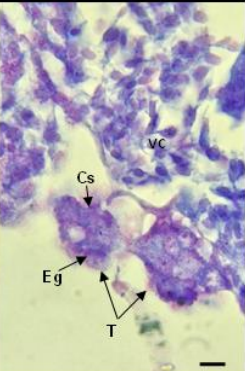
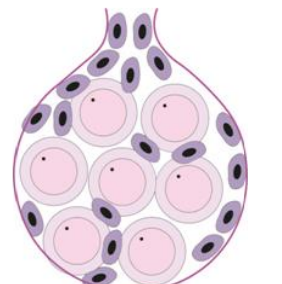


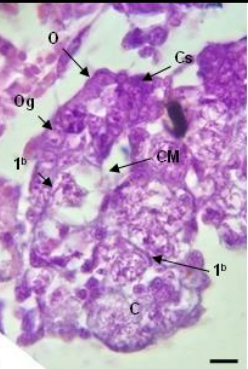

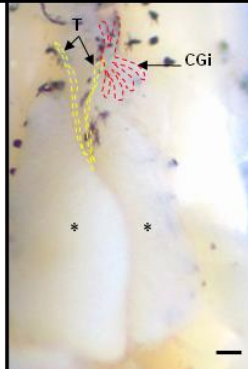
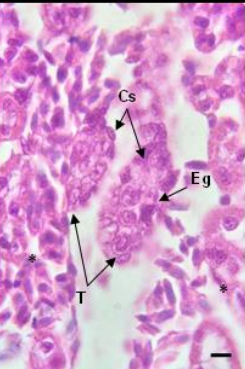
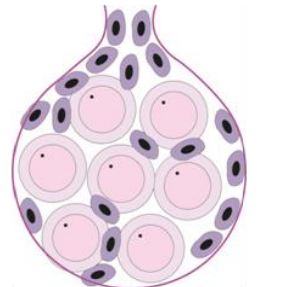

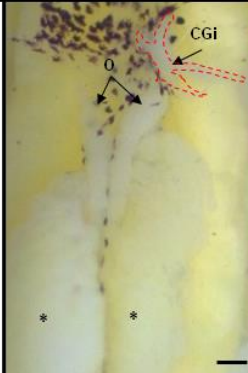
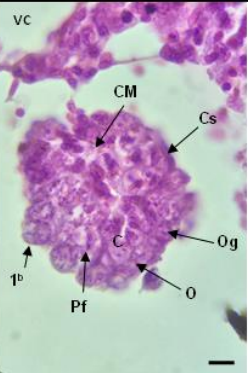
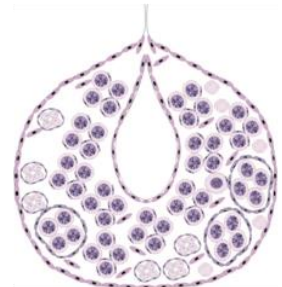
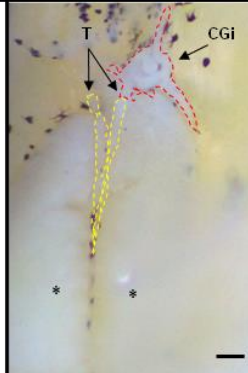
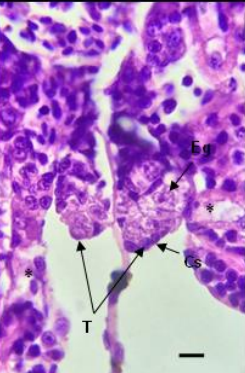
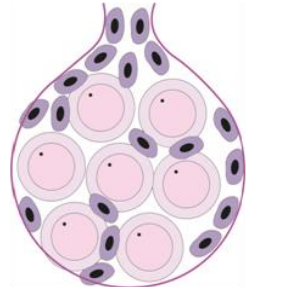
### **Cuerpos grasos**

EL cuerpo graso izquierdo, fue visible a partir del E. 26. Entre los E. 26 y 36, el cuerpo graso izquierdo, presentó forma digitiforme y color blanco, su área promedio varió de 0,02 a 0,45 mm<sup>2</sup>. El cuerpo graso izquierdo, presento de siete a ocho digitaciones conformadas por células globosas. Entre E. 37 y 41, el cuerpo graso izquierdo, mostró una forma plana con digitaciones ramificadas, su área varió de 0,63 a 1,36 mm<sup>2</sup>. Asimismo, en algunos de estos, se observó pigmentación, presentando un color oscuro (Figura 8; Gráfico 3).

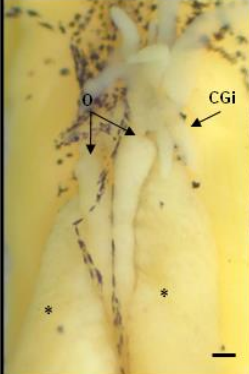
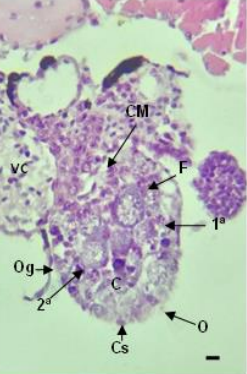
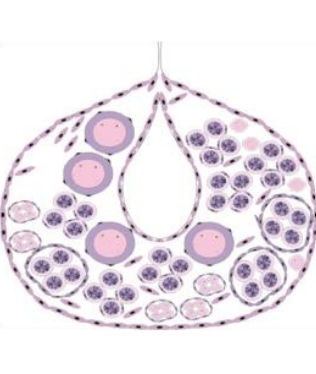
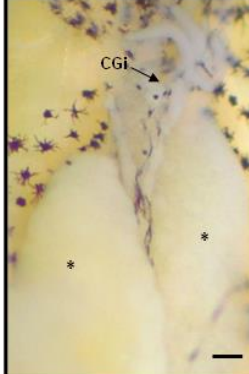

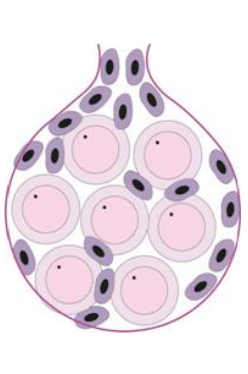
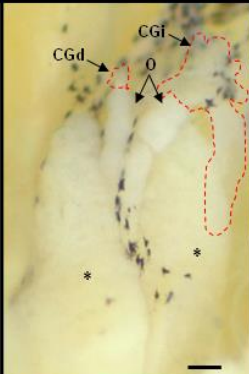
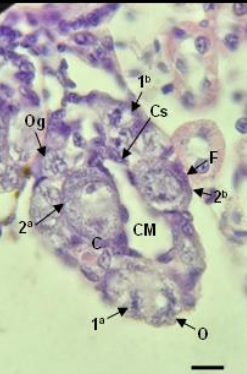
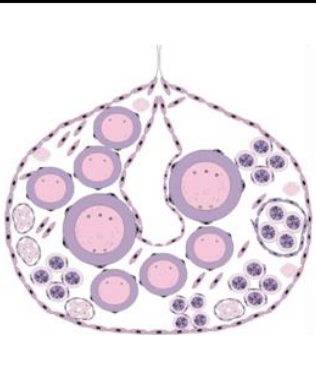
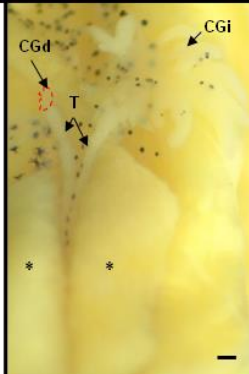
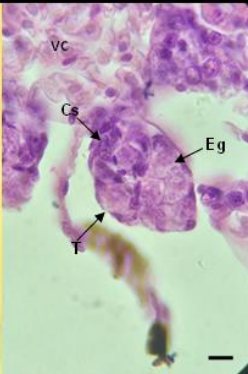
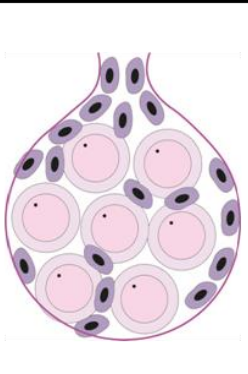
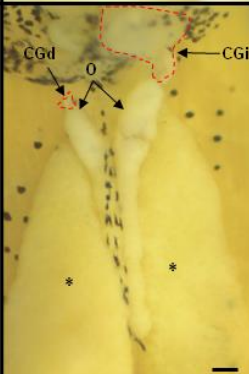
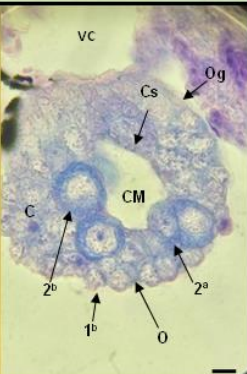
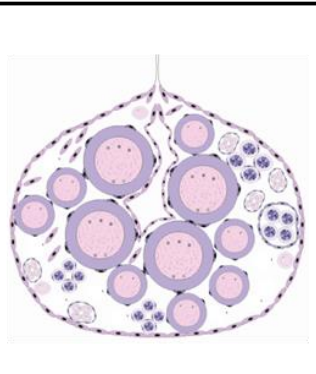
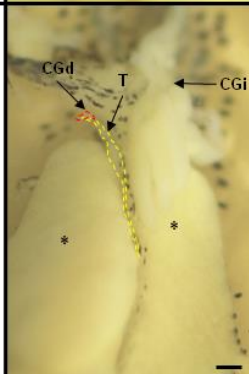
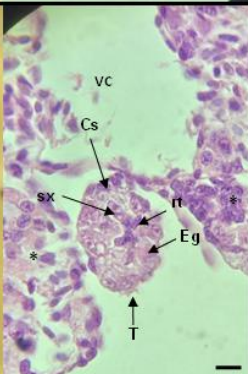
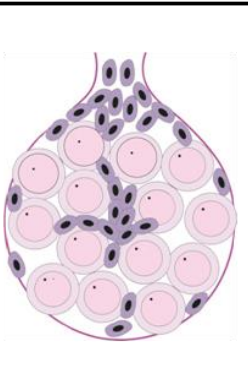
Durante el clímax metamórfico, el cuerpo graso izquierdo presentó forma plana y translúcida, asimismo se registró un mayor tamaño que los estadios previos. El área varió, de 1,1 a 2 mm<sup>2</sup> (Figura 9; Gráfico 3).

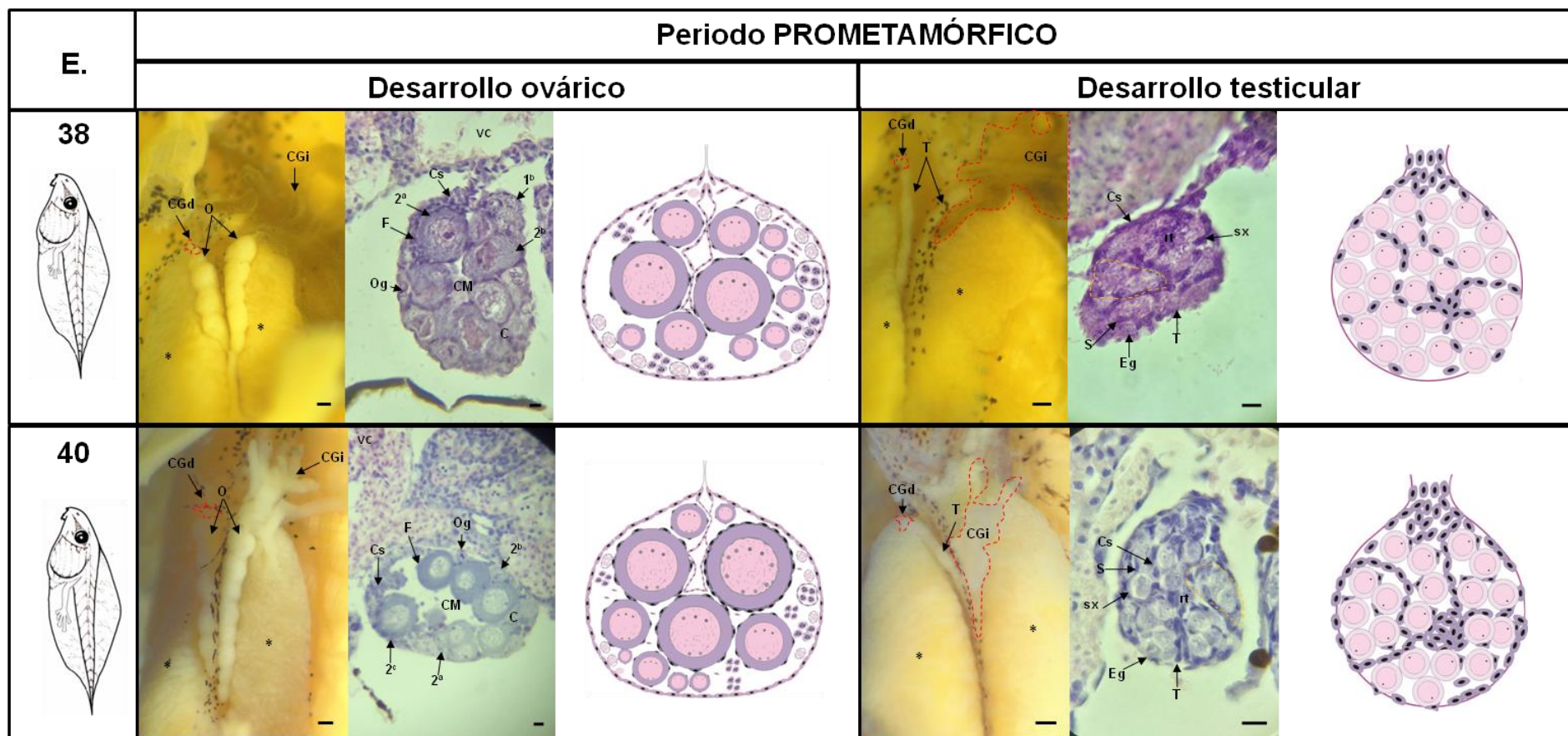
Durante el periodo post metamórfico, el cuerpo graso izquierdo, presentó forma digitiforme y color blanco, mientras que el área disminuyó en comparación al periodo anterior, variando de 0,8 a 0,14 mm<sup>2</sup>, hasta los 40 días postmetamorfosis (Figura 10; Gráfico 3).

EL cuerpo graso derecho, fue visible a partir del E. 33. El cuerpo graso derecho presentó forma irregular con células globosas, color blanco. Sin embargo, su área, no varió significativamente durante todo el desarrollo larval y juvenil. El área promedio fue de 0,04 mm<sup>2</sup> (Figura 8, 9 y 10; Gráfico 3).

| E. | Periodo PROMETAMÓRFICO  |   |   |  |   |   |   |
|----|---|---|---|--|---|---|---|
|    | Desarrollo ovárico  |   |   | Desarrollo testicular  |   |   |   |
| 26 |    |    |    |    |    |    |    |
| 27 |   |   |   |   |   |   |   |
| 28 |  |  |  |  |  |  |  |



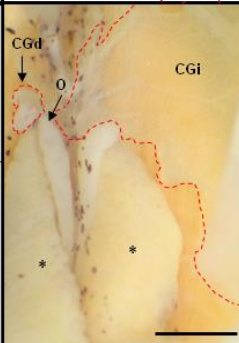

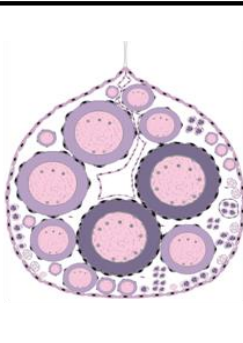
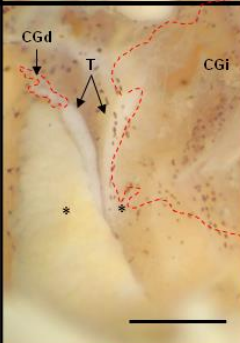
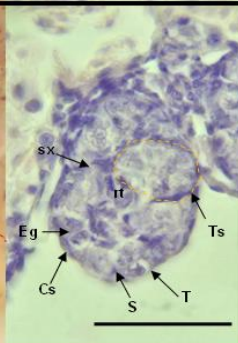
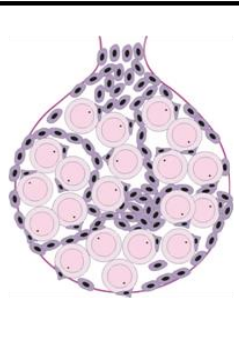
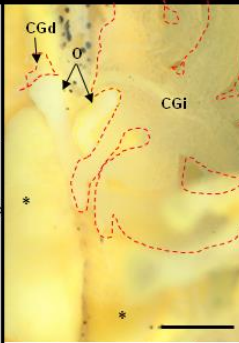


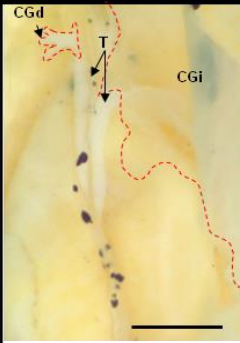
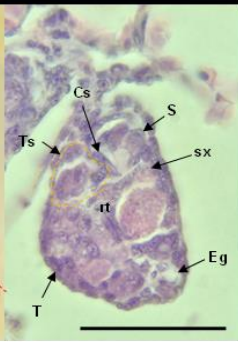
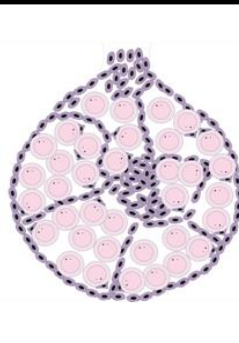
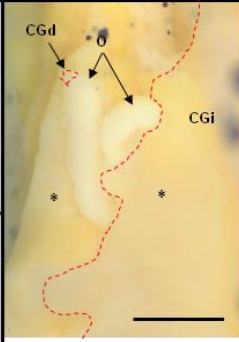
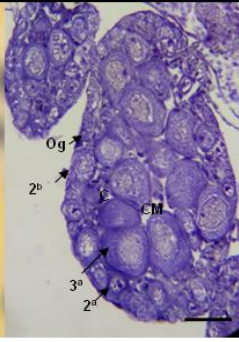

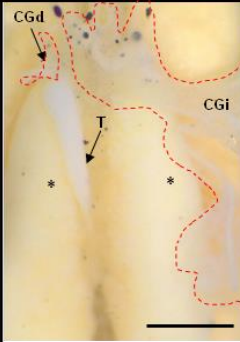
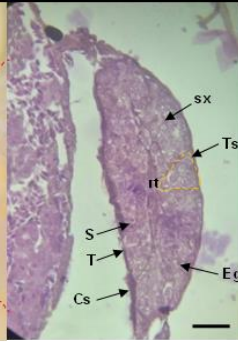

| E. | Periodo PROMETAMÓRFICO  |   |  |   |   |   |
|----|---|---|--|---|---|---|
|    | Desarrollo ovárico  |   |  | Desarrollo testicular   |   |   |
| 31 |    |    |    |    |    |    |
| 33 |   |   |   |   |   |   |
| 35 |  |  |  |  |  |  |



**Figura 8. Desarrollo y diferenciación gonadal de *Scinax nasicus*, durante el periodo prometamórfico.** Para cada estadio, la figura muestra una fotografía de la gónada y cuerpos grasos (escala 0,1mm), la sección histológica del ovario o testículo y una representación esquemática de la sección histológica (escala 0,01mm).

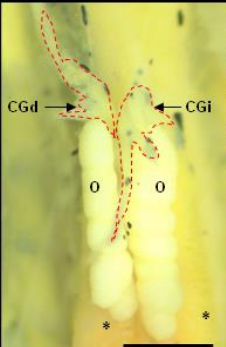
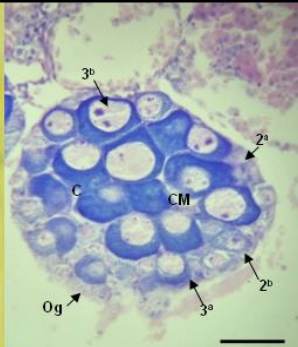
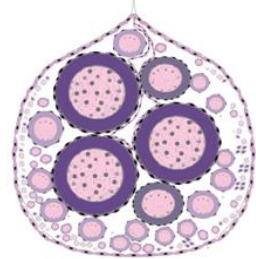
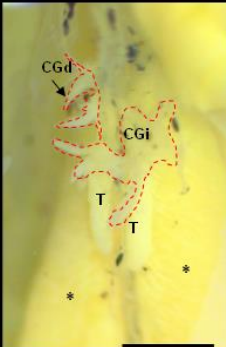

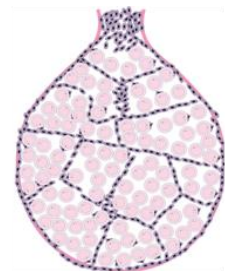
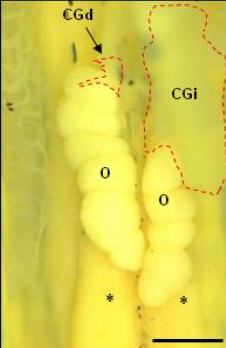
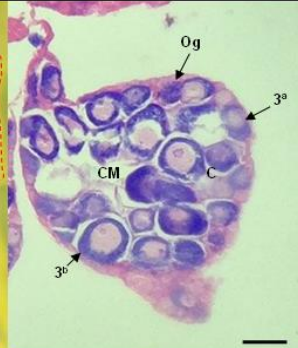
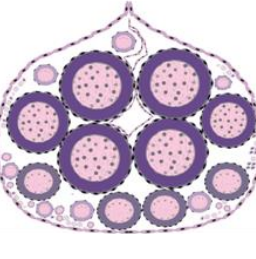
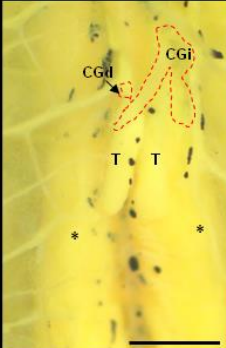
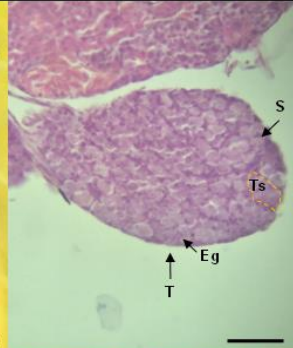


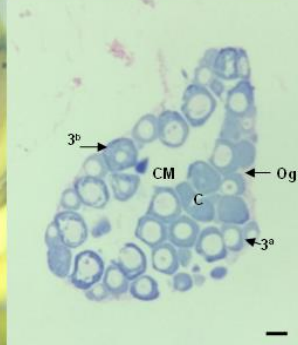
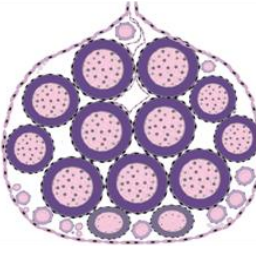
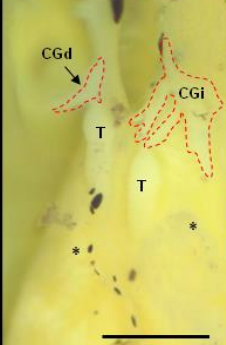
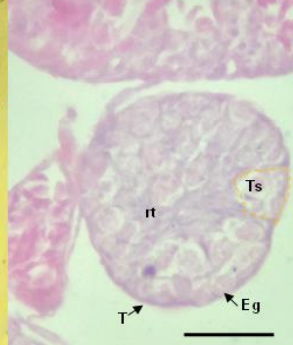
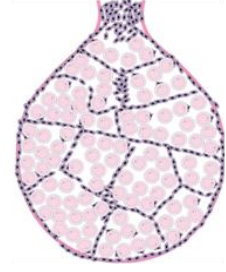
**Referencias de Figura 8, 9 y 10.** CGd: cuerpo graso derecho; CGi: cuerpo graso izquierdo; O: ovario; T: testículo; VC: vena cava; CM: cavidad medular; C: corteza; rt: rete testis; sx: cordón sexual; Ts: túbulo seminífero; Cs: célula somática; Pf: célula prefolicular; F: célula folicular; S: célula de Sertoli; Og: ovogonia; Eg: espermatogonia; 1<sup>a</sup>, 1<sup>b</sup>, 2<sup>a</sup>, 2<sup>b</sup>, 2<sup>c</sup>, 3<sup>a</sup>, 3<sup>b</sup>: estadios de los ovocitos y folículos (ver **Tabla 2**); DPM: días post metamorfosis; \*: riñones mesonéfricos. Línea punteada: **rojo**: delimita los cuerpos grasos; **amarillo**: delimita gónada. Ilustración: Vaca D. Ayelen. Referencias de los esquemas: ir a **Anexo I**.



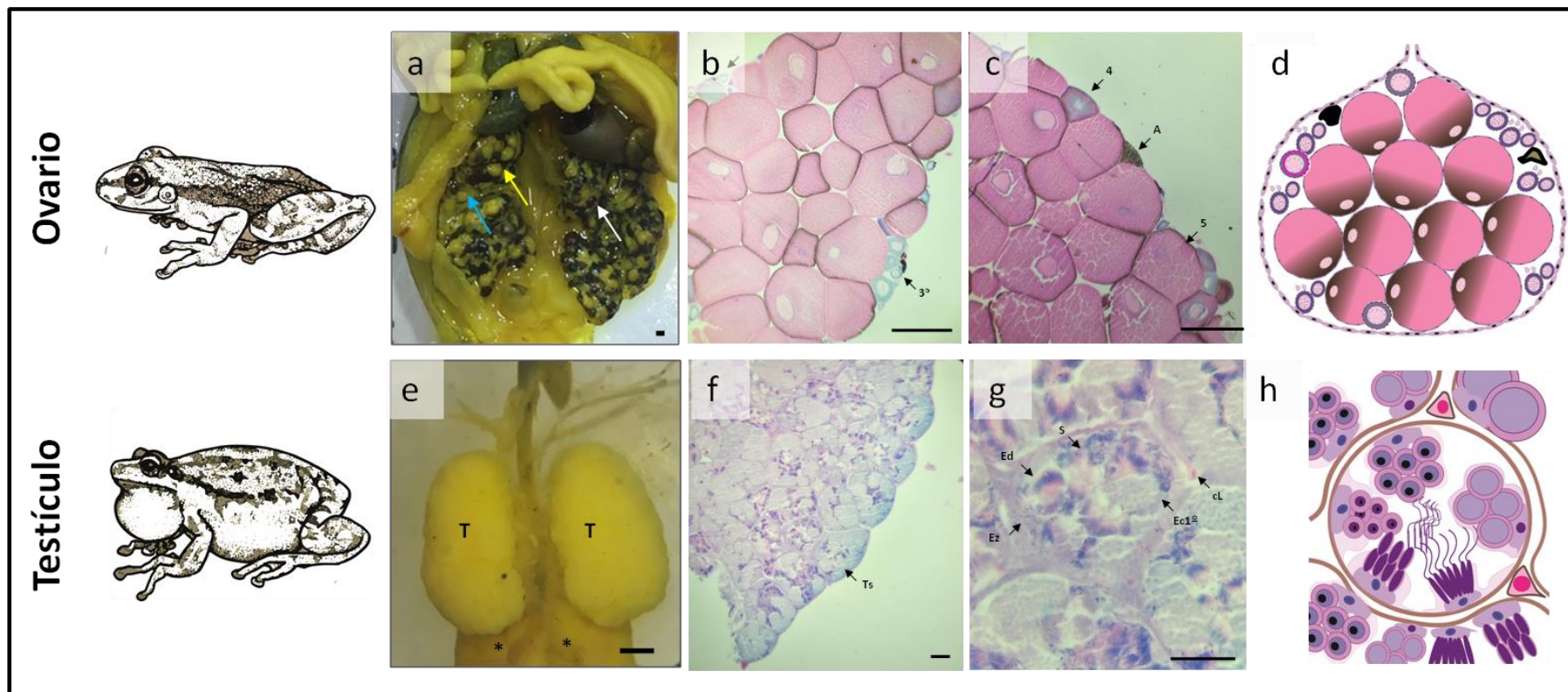
| E. | CLÍMAX METAMÓRFICO   |  |   |  |  |  |
|----|--|--|---|--|--|--|
|    | Desarrollo ovárico   |  |   | Desarrollo testicular  |  |  |
| 42 |   |   |   |   |   |   |
| 45 |   |   |   |   |   |   |
| 46 |  |  |  |  |  |  |

**Figura 9.** Desarrollo y diferenciación gonadal de *Scinax nasicus*, durante el Clímax metamórfico. Para cada estadio, la figura muestra una fotografía de la gónada y cuerpos grasos (escala 0,5mm), la sección histológica del ovario o testículo y una representación esquemática de la sección histológica (escala 0,05mm) Ilustración: Vaca D. Ayelen.



| DPM | Periodo POST METAMÓRFICO   |  |  |  |  |   |
|-----|--|--|--|--|--|---|
|     | Desarrollo ovárico   |  |  | Desarrollo testicular  |  |   |
| 10  |   |   |    |   |   |    |
| 30  |   |   |    |   |   |    |
| 40  |  |  |  |  |  |  |

**Figura 10.** Desarrollo y diferenciación gonadal de *Scinax nasicus*, durante el periodo Post metamórfico. Para cada estadio, la figura muestra una fotografía de la gónada y cuerpos grasos (escala 0,5mm), la sección histológica del ovario o testículo y una representación esquemática de la sección histológica (escala 0,05mm). Ilustración: Vaca D. Ayelen.



**Figura 11. Comparación del estado maduro del ovario y testículo de *Scinax nasicus*, en etapa adulta.** Para cada estadio, la figura muestra una fotografía **a)** del ovario (escala 0,5mm) y **e)** del testículo (escala 0,05mm); **b)** y **f)** una vista general de la sección histológica de la gónada, ovario y testículo, respectivamente; **c)** y **g)** detalle de la sección histológica del ovario (escala 0,5mm) y testículo (escala 0,05mm), respectivamente. **d)** y **h)** representación esquemática de la sección histológica correspondiente. Referencias. **O**: ovario; **T**: testículo; **Ts**: túbulo seminífero; **Cl**: célula de Leydig; **S**: célula de Sertoli; **Ed**: espermátide; **Ec1°**: espermatocono primario; **Ez**: espermatozoides. **A**: folículo atrésico; **3<sup>b</sup>**, **4** y **5**: estadios de los ovocitos y folículos (ver **Tabla 2**). \*: Riñón mesonéfrico; **flecha celeste**: folículo previtelogénico; **flecha amarilla**: folículo vitelogénico; **flecha blanca**: folículo atrésico. Ilustración: Vaca D. Ayelen. Referencias de los esquemas: ir a **Anexo I**.

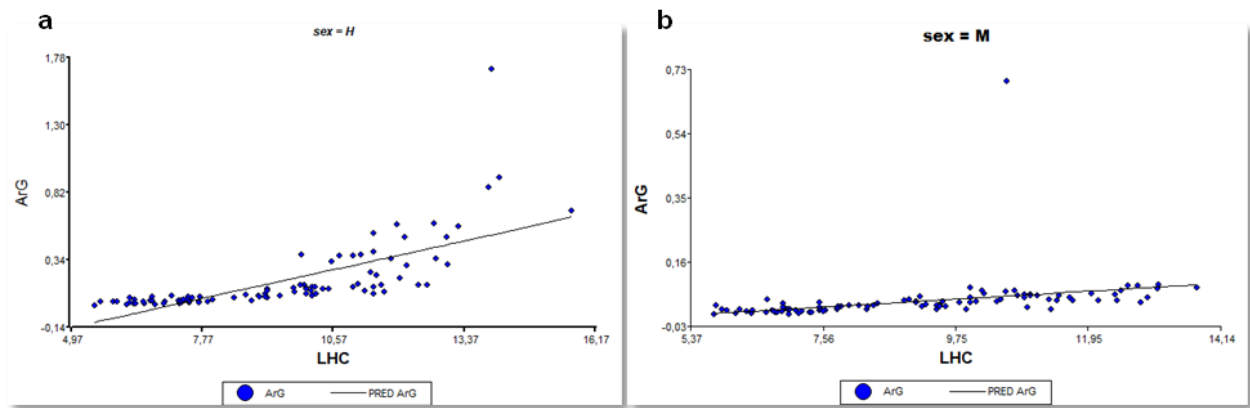




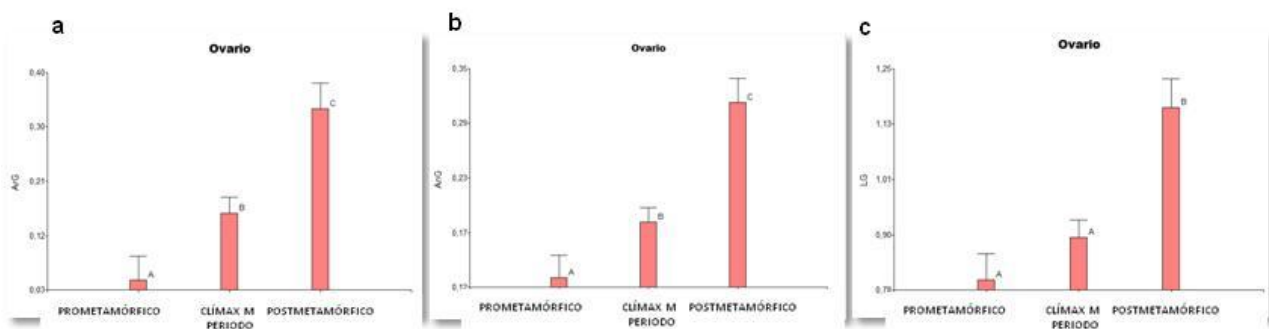
## Análisis estadístico

El análisis de correlación de Spearman, evidenció una correlación positiva (H:  $r=0,9$ ;  $p<0,001$ ; M:  $r=0,81$ ;  $p<0,001$ ) entre el área gonadal y la LHC de larvas y ejemplares juveniles (Gráfico 4). Asimismo, en el ovario, el análisis de ANCOVA, mostró diferencias significativas en el área (ArG) y el ancho (AnG) de la gónada (Gráfico 5 a y b), durante el periodo prometamórfico, clímax metamórfico y post metamórfico (ArG: ANCOVA:  $F_{(3,97)}=58,23$ ;  $R^2=0,65$   $p=0,0001$ ; AnG: ANCOVA:  $F_{(3,97)}=80,90$ ;  $R^2=0,72$   $p=0,0001$ ), mientras que el largo gonadal (LG) (Gráfico 5 c), solo presento, diferencias significativas durante el periodo post metamórfico (ANCOVA:  $F_{(3,97)}=106,57$ ;  $R^2=0,77$   $p=0,0001$ ). Siendo el ArG, 0,12 veces mayor durante el periodo post metamórfico con respecto al clímax metamórfico; el AnG 0,4 veces mayor durante el periodo post metamórfico con respecto al clímax metamórfico; el LG 0,68 veces mayor durante el periodo post metamórfico con respecto al clímax metamórfico. En el testículo, el ANCOVA, evidenció, diferencias significativas del ArG (Gráfico 6 a), solo durante los periodos prometamórfico y post metamórfico (ANCOVA:  $F_{(3,98)}=5,99$ ;  $R^2=0,16$   $p=0,0009$ ), sin embargo no hubo diferencias significativas en el AnG (Gráfico 6 b), durante todo el desarrollo larval y juvenil (ANCOVA:  $F_{(3,98)}=1,96$ ;  $R^2=0,06$   $p=0,1249$ ). Aun así, el ANCOVA, mostró que el LG (Gráfico 6 c), solo tuvo diferencias significativas durante el periodo post metamórfico (ANCOVA:  $F_{(3,98)}=7,31$ ;  $R^2=0,19$   $p=0,0002$ ). Siendo el ArG 0,6 veces mayor durante el periodo post metamórfico con respecto al clímax metamórfico. Siendo el LG 1,41 veces menor durante el periodo post metamórfico con respecto al periodo prometamórfico. Además, entre el desarrollo del ovario y testículo, el ANCOVA, evidenció, diferencias significativas en ArG, AnG y LG, durante el periodo prometamórfico, clímax metamórfico y post metamórfico (ArG: ANCOVA:  $F_{(2,196)}=69,09$ ;  $R^2=0,42$   $p=0,0001$ ; AnG: ANCOVA:  $F_{(2,196)}=87,62$ ;  $R^2=0,47$   $p=0,0001$ ; LG: ANCOVA:  $F_{(2,196)}=122,16$ ;  $R^2=0,56$   $p=0,0001$ ) (Gráfico 7 a, b y c). Siendo el ArG 3,6 veces mayor en hembras; el AnG 2,5 veces mayor en hembras; el LG 1,49 veces mayor en hembras.

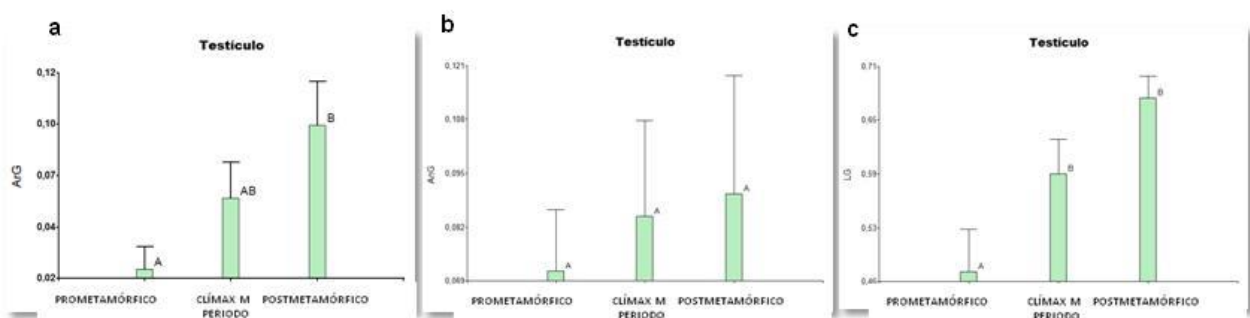
El análisis de correlación de Spearman, evidenció una correlación positiva (CGd:  $r=0,78$ ;  $p<0,001$ ; CGi:  $r=0,49$ ;  $p<0,001$ ) entre el área del cuerpo graso derecho (CGd) e izquierdo (CGi) y la LHC de larvas y ejemplares juveniles (Gráfico 8 a y b). Asimismo, el ANCOVA del área del CGd (Gráfico 9 a), mostro que solo hay diferencias significativas entre el periodo prometamórfico y clímax metamórfico (ANCOVA:  $F_{(3,107)}=14,65$ ;  $R^2=0,30$ ;  $p=0,0001$ ). El ANCOVA del área del CGi (Gráfico 9 b), mostró diferencias significativas, durante el periodo prometamórfico, clímax metamórfico y post metamórfico (ANCOVA:  $F_{(3,192)}=98,88$ ;  $R^2=0,61$ ;  $p=0,0001$ ). Además, el ANCOVA entre machos y hembra, el área del CGd no mostró diferencias significativas (ANCOVA:  $F_{(2,107)}=19,76$ ;  $R^2=0,27$ ;  $p=0,6654$ ) (Gráfico 10 a). Sin embargo, el ANCOVA entre machos y hembra, el área del CGi mostró diferencias significativas, durante el periodo post metamórfico (Gráfico 10 b, c y d) (Periodo prometamórfico: ANCOVA:  $F_{(2,117)}=44,23$ ;  $R^2=0,43$ ;  $p=0,8065$ ; Clímax metamórfico: ANCOVA:  $F_{(2,30)}=0,49$ ;  $R^2=0,03$ ;  $p=0,4212$ ; Periodo post metamórfico: ANCOVA:  $F_{(2,37)}=5,42$ ;  $R^2=0,24$ ;  $p=0,0448$ ).



**Gráfico 4. Relación entre el área gonadal y la longitud hocico-cloaca de *Scinax nasicus*.** Este gráfico muestra la correlación de Spearman entre el área gonadal y la longitud hocico-cloaca la especie en estudio. El valor de  $r$  a) en hembra (0,9) y b) en machos (0,81) indica una correlación positiva significativa. A medida que aumenta la longitud hocico-cloaca, también tiende a aumentar el área gonadal. Esto sugiere una asociación entre el desarrollo gonadal y la morfología en esta especie.

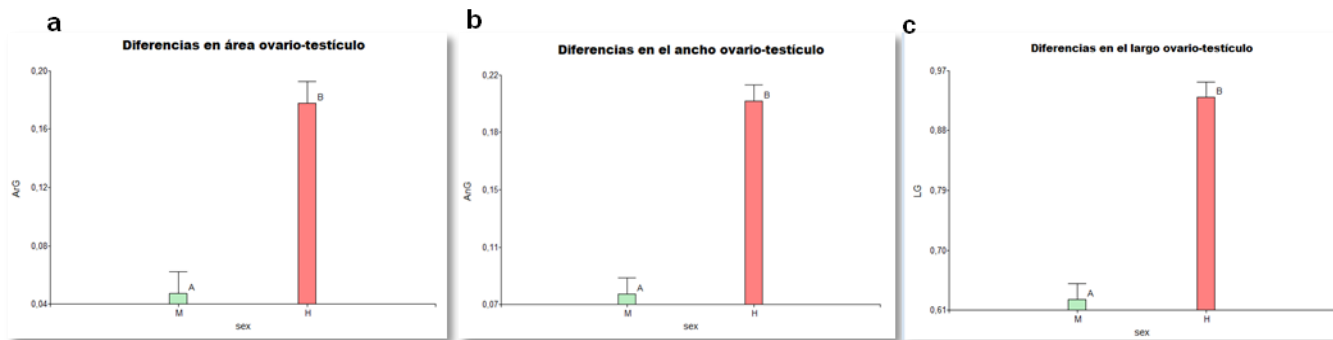


**Gráfico 5. Variaciones en la media del crecimiento del ovario de *Scinax nasicus*,** entre el periodo prometamórfico, clímax metamórfico y periodo post metamórfico del desarrollo. a) Variaciones en la media del área del ovario (ArG), durante los tres periodos analizados; b) Variaciones en la media del ancho del ovario (AnG), durante los tres periodos analizados; c) Variaciones en la media del largo del ovario (LG), durante los tres periodos analizados. Las medias que presentan la misma letra (A, B, C) en cada subconjunto no representan diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ).

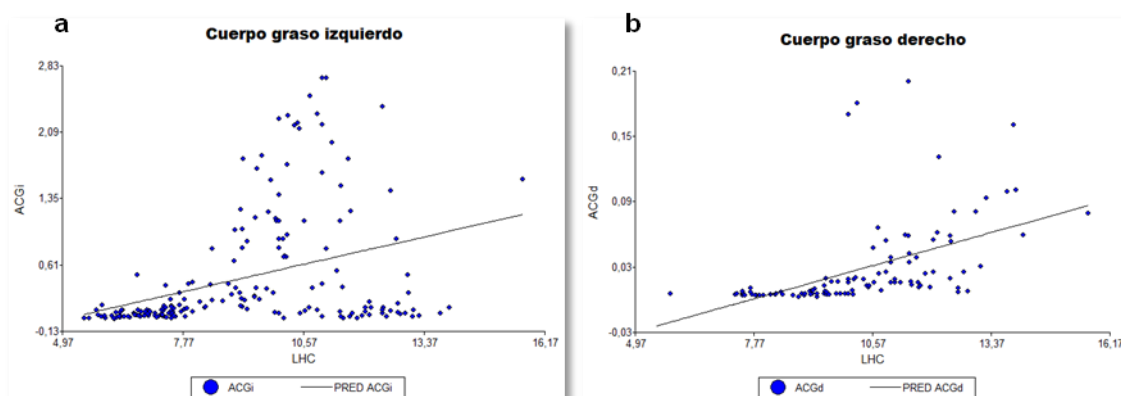


**Gráfico 6. Variaciones en la media del crecimiento del testículo de *Scinax nasicus*,** entre el periodo prometamórfico, clímax metamórfico y periodo post metamórfico del desarrollo. a) Variaciones en la media del área del testículo (ArG), durante los tres periodos analizados; b) Variaciones en la media del ancho del testículo (AnG), durante los tres periodos analizados; c) Variaciones en la media del largo del testículo (LG), durante los tres periodos analizados. Las medias que presentan la misma letra (A, B, C) en cada subconjunto no representan diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ).

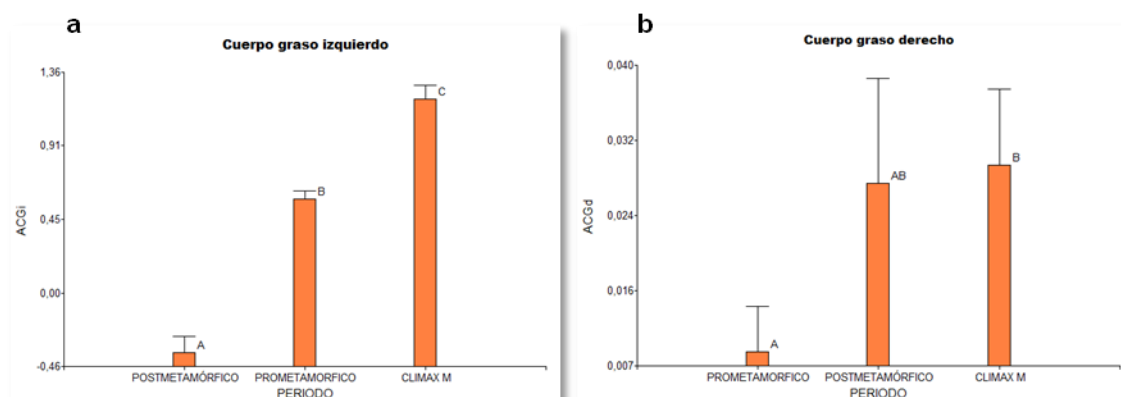




**Gráfico 7. Comparación del tamaño de ovarios y testículos, durante el desarrollo de *Scinax nasicus*.** a) Comparación del área (ArG) de ovarios y testículos; b) Comparación del ancho (AnG) de ovarios y testículos; c) Comparación del largo (LG) de ovarios y testículos. Las medias que presentan la misma letra (A, B, C) en cada subconjunto no representan diferencias significativas entre ellas ( $p > 0.05$ ).



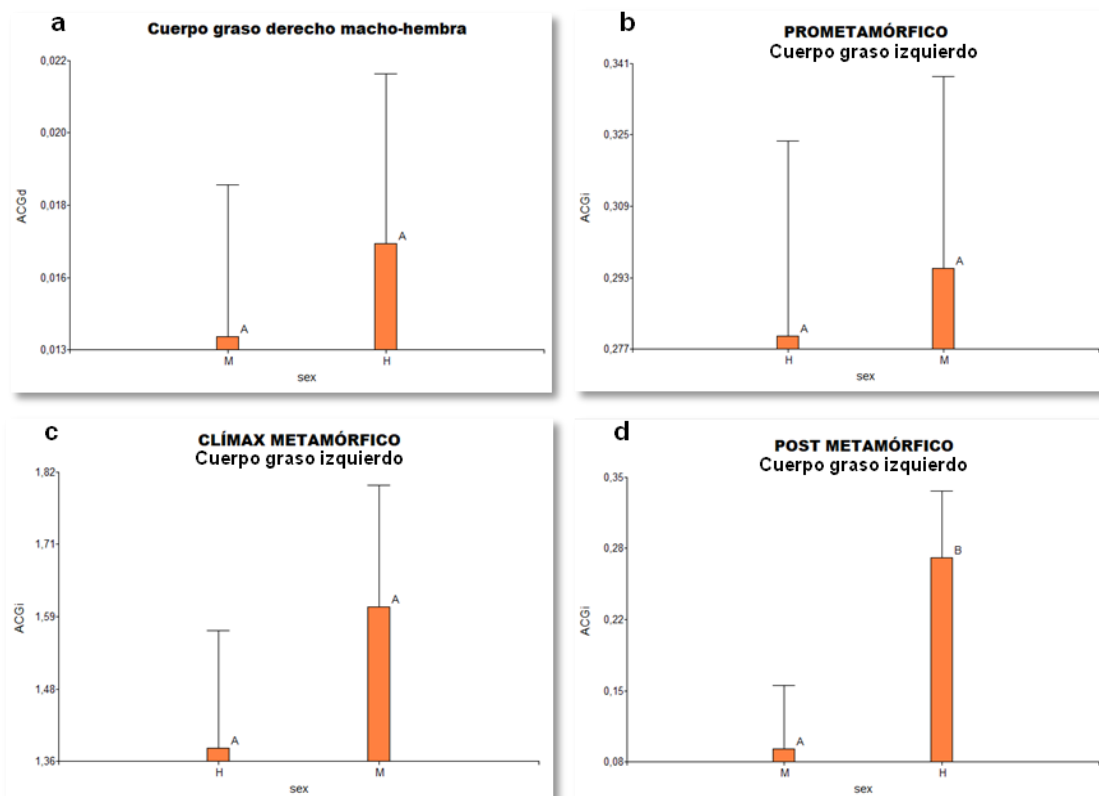
**Gráfico 8. Relación entre el área del cuerpo graso y la longitud hocico-cloaca de *Scinax nasicus*.** Este gráfico muestra la correlación de Spearman entre el área del cuerpo graso izquierdo (ACGi) y derecho (ACGd) y la longitud hocico-cloaca la especie en estudio. El valor de  $r$  a) ACGi (0,49) y b) ACGd (0,78) indica una correlación positiva significativa. A medida que aumenta la longitud hocico-cloaca, también tiende a aumentar el área de los cuerpos grasos. Esto sugiere una asociación entre el desarrollo gonadal y la morfología en esta especie.



**Gráfico 9. Variaciones en la media del crecimiento del cuerpo graso de *Scinax nasicus*, entre el periodo prometamórfico, clímax metamórfico y periodo post metamórfico del desarrollo.** a) Variaciones en la media del área del cuerpo graso izquierdo (ACGi), durante los tres periodos analizados; b) Variaciones en la media



del área del cuerpo graso derecho (ACGd), durante los tres periodos analizados. Las medias que presentan la misma letra (A, B, C) en cada subconjunto no representan diferencias significativas entre ellas ( $p>0.05$ ).



**Gráfico 10. Comparación del área del cuerpo graso entre machos y hembras, durante el desarrollo de *Scinax nasicus*.** **a)** Comparación del área del cuerpo graso derecho (ACGd) entre machos y hembra, durante todo el desarrollo larval y post metamórfico; **b)** Comparación del área del cuerpo graso izquierdo (ACGi) entre machos y hembra, durante el periodo prometamórfico; **c)** Comparación del área del cuerpo graso izquierdo (ACGi) entre machos y hembra, durante el clímax metamórfico; **d)** Comparación del área del cuerpo graso izquierdo (ACGi) entre machos y hembra, durante el periodo post metamórfico. Las medias que presentan la misma letra (A, B, C) en cada subconjunto no representan diferencias significativas entre ellas ( $p>0.05$ ).



## DISCUSIÓN

En este trabajo se logró secuenciar los eventos de la morfogénesis gonadal, identificando aquellos correspondientes a la diferenciación de ovarios y testículos y de los cuerpos grasos durante el periodo larval, juvenil y adultos de *Scinax nasicus*, una especie común en ambientes de nuestra región. A partir de los datos obtenidos, se logró determinar el tipo de desarrollo gonadal y la tasa de desarrollo ovárica y testicular, reconociendo además variaciones en el tiempo de diferenciación las gónadas y los cuerpos grasos entre machos y hembra.

### Morfogénesis gonadal

La morfogénesis gonadal en los anuros involucra dos etapas, una etapa de indiferenciación y una etapa de diferenciación en ovarios o testículos, dependiendo del sexo del individuo (Witschi 1929). En este modelo se reconocen dos tipos de diferenciación. El tipo diferenciado se caracteriza porque la gónada, inicialmente indiferenciada, se diferencia directamente como ovario o testículo (Mali & Gramapurohit 2015), como en el caso de *Dendropsophus labialis* (Pinto-Erazo et al. 2016), *Bombina orientalis* (Lopez 1989), *Lithobates catesbeianus* (Hsü & Liang 1970), *Microhyla ornata* (Mali & Gramapurohit 2015), *Pelophylax nigromaculatus* (Tanimura & Iwasawa 1988), *Boana riojana* (Goldberg et al. 2019) y *Xenopus laevis* (Pipreck et al. 2017), este tipo fue registrado en *Scinax nasicus*. El tipo indiferenciado, se caracteriza por que la gónada indiferenciada se organiza inicialmente, como ovario en todos los individuos y luego, en los individuos genéticamente machos, los folículos ováricos degeneran y se desarrollan los túbulos seminíferos y diferencian las espermatogonias a partir de células germinales remanentes en la corteza de la gónada (Flament et al. 2011). Esto ha sido reconocido para *Lithobates catesbeianus* (Hsü & Liang 1970), *Scinax fuscovarius* (Goldberg 2015), *Rana curtipes* (Gramapurohit et al. 2000) y *Euphlyctis cyanophlyctis* (Phuge & Gramapurohit 2013). En *Euphlyctis cyanophlyctis*, se ha registrado en algunos individuos con gónadas intersexo en las cuales se observan túbulos seminíferos y folículos ováricos, que se interpretan como una fase de transición de la diferenciación testicular (Phuge & Gramapurohit 2013).

### Etapas indiferenciada

El desarrollo gonadal, se inicia con la formación de una cresta genital de células somáticas que es invadida por células germinales primordiales (CGP) que migran desde un origen extragonadal, que dan origen a una gónada indiferenciada (Tanimura & Iwasawa 1988, Viertel & Richter 1999). Durante esta etapa de indiferenciación, la gónada es una estructura metamérica, donde se reconocen una región anterior o pars progonalis, una porción media o pars gonalis, y una región posterior o pars epigonalis (Haczkiwicz & Ogielska 2013). A nivel histológico, está conformada por CGP y somáticas asociadas (Viertel & Richter 1999; Ogielska & Kotusz 2004). Las CGP, se caracterizan por poseer plaquetas vitelinas en su citoplasma, que sufren vitelolisis a lo largo del proceso de migración y colonización de la cresta genital, posteriormente inician un proceso de proliferación (Ogielska & Kotusz 2004). Estos eventos fueron registrados en *Scinax nasicus* en los primeros estadios del periodo prometamórfico, donde se reconocieron CGP con y sin plaquetas de vitelo, poniendo de manifiesto que la vitelolisis se completa durante la etapa de colonización. Esto se corresponde con los estadios II y III del desarrollo gonadal propuestos por Ogielska & Kotusz (2004).



Witschi (1929) describe que en la gónada indiferenciada, se reconocen a nivel histológico dos regiones: una corteza, conformada por células germinales, rodeadas de células somáticas, y una médula maciza conformada solo por células somáticas. Esta estructura ha sido observada en *Rana nigromaculata* (Tanimura & Iwasawa 1988). En *Hoplobatrachus rugulosus*, la etapa de indiferenciación es prolongada, donde inicialmente la gónada presenta células germinales rodeadas por células somáticas y posteriormente se organizan en una región cortical y medular (Traijit et al. 2020). En *Dendropsophus labialis* (Pinto-Erazo et al. 2017) y en *Scinax nasicus*, la gónada indiferenciada está conformada por células germinales y somáticas sin una organización definida.

### **Etapas de diferenciación**

La diferenciación gonadal, implica una serie de cambios morfológicos e histológicos, diferenciales entre machos y hembras (Flament 2011).

La diferenciación ovárica, a nivel morfológico, se caracteriza por el desarrollo de lóbulos o sacos ováricos, conservando el ovario su metamería original (Ogielska & Kotusz 2004). El desarrollo de los lóbulos ováricos en *Scinax nasicus*, se evidenció a partir del E. 27, registrándose un aumento progresivo en tamaño, hasta el final de la metamorfosis, y un aumento de tamaño exponencial en el periodo post metamórfico. Estas variaciones en el tamaño de los ovarios se relacionan con el crecimiento folicular registrado durante estos periodos, como se describe en secciones posteriores. Comparando el área inicial de la gónada con el área alcanzada en la etapa adulta, el ovario aumentó 4.653 veces su tamaño.

En el macho se pierde la metamería y ocurre un proceso de reducción de la pars epigonalis de la gónada (Haczekiewicz & Ogielska 2013). Esto se registró en *Rana temporaria*, *Hyla arborea* y *Pelophylax lessonae* (Haczekiewicz & Ogielska 2013). Contrariamente en *Scinax nasicus*, se verificó un leve aumento en la longitud del testículo, aunque el área testicular no fue significativamente diferente durante el periodo larval y juvenil. Sin embargo en el estado adulto, se registró un aumento en el área testicular de 68,4 veces, con respecto a los juveniles.

### **Diferenciación ovárica**

A nivel histológico, según Ogielska & Kotusz (2004) la diferenciación ovárica comprende, secuencialmente: la proliferación de las células germinales, la diferenciación de ovogonias, proliferación de ovogonias y formación de nidos germinales, la formación de la cavidad medular, el inicio de meiosis y arresto en diplotene, la foliculogénesis, el crecimiento primario de ovocitos (previtelogénesis), crecimiento secundario de ovocitos (vitelogénesis) y reducción de la proliferación en los nidos germinales. Esta secuencia se ha registrado durante la diferenciación ovárica de *Scinax fuscovarius* (Goldberg 2015) y *Boana riojana* (Goldberg et al. 2019). Sin embargo, se han reportado variaciones en esta secuencia de eventos del desarrollo ovárico, en algunas especies, como *Rana nigromaculata* (Tanimura & Iwasawa 1988), *Hoplobatrachus rugulosus* (Traijit et al. 2020) y *Euphlyctis cyanophlyctis* (Phuge & Gramapurohit 2013), donde el inicio de la meiosis precede a la formación de la cavidad medular. Esto mismo, ha sido observado en *Scinax nasicus*, especie objeto de estudio de este trabajo.





Diversos autores, reconocieron estadios de la ovogénesis en anfibios, considerando el tamaño del ovocito, las características del citoplasma, la localización del núcleo, la cantidad y posición de los nucléolos, las características de los cromosomas, presencia, cantidad y distribución de plaquetas vitelinas, incluyendo además el desarrollo y características de la capa folicular. Para *Xenopus laevis* (Anura), Dumont (1972), establece seis estadios del folículo, hasta la etapa post vitelogénica, para *Chthonerpeton indistinctum* (Gymnophiona), Berois & de Sa (1988), describen cuatro estadios del desarrollo del folículo; para *Salamandra salamandra* (Urodelo), Sharon et al. (1997), establecen cinco estadios de la ovogénesis y para *Hyla eximia*, *Osteopilus septentrionalis* (Anura) y *Ambystoma dumerilii* y *Ambystoma* (Urodelo), Aranzábal (2011), establece siete estadios de la ovogénesis.

A partir de las observaciones realizadas, se propone para *Scinax nasicus*, una tabla de estadios de la ovogénesis y foliculogénesis (Tabla 2), basada y modificada de la propuesta por Aranzábal (2011). Esta tabla documenta diferencias estructurales en las características del ovocito y folículo y propone una serie de cambios más graduales en los procesos de ovogénesis y foliculogénesis, estableciendo sub estadios en algunos estadios propuestos por dicho autor.

Con respecto al tiempo en que ocurren los eventos del desarrollo ovárico, la tasa de desarrollo del ovario puede ser: básica, acelerada o retardada (Ogielska & Kotusz 2004). En las especies que tienen tasa básica de desarrollo, la diferenciación del ovario se inicia durante el periodo prometamórfico (estadios 31 - 41 de Gosner), como es el caso de *Phyllomedusa sauvagii* y *Phyllomedusa azurea* (Fabrezi et al. 2010). Los bufonidos, se reconoce una tasa de desarrollo retardada, donde el desarrollo ovárico se inicia luego de la metamorfosis; a los 50 días post metamórfico en *Rhinella arenarum* (Piazza et al. 2022) este tipo también se registró para *Scinax acuminatus*, aunque no se especifica a cuantos días post metamorfosis se desarrolla el ovario (Fabrezi et al. 2010). La tasa de desarrollo acelerada, donde el inicio de la diferenciación ovárica ocurre en los estadios tempranos del periodo prometamórfico, alrededor del E. 26, se ha registrado para *Scinax fuscovarius* (Goldberg 2015), *Clinotarsus curtipes* (Gramapurohit et al. 2000), *Euphyctis cyanophlyctis* (Traijit et al. 2020) y *Pseudis platensis* (Fabrezi et al. 2010) y para *Scinax nasicus*, analizada en este trabajo.

Phuge & Gramapurohit (2013), relacionan la tasa de desarrollo ovárica con la edad a la cual los individuos alcanzan la madurez sexual e inician el ciclo ovárico. Según estos autores, las especies con tasa de desarrollo acelerado alcanzan la madurez sexual antes que las especies con tasa de desarrollo básica o retardada. Como es el caso de *Pseudis paradoxa*, que tienen una tasa de desarrollo acelerada y alcanzan la madurez sexual al poco tiempo de culminar la metamorfosis (Fabrezi et al. 2010). En cambio, en *Rhinella arenarum*, presentan una tasa de desarrollo retardada y alcanzan la madurez sexual, recién a los 3 años (Piazza et al. 2023).

En este trabajo se registró que en *Scinax nasicus*, el desarrollo y crecimiento folicular se inicia en la etapa larval y se continúa sin interrupción durante el periodo post metamórfico, al menos hasta los 40 días post metamorfosis, donde, los ovarios presentan folículos en etapas avanzadas de la previtelogénesis. En los ejemplares adultos se reconocieron folículos en etapas avanzadas de la vitelogénesis, sin embargo no se pudo determinar la edad a la que los individuos alcanzan la madurez



sexual, por lo que no se cuenta con información suficiente para establecer comparaciones con otras especies.

### **Diferenciación testicular**

A nivel histológico, la diferenciación testicular en los anuros comprende: la organización de los túbulos seminíferos, a partir de cordones sexuales de células somáticas, la organización de los cistos, por asociación de las espermatogonias con células de Sertoli, la proliferación de espermatogonias y la formación de la rete testis en la región medular del testículo (Tanimura & Iwasawa 1988 Haczekwicz & Ogielska 2013, Goldberg et al. 2019). Estos eventos pueden ocurrir durante el periodo larval, previo al clímax metamórfico como en *Pseudis platensis* (Fabrezi et al. 2010), durante la metamorfosis como en *Scinax fuscovarius* (Goldberg 2015) o después de la metamorfosis como en *Rhinella arenarum* (Piazza et al. 2020). En *Scinax nasicus*, la diferenciación testicular se inició a partir del E. 35, registrándose túbulos seminíferos bien definidos con cistos de espermatogonias al final de la metamorfosis, característica que se mantuvo hasta los 40 días post metamorfosis. Solo se observaron cistos con células espermátogénicas en los individuos adultos, sin embargo se tiene registro de la edad, en días post metamorfosis, de dichos ejemplares.

Con respecto a la tasa de desarrollo testicular, se ha descrito para *Pseudis platensis* una tasa de desarrollo acelerado, que se caracteriza porque al final de la metamorfosis, los testículos presentan cistos de espermatocitos primarios y secundarios y cistos de espermátides en estadios tempranos de la espermiogénesis. En *Phyllomedusa sauvagii* y *Scinax acuminatus*, se ha descrito una tasa de desarrollo testicular retardada, debido a que el testículo se diferencia, luego de la metamorfosis (Fabrezi et al. 2010). Sin embargo, no se han descrito la tasa de desarrollo básica testicular. Para *Scinax nasicus* se establece una tasa de desarrollo básica, debido a que la formación de túbulos seminíferos, se forman antes del clímax metamórfico, pero el inicio de la meiosis, ocurre posterior a la metamorfosis.

### **Cuerpos grasos**

Los cuerpos grasos son órgano de almacenamiento importante para los anfibios (Schlaghecke & Blum 1978). Si bien esta estructura es poco estudiada, estudios han demostrado la importancia del cuerpo graso en el mantenimiento de la gónada femenina y masculina durante el ciclo reproductivo de los anuros (Schlaghecke & Blum 1978; Chieffi et al. 1975).

Si bien los cuerpos grasos, son estructuras muy importantes en la fisiología reproductiva de los anfibios, existe escasa información sobre la ontogenia de su desarrollo. Wright et al. (2011), describe las variaciones que ocurren en el cuerpo graso, durante la metamorfosis de *Lithobates catesbeianus*. En este estudio se observa un aumento exponencial de los cuerpos grasos al inicio de la metamorfosis y una disminución abrupta al finalizar. Esto se explica mediante el consumo de las reservas almacenadas en los cuerpos grasos. Además de esto, se han reportado asimetrías de izquierda a derecha en el inicio de la formación de los cuerpos grasos, como es el caso de *Physalaemus santafesinus* (Gómez et al. 2019). Esto es similar a lo observado en *Scinax nasicus*, donde el desarrollo de los cuerpos grasos, mostró una asimetría izquierda-derecha. En el E. 26, el cuerpo graso izquierdo se observó como una estructura conspicua con proyecciones digitiformes bien definidas, que crecieron progresivamente en los



estadios subsiguientes, particularmente, durante el clímax metamórfico. El cuerpo graso derecho recién fue visible a partir del E. 35, verificándose un escaso crecimiento en los estadios subsiguientes. Esto pone de manifiesto un desarrollo heterocrónico entre el cuerpo graso izquierdo y derecho que explica las diferencias en tamaño registradas, entre ambos, durante el periodo prometamórfico y metamórfico. Por otra parte, si bien el tamaño del cuerpo graso derecho no varió significativamente en el periodo post metamórfico con respecto a los periodos previos, el cuerpo graso izquierdo, mostró una significativa disminución en tamaño. Esto podría relacionarse con la fisiología de los cuerpos grasos durante el juvenil los cuales están implicados en un constante consumo al finalizar la metamorfosis (Wright et al. 2011). Sin embargo no poseemos datos que permitan explicar esta información.

En resumen, este estudio proporciona una visión detallada de la morfogénesis gonadal en *Scinax nasicus*, abarcando sus periodos larval, juvenil y adulto. A través de la secuenciación de eventos clave en la diferenciación de ovarios y testículos, así como de la exploración de la ontogenia de los cuerpos grasos, se ha logrado identificar variaciones en la tasa de desarrollo gonadal entre machos y hembras. Se registraron, tanto para machos como para hembras, asimetría y heterocronía en el desarrollo de los cuerpos grasos izquierdo y derecho. Esta información, contribuye a ampliar los conocimientos de los patrones de desarrollo gonadal en anuros y aporta información de base para otros estudios que aborden aspectos y características de la reproducción en esta especie, como por ejemplo la edad de madurez sexual y la dinámica de los cuerpos grasos, durante el periodo reproductivo. Asimismo, pone de manifiesto la relevancia de profundizar estos estudios en otras especies de la región con distintos patrones morfogenéticos.

### CONSIDERACIONES FINALES

- ✓ *Scinax nasicus* presenta un desarrollo gonadal de tipo diferenciado con diferencias en la tasa de desarrollo gonadal, entre machos y hembras.
- ✓ Las hembras presentan una tasa de desarrollo ovárica acelerada y presentan folículos en distintos estadios de la previtelogénesis al final de la metamorfosis.
- ✓ Los machos presentan una tasa de desarrollo testicular básica y presentan túbulos seminíferos con cistos de espermatogonias al final de la metamorfosis.
- ✓ Los cuerpos grasos presentan un desarrollo heterocrónico, con asimetría izquierda-derecha.
- ✓ En el periodo juvenil el ovario, mantiene su dinámica de crecimiento folicular, mientras que en el testículo se registra escasa actividad espermatogénica.
- ✓ En las hembras adultas, se registra actividad vitelogénica, mientras que en los machos adultos, actividad espermatogénica avanzada, características que se corresponden con la actividad reproductiva de los ejemplares, propia de la época en la cual fueron colectados.



## BIBLIOGRAFÍA

- Altig, R. 1970. A key to the tadpoles of the continental United States and Canada. *Herpetologica*, 180-207.
- Anjubault, E., & J.M. Exbrayat. 2004. Contribution à la connaissance de l'appareil génital de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Gymnophione. Gonadogenèse. *Publications de la Société Linnéenne de Lyon*, 73(10): 379-392.
- Aranzábal, M.C.U. 2011. Hormones and the female reproductive system of amphibians. In *Hormones and reproduction of vertebrates*. Academic Press. pp. 55-81.
- Arias-Alvarez, M., R. M. García-García, P. G., P. L. Rebollar, & Lorenzo,. (2007). Follicular development in rabbit. *ITEA*, 103(4): 173-185.
- Axel Kwet, Lucy Aquino, Steffen Reichle, Débora Silvano, Esteban Lavilla, Ismael di Tada, Jose Langone. 2004. *Scinax nasicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55980A11390205. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55980A11390205.en>. Accessed on 07 December 2023.
- Berois, N., & R. de Sá. 1988. Histology of the ovaries and fat bodies of *Chthonerpeton indistinctum*. *Journal of herpetology*, 146-151.
- Blaustein, A.R. & J.M. Kiesecker. 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. *Ecology Letters*, 5: 597-608.
- Blaustein, A.R., J.M. Romansic, J.M. Kiesecker & A.C. Hatch. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9: 123-140.
- Britt, K.L., J. Kerr, L. O'Donnell, M.E.E. Jones, A.E. Drummond, S.R. Davis, E.R. Simpson & J.K. Findlay. 2002. Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. *The FASEB Journal*, 16: 1389-1397.
- Britt, K.L., P.K. Saunders, S.J. McPherson, M.L. Misso, E.R. Simpson & J.K. Findlay. 2004. Estrogen Action on Follicle Formation and Early Follicle Development. *Biology of Reproduction*, 71: 1712-1723.
- Burkhart, M.N., J.L. Juengel, P.R. Smith, D.A. Heath, G.A. Perry, M.F. Smith & H.A. Garverick. 2010. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. *Animal Reproduction Science*, 117: 43-54.
- Carranza, J. A. S. (2021). Los disruptores endocrinos: un problema creciente pero desconocido para la mayoría de los sanitarios. *FMC-Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 28(3), 143-150.
- Chieffi, G., R.K. Rastogi, L. Iela, & M. Milone. 1975. The function of fat bodies in relation to the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in the frog, *Rana esculenta*. *Cell and Tissue Research*, 161(2): 157-165.
- Curi, L. M., Peltzer, P. M., Attademo, M. A., & Lajmanovich, R. C. (2021). Alterations in gonads and liver tissue in two neotropical anuran species commonly occurring in rice fields crops. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(5), 203.
- De Falco, T. & B. Capel. 2009. Gonad morphogenesis in vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25: 457-482.





- Devlin, R. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of morphology*, 136(2): 153-179.
- Fabrezi, M., S.I. Quinzio & J. Goldberg. 2010. The ontogeny of *Pseudis platensis* (Anura, Hylidae): Heterochrony and the effects of larval development on postmetamorphic life. *Journal of Morphology*, 271: 496-510.
- Flament, S., D. Chardard, A. Chesnel & H. Dumond. 2011. Sex determination and sexual differentiation in amphibians. En: Norris, D. O. and K. H. Lopez. Hormones and reproduction of vertebrates, Vol 2: Amphibians. Academic Press ELSEVIER. *United States of America*, 1-19.
- Flament, S. (2016). Sex reversal in amphibians. *Sexual Development*, 10(5-6), 267-278.
- Gillesby, B.E. & T.R. Zacharewski. 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 3-14.
- Goldberg J. 2015. Gonadal differentiation and development in the snouted tree frog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology*, 49 (3): 468-478.
- Goldberg, J., S.I. Quinzio, J.C. Cruz, & M. Fabrezi. 2019. Intraspecific developmental variation in the life cycle of the Andean Treefrog (*Boana riojana*): A temporal analysis. *Journal of Morphology*, 280(4), 480-493.
- Gómez, M. L. 2019. Morfogénesis gonadal de *Physalaemus santafecinus* y sus alteraciones por acción de disruptores estrogénicos.
- Gómez, V. 2023. Demographic features of two cohorts of tadpoles of the Lesser Snouted Tree frog (*Scinax nasicus*) (Anura: Hylidae) from ponds in northern Argentina. *Herpetology Notes*, 16, 75-81.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183- 190.
- Gramapurohit, N.P., B.A. Shanbhag & S.K. Saidapur. 2000. Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipis*. *General and Comparative Endocrinology*, 119: 256-264.
- Guigon, C.J., N. Coudouel, S. Mazaud-Guittot, M.G. Forest & S. Magre. 2005. Follicular cells acquire Sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology*, 146 (7): 2992-3004.
- Haczkiwicz, K., & M. Ogielska. 2013. Gonadal sex differentiation in frogs: how testes become shorter than ovaries. *Zoological science*, 30(2): 125-134.
- Hayes, T., A. Collins, M. Lee, M. Mendoza, N. Noriega, A. Stuart & A. Vonk. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 5476-5480.
- Hsu, C. & H. Lyang. 1970. Sex Races of *Rana catesbeianae* in Taiwan. *Herpetologica*, 26: 214-221.
- Humphrey, R.R. 1925. The primordial germ cells of *Hemidactylium* and other Amphibia. *Journal of Morphology*, 41(1): 1-43.
- Jobling, S. & J.P. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic in fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27: 361-372.



- Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen & J. Sumpter.1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 194-202.
- Juengel, J.L., D.A. Heath, L.D. Quirke & K.P. Mc Natty.2006. Oestrogen receptor a and b, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reproduction*, 131: 81–92.
- Kloas, W., I. Lutz & R. Einspanier.1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *Science of the Total Environment*,225: 59-68.
- Kolpin, D.W., E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber & H.T. Buxton. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36: 1202-1211.
- Lajmanovich, R.C., M.T. Sandoval & P.M. Peltzer.2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*,70: 612–618.
- Laufer, G., N.Gobel, N.Kacevas, N. Lado, S.Cortizas, M.Carabio, &F. Kolenc. 2021. Updating the distributions of four Uruguayan hylids (Anura: Hylidae): recent expansions or lack of sampling efforts. *Amphibian and Reptile Conservation*, 15: 228-237.
- Leary S, W. Underwood, R. Anthony, S. Cartner, D. Corey, T. Grandin, C. Greenacre, S. Gwaltney-Brant, M.A. McCrackin, R. Meyer, D.M. Shearer, R. Yanong. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals 2013 edition. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- Lopez, K. 1989. Sex differentiation and early gonadal development in *Bombina orientalis* (Anura: Discoglossidae). *Journal of Morphology*, 199 (3): 299-311.
- Lutz, I. & W. Kloas. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Science of the Total Environment*, 225: 49-57.
- Mackenzie, C.M., M. Berrill, C. Metcalfe & B.D. Pauli. 2003. Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (10): 2466-2475.
- Mali, P.V. & N. P. Gramapurohit. 2015. Pattern of gonadal differentiation and development up to sexual maturity in the frogs, *Microhyla ornata* and *Hylarana malabarica*: a comparative study. *Journal of Experimental Zoology*, 323(A): 666-678.
- Martyniuk, C. J., Feswick, A., Munkittrick, K. R., Dreier, D. A., & Denslow, N. D. (2020). Twenty years of transcriptomics, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, and fish. *General and comparative endocrinology*, 286, 113325.
- Méndez-Tepepa, M., Morales-Cruz, C., García-Nieto, E., & Anaya-Hernández, A. (2023). A review of the reproductive system in anuran amphibians. *Zoological Letters*, 9(1), 3.
- Mendoza-Cruz, E., N. Moreno-Mendoza, L. Zambrano & M. Villagrán-SantaCruz. 2017. Development and gonadal sex differentiation in the neotenic urodele: *Ambystoma mexicanum*. *Zoomorphology*, 136: 497-509.
- Montero, R., A.G. Autino. 2018. Sistemática y filogenia de los vertebrados, con énfasis en la fauna argentina. Tercera edición. Editorial independiente, San Miguel de Tucumán, Argentina. 627 pp. I



- Nakamura, M. (2010). The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor?. *Journal of experimental zoology part A: Ecological genetics and physiology*, 313(7), 381-398.
- Nagahama, Y., Chakraborty, T., Paul-Prasanth, B., Ohta, K., & Nakamura, M. (2021). Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological reviews*.
- Nicol, B., Estermann, M. A., Yao, H. H., & Mellouk, N. (2022). Becoming female: ovarian differentiation from an evolutionary perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 944776.
- Ogielska, M. & A. Kotusz. 2004. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of Morphology*, 259 (1): 41-54.
- Ogielska, M. & E. Wagner. 1990. Oogenesis and ovary development in European green frog, *Ranaridibunda* (Pallas). I. Tadpole stages until metamorphosis. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 120(3): 211-221.
- Ogielska, M. 2009. Reproduction of amphibians (Vol. 4). CRC Press.
- Ottinger, M.A., S. Pitts & M.A. Abdelnabi. 2001. Steroid hormones during embryonic development in Japanese quail: plasma, gonadal, and adrenal levels. *Poultry Science*, 80: 795-799.
- Pepe, G.J., R.B. Billar, M.G. Leavitt, N.C. Zachos, J.A. Gustafsson & E.D. Albrecht. 2002. Expression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in the baboon fetal ovary. *Biology of Reproduction*, 66: 1054-1060.
- Phuge, S.K., & N.P. Gramapurohit. 2013. Gonadal sex differentiation, development up to sexual maturity and steroidogenesis in the skipper frog, *Euphlyctiscyanophlyctis*. *General and Comparative Endocrinology*, 181: 65-71.
- Piazza, Y.G., S.C. Czuchlej, M.L. Gómez, & F.J. Meijide. 2023. Gonadal morphogenesis in the South American toad *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) unveils an extremely delayed rate of sex differentiation. *Journal of Morphology*, 284(8): e21611.
- Pinto-Erazo, M. A., J. Goldberg, & A. Jerez. 2016. Gonadal development in the Neotropical high Andean frog *Dendropsophus labialis* (Amphibia: Hylidae). *Cuadernos de herpetología*, 30(2): 57-68.
- Piprek, R.P., M. Kloc, J.P. Tassan & J.Z. Kubiak. 2017. Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. *Developmental Biology*, 432 (2): 298-310.
- Rabb, G.B. 1990. Declining amphibian populations. *Species* 13: 33-34.
- Rezende, W. R., de Souza Santos, L. R., Franco-Belussi, L., & De Oliveira, C. (2021). Testicular morphometric changes in neotropical anurans from agroecosystems. *Environmental Pollution*, 271, 116265.
- Sammouri, R., S. Renous, J. M. Exbrayat, & J. Lescure. 1990. Développement embryonnaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Amphibia, Gymnophiona). In *Annales des sciences naturelles. Zoologie et biologie animale*, 11(3): 135-163.
- Saunders, P.T.K., M.R. Millar, K. Williams, S. Macpherson, D. Harkiss, R.A. Anderson; B. Orr, N.P. Groome, G. Scobie & H.M. Fraser. 2000. Differential Expression of Estrogen Receptor- $\alpha$  and  $\beta$  and Androgen Receptor in the Ovaries of Marmosets and Humans. *Biology of Reproduction*, 63: 1098-1105.
- Schlaghecke, R., & V. Blüm. 1978. Seasonal variations in fat body metabolism of the green frog *Rana esculenta* (L.). *Experientia*, 34, 1019-1020.



- Schulze, A., M. Jansen, & G. Köhler. 2015. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterisation, and ecological assignment. *Zootaxa*, 4016(1), 1-111.
- Sharon, R., G. Degani, & M. R. Warburg. 1997. Oogenesis and the ovarian cycle in *Salamandrasalamandrainfraimmaculata* Mertens (Amphibia; Urodela; Salamandridae) in fringe areas of the taxon's distribution. *Journal of morphology*, 231(2): 149-160.
- Soto, A.M., H. Justicia, J.W. Wray & C. Sonnenschein. 1991. *p*-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, 92: 167-173.
- Tabb, M.M. & B. Blumberg. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology*, 20: 475-482.
- Tamschick, S., Rozenblut-Kościsty, B., Ogielska, M., Lehmann, A., Lymberakis, P., Hoffmann, F., ... & Stöck, M. (2016). Sex reversal assessments reveal different vulnerability to endocrine disruption between deeply diverged anuran lineages. *Scientific Reports*, 6(1), 23825.
- Tanimura, A. & H. Iwasawa. 1988. Ultrastructural Observations on the Origin and Differentiation of Somatic Cells during Gonadal Development in the Frog *Rana nigromaculata*. *Development Growth & Differentiation*, 30 (6): 681-691.
- Traijtt, T., N. Kitana, & J. Kitana. 2020. Pattern of gonadal sex differentiation in the rice field frog *Hoplobatrachus rugulosus* (Anura: Dicroglossidae). *Zoological studies*, 59.
- Viertel, B. & S. Richter. 1999. Anatomy: viscera and endocrines. En McDiarmid, R.W. & R. Altig (Eds.): *Tadpole: the biology of anuran larvae*. The University of Chicago Press, London.
- Wang, X., Ha, D., Yoshitake, R., Chan, Y. S., Sadava, D., & Chen, S. (2021). Exploring the biological activity and mechanism of xenoestrogens and phytoestrogens in cancers: Emerging methods and concepts. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8798.
- Wake, M. H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. The gonads and the fat bodies. *Journal of morphology*, 126(3): 291-331.
- White, R., S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter & M.G. Parker. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*. 135: 175-182.
- Witschi, E. 1929. Studies on sex differentiation and determination in amphibians: Development and sexual differentiation of the gonads of *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology*, 52(2): 267-291.
- Wright, M.L., S.E. Richardson & J.M. Bigos. 2011. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(4): 498-503.
- Wojnarowski, K., Cholewińska, P., Palić, D., Bednarska, M., Jarosz, M., & Wiśniewska, I. (2022). Estrogen receptors mediated negative effects of estrogens and xenoestrogens in teleost fishes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2605.
- Yao, H.H.C., L. Di Napoli & B. Capel. 2003. Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development*, 130 (24): 5895-5902.
- Zaracho, V.H., A. Céspedes, B. Alvarez, E. Lavilla. 2012. Guía de campo para la identificación de los anfibios de la provincia de Corrientes (Argentina). Fundación Miguel Lilo, Publicación especial.





## ANEXO I

**Referencias de los esquemas presentados de tablas y figuras.** Ilustración: Vaca D. Ayelen.

