



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA -
UNNE



Licenciatura en Ciencias Biológicas

Trabajo Final de Graduación

**Ciclo reproductivo de una población de
Atractus reticulatus (Serpentes: Colubridae)
del noreste de la provincia de Corrientes.**



**Autora: Silvana Analia Ruiz
Directora: Dra. María Teresa Sandoval
Co-Director: Dr. Martín Ortiz**

2025

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura y, en particular, al Departamento de Embriología Animal por brindarme el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A mi directora, gracias por todos los conocimientos que compartió conmigo, por su paciencia y por ser una parte fundamental en esta última etapa de mi carrera. A mi co-director, gracias por su valiosa guía, por resolver mis dudas con claridad y por su constante predisposición para ayudarme.

A mi papá, por su apoyo constante y por incentivar me siempre a estudiar lo que me apasiona. A mi mamá, por celebrar cada uno de mis logros con orgullo y ofrecerme palabras de consuelo cuando las cosas no salieron como esperaba. A mis hermanas, por su sentido del humor, que me ayudó a sobrellevar los momentos de estrés, y por escuchar pacientemente mis preocupaciones. Y a mi querida Pelu, por ser mi compañera constante durante largas horas de estudio, siempre presente mientras preparaba cada uno de mis finales, ofreciéndome su calidez y compañía cuando más lo necesitaba, convirtiéndose en un apoyo silencioso pero fundamental.

A Vale y Ceci, gracias por las risas en aquellas primeras cursadas, por las mejores anécdotas de esta etapa. Gracias por acompañarme tanto en mis logros como en mis fracasos, por los consejos y por escucharme. A Ayelén, la amiga que conocí en el laboratorio, gracias por los innumerables consejos, por los mates compartidos y por guiarme para crecer en el ámbito de la investigación.

A todos ellos, gracias por la fe que depositaron en mí y por acompañarme en mi formación profesional. Este trabajo también es resultado de su apoyo y presencia constante, que me impulsaron a avanzar incluso frente a los desafíos.

Finalmente, a todas aquellas personas que, de una u otra manera, contribuyeron a la realización de este trabajo, muchas gracias.

Contenido

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Resultados	11
Machos	11
Análisis anatómico	11
Análisis histológico	13
Hembras	18
Análisis anatómico	18
Análisis histológico	20
DISCUSIÓN	2
Bibliografía	8
Anexo 1. Referencias de esquemas	7

RESUMEN

La biología reproductiva en reptiles es un campo fundamental para comprender la dinámica poblacional, especialmente en lo que respecta al ciclo reproductivo y los procesos involucrados en la gametogénesis. Este tipo de estudios proporciona información valiosa sobre las estrategias reproductivas, que en reptiles pueden incluir ciclos continuos y estacionales, clasificados como asociados o disociados según la sincronización temporal entre la gametogénesis y la actividad reproductiva. Además, estos ciclos pueden diferir entre sexos e incluso presentar variaciones intraespecíficas entre distintas poblaciones. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el ciclo reproductivo en una población de *Atractus reticulatus* del nordeste de Corrientes. Se analizaron los testículos, ovarios y conductos asociados mediante estudios anatómicos e histológicos para evaluar la actividad reproductiva de ejemplares adultos machos y hembras en distintos meses del año. En machos, se observó una asimetría en el tracto reproductor, con el testículo derecho ubicado más anterior que el izquierdo. Los testículos presentaron un mayor volumen entre diciembre y mayo, mientras que, los valores más bajos se registraron en septiembre y octubre. Los conductos deferentes contenían espermatozoides durante todos los meses analizados. Los túbulos seminíferos mostraron una actividad espermatogénica alta en enero, marzo, mayo y diciembre (estadios 6a y 6b) y regresión en junio, septiembre y octubre (estadio 7a y 7b). La altura del epitelio germinal fue mayor en los períodos de alta actividad y menor en el periodo de regresión. El epidídimo en junio y mayo presentó abundantes espermatozoides, mientras que, en diciembre y enero se observaron escasos espermatozoides y en septiembre y octubre los epididímos estaban vacíos. En las hembras también se identificó una asimetría en el tracto reproductor, con el ovario derecho ubicado más anteriormente que el izquierdo. Se observaron folículos previtelogénicos y vitelogénicos todo el año, con un rango total de 16 a 31 folículos por ejemplar. Se observaron los folículos vitelogénicos de menor volumen en marzo y mayo, mientras que, los folículos de mayor volumen en diciembre. Se identificaron ocho estadios de la foliculogénesis. Los folículos previtelogénicos (E.I, E.II, E.III y E.IV) y vitelogénicos iniciales (E. V y E. VI) estuvieron presentes todo el año, mientras que, los estadios avanzados de vitelogénesis (E. VII y E. VIII) se registraron únicamente entre junio y diciembre. También se observaron folículos atrésicos en agosto, octubre y diciembre, y cuerpos lúteos en marzo, junio, agosto, octubre y diciembre. Los resultados de este estudio indican que *Atractus reticulatus* presenta un ciclo reproductivo mixto, que combina características prenupciales y postnupciales. Mientras que las hembras exhiben un patrón prenupcial, con gametogénesis previa al apareamiento, los machos muestran actividad gonadal postnupcial, evidenciado por el almacenamiento de espermatozoides durante todo el año. Esta estrategia mixta podría representar una ventaja adaptativa en relación a su modo de vida semifosorial, permitiendo a hembras y machos contar con disponibilidad de espermatozoides durante todo el periodo de apareamiento. Finalmente, la variabilidad de los ciclos gonadales reportada para el género *Atractus* sugiere que factores ambientales, como la temperatura y las precipitaciones, podrían desempeñar un papel clave en la regulación de la reproducción en este taxón. Esto pone de manifiesto la diversidad de estrategias y plasticidad reproductiva dentro los reptiles.

INTRODUCCIÓN

Los reptiles representan uno de los grupos de vertebrados más exitosos, lo que se refleja en su amplia distribución y diversidad de linajes, así como en una gran variedad de estrategias reproductivas (Mathies 2011). Actualmente, existen más de 11900 especies de reptiles distribuidas en todo el mundo, excepto en los polos, y habitan tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Vitt y Caldwell 2014; Uetz P. 2022). Los reptiles muestran una variedad de estrategias reproductivas que incluyen distintos tipos de ciclos y modos reproductivos, distintos modelos de desarrollo y nutrición embrionaria, con una fecundidad variable respecto al número de huevos y periodicidad de las puestas, entre otros (Almeida-Santos *et al.* 2004; Ibargüengoytí 2008). Estos aspectos de la reproducción influyen en la eficiencia biológica de una especie y son importantes para caracterizar la historia natural de un taxón.

Los ciclos reproductivos en reptiles pueden ser estacionales o continuos. En los ciclos continuos la actividad gonadal puede mantenerse constante a un nivel máximo o presentar una disminución en la gametogénesis, sin alcanzar una quiescencia completa (Mathies 2011; Vitt y Caldwell 2014). Los ciclos estacionales se caracterizan por períodos bien definidos de actividad gonadal y de reposo o quiescencia (Leyton *et al.* 1982; Cruz *et al.* 1997).

Estos ciclos pueden clasificarse en prenupciales (asociados) o posnupciales (disociados) (Saint Girons 1982; Crews 1984; Aldridge *et al.* 2020). En los ciclos asociados, la gametogénesis masculina y femenina está sincronizada, y permite que la fertilización ocurra inmediatamente después de la cópula (Shanbhag 2002). En los ciclos disociados, la gametogénesis y el comportamiento de apareamiento no coinciden en el tiempo, siendo característico el almacenamiento de esperma tanto en machos como en hembras y el retraso de la fertilización de los ovocitos con respecto al momento de la cópula (Almeida-Santos *et al.* 2004).

Los ciclos gonadales están influenciados por factores ambientales locales, como la temperatura, el fotoperíodo, las precipitaciones y la disponibilidad de alimento (Pough *et al.* 2004). Estos factores inducen cambios morfológicos y fisiológicos, que se evidencian principalmente en las gónadas y los conductos genitales, y de comportamiento que se manifiestan en estrategias de selección sexual, cortejo y apareamiento (Ibargüengoytí, 2008)

El estudio de los ciclos reproductivos incluye el análisis de variables cuantitativas y cualitativas que pueden abordarse tanto a nivel macroscópico como histológico. En los machos, estas variables incluyen el tamaño y volumen testicular, los estadios de la espermatogénesis, la altura del epitelio germinal, y la presencia o ausencia de espermatozoides en el conducto deferente y epidídimos (Mayhew y Wright 1970; Gribbins 2011; Sivan *et al.* 2016). En hembras, estas variables incluyen el número de folículos en los ovarios, los estadios de la foliculogénesis (Uribe *et al.* 1995), la presencia y/o número de folículos atrésicos y cuerpos lúteos (Gemmel 1995) y la presencia de espermatozoides en las distintas regiones del oviducto. Todas estas variables permiten conocer la actividad gonadal y sirven de base para describir los ciclos reproductivos de machos y hembras e interpretar las estrategias reproductivas en una población (Saint Girons 1982; Mathies 2011).

Muchos trabajos sobre la biología reproductiva (Hartmann *et al.* 2004; Lopez *et al.* 2009; de Paula Orofino *et al.* 2010; Rebelato *et al.* 2016; Giraudo *et al.* 2014) describen los ciclos basándose en el análisis macroscópico de gónadas y conductos asociados. Sin embargo, el análisis histológico permite describir los cambios estructurales del tracto reproductor, así como también el proceso de gametogénesis incluyendo el origen, diferenciación, maduración y transporte de las gametas (Jones y Guillette 2010; Gribbins 2011) Estos aspectos son fundamentales para inferir la fisiología del proceso reproductivo y conocer las características de los ciclos gonadales.

Si bien en las últimas décadas se ampliaron los estudios sobre biología reproductiva de serpientes sudamericanas, la mayoría se han realizado en especies de regiones tropicales (Almeida-Santos y Salomão 2002) Entre las especies se pueden nombrar *Clelia Clelia* (Pizzatto 2005), *Bothrops atrox* (Silva *et al.* 2019) Para regiones subtropicales, se conocen aspectos de la biología reproductiva de *Erythrolamprus poecilogyrus poecilogyrus* (Pinto y Fernandes 2004), *Clelia plumbea*; *Clelia rustica*; *Clelia montana*; *Clelia quimi* (Pizzatto 2005), *Atractus reticulatus* (Balestrin y Di-Bernardo 2005), *Liophis milliaris* (Pizzatto *et al.* 2006), *Thamnodynastes strigatus* (Loebens *et al.* 2022). Para regiones templadas la información se limita a *Hypsiglena torquata* (FITCH 1982)

En Argentina el número de especies de serpientes asciende a 10,385 especies (Arzamendia y Giraudo 2009) con una gran diversidad en cuanto a los hábitos de vida, sin embargo, los conocimientos referentes a la biología reproductiva se limitan a unas pocas especies como *Philodryas patagoniensis* (López y Giraudo 2008), *Boa constrictor occidentalis* (Cardozo y Chiaraviglio 2008); *Liophis semiaureus* (López *et al.* 2009).

Dentro de la familia Dipsadidae, el género *Atractus* incluye alrededor de 150 especies distribuidas desde Panamá hasta el norte de Argentina. Estas especies presentan hábitos fosoriales o semifosoriales y habitan ambientes variados, como selvas en galería, bosques tropicales y hábitats abiertos (Siqueira *et al.* 2022). En Argentina, se reconocen 5 especies: *A. bocki*, *A. paraguayensis*, *A. snethlageae*, *A. reticulatus* y *A. sp.* en su mayoría categorizadas como insuficientemente conocidas (Giraudo *et al.* 2012).

Atractus reticulatus es una especie ovípara, de pequeño tamaño y hábitos semifosoriales (Figura 1 A). Su distribución abarca las provincias de Misiones y Corrientes en Argentina, extendiéndose al este de Paraguay, sur de Brasil y norte de Uruguay (Nogueira *et al.* 2019; Mendoza *et al.* 2020;). A pesar de su distribución restringida, es considerada como "No Amenazada", debido a su abundancia incluso en hábitats alterados (Giraudo *et al.* 2012). Balestrin y Di-Bernardo (2005) analizaron el ciclo reproductivo de una población en el sur de Brasil y describen el inicio de la actividad reproductiva en agosto con puesta de huevos entre noviembre y enero, y eclosión de enero a marzo, variando la fecundidad entre 2 y 8 huevos (Sandoval *et al.* 2009). Gualdrón-Durán *et al.* (2019) realizaron estudios macroscópico e histológicos, y analizaron la actividad reproductiva anual de una población de *Atractus sp.* de la Cordillera Oriental de Colombia, en relación a distintas variables ambientales como precipitaciones y temperatura. Estos autores concluyen que en ciclo en los machos es continuo, mientras que para las hembras describen una vitelogénesis extendida con ciclo discontinuo no estacional.

Con el objetivo de aportar información que permita caracterizar el patrón reproductivo de *Atractus reticulatus* en nuestra región, en este estudio se caracterizó la dinámica gonadal de ejemplares machos y hembras adultos de una población de la provincia de Corrientes; mediante el análisis de variables morfométricas y características histológicas de ovarios y testículos y sus conductos asociados en distintos meses del año

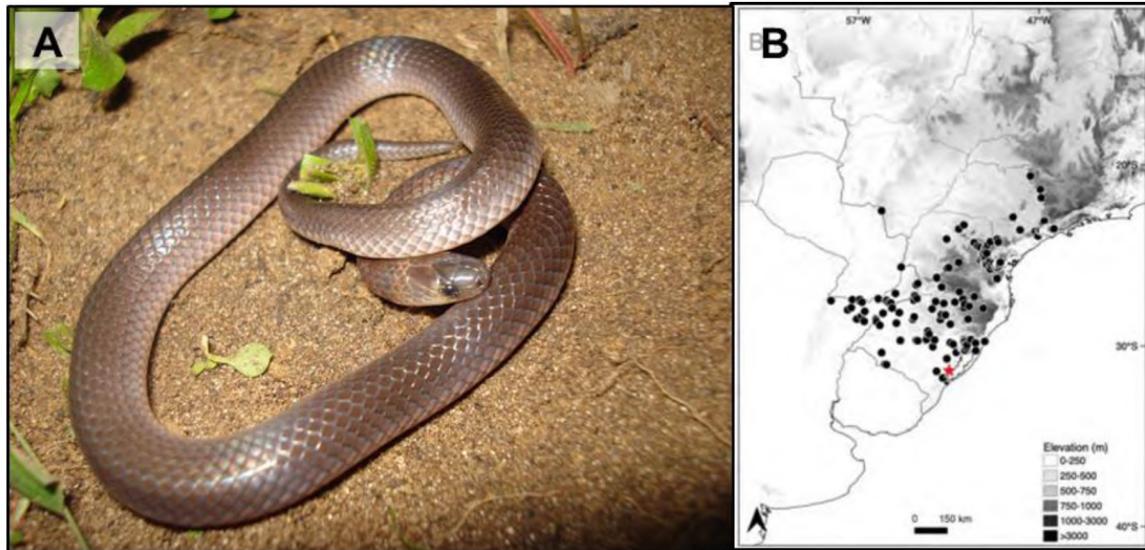


Figura 1. *Atractus reticulatus*. (A) Ejemplar adulto (Foto: Soledad Palomas). (B) Distribución geográfica (Nogueira *et al.* 2019).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar aspectos del ciclo reproductivo de una población de *Atractus reticulatus* del noreste de la provincia de Corrientes.

Objetivos específicos

- Describir la anatomía macro y microscópica del tracto reproductor masculino y femenino de *Atractus reticulatus* en distintos momentos del año.
- Caracterizar el ciclo espermatozógeno de los machos y describir las características del epidídimo y conducto deferente en relación al estado reproductivo.
- Identificar los eventos de la folículogénesis y crecimiento, maduración folicular y vitelogénesis y caracterizar la dinámica ovárica de las hembras.
- Describir las características del oviducto en relación al estado reproductivo de la hembra.
- Integrar los resultados en relación a los eventos de la reproducción de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Para este estudio se utilizaron muestras del tracto reproductor (gónadas y conductos asociados) obtenidas de ejemplares adultos, machos (n=13) y hembras (n=13) de *Atractus reticulatus*. Dichos ejemplares fueron colectados en distintas localidades de la provincia de Corrientes (Figura 2), durante el periodo junio 2007 - marzo 2008, en el marco de un proyecto de investigación previo a este estudio, y se encontraban depositados en la Colección Herpetológica Corrientes (UNNEC) (ver Tabla 1 y 3). Al momento del estudio se contaba con datos de Longitud Hocico-Cloaca (LHC) (ver Tablas 1 y 3) de los ejemplares analizados y con muestras del tracto reproductor de machos y de hembras fijadas en formaldehido 10% o Solución de Bouin y conservadas en alcohol 70%.

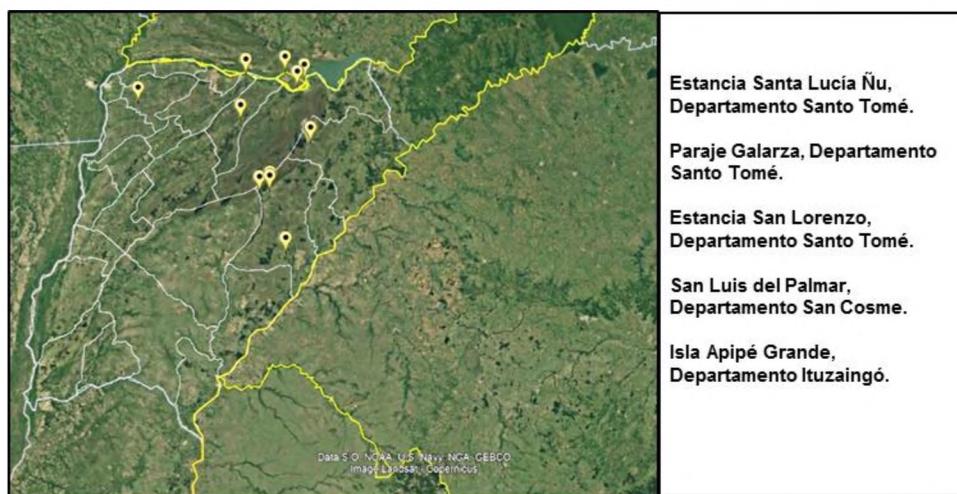


Figura 2. Sitios de colecta en la provincia de Corrientes de los ejemplares de *Atractus reticulatus* utilizados en este estudio. Georreferencia: Google satelital.

Análisis anatómico

Se realizó la observación macroscópica con lupa estereoscópica Leica EZ4. Las fotografías se tomaron con cámara digital incorporada a la lupa. Las mediciones se realizaron a partir de las fotografías digitales obtenidas, utilizando el software ImageJ1.53e (Schneider *et al.* 2012).

Para el caso de los testículos, se medió la longitud y ancho máximo de cada uno y se calculó el volumen testicular a partir de la fórmula del esferoide (Dunham 1983): $V = 4/3 (L/2)^*(A/2)^2$, donde L= longitud del testículo y A= ancho máximo del testículo. Asimismo, se analizó el estado del epidídimo y el conducto deferente en función del grado de contorsión y la presencia / ausencia de espermatozoides. Además, algunos testículos fueron observados con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Para ello las muestras fueron deshidratadas en soluciones crecientes de acetona, secadas a punto crítico y metalizadas con oro-paladio. Las observaciones se realizaron en un microscopio JEOL JSM-5800 LV perteneciente al Servicio de Microscopía de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste.

Para el caso de los ovarios, se contabilizó el número de folículos por ovario. A cada folículo se le midió el diámetro (en el caso de folículos con forma circular) o la longitud y ancho máximo (en el caso

de folículos con forma ovoide). Se calculó el volumen folicular a partir de la fórmula del esferoide (Dunham 1983): $V = 4/3 (L/2)^2(A/2)^2$, donde L= longitud del folículo y A= ancho máximo del folículo.

Obtención de preparados histológicos

Ovarios, testículos y conductos asociados fueron procesados siguiendo el protocolo convencional de histología para la obtención de preparados histológicos. Para ello se procedió a deshidratar las muestras en soluciones crecientes de alcohol etílico 70%, 80%, 96% y alcohol butílico (100%), impregnación en alcohol butílico - parafina (50-50%) e inclusión en parafina (100%). Posteriormente se procedió al armado del taco y orientación de la pieza para la realización de secciones transversales. Se realizaron secciones de 5-10 μm con micrótomo rotatorio tipo Spencer manual. Las muestras fueron coloreadas con coloración convencional de hematoxilina-eosina y se realizó el montaje permanente con el bálsamo sintético.

Análisis histológico

Las muestras obtenidas se observaron con Microscopio Leica DM500 y se fotografiaron con cámara digital. Se confeccionaron esquemas y dibujos representativos de lo observado.

Machos

Testículos. Se analizó la estructura del testículo y túbulos seminíferos. Los tipos celulares se identificaron en base a los trabajos de Gribbins *et al.* (2006). Sobre la base de la organización y tipos celulares de la línea germinal presentes en los túbulos seminíferos se determinó la actividad espermatogénica. Para ello se consideró la célula espermatogénica más avanzada en el margen luminal de los túbulos seminíferos. Se consideraron los siguientes estadios (E.) espermatogénicos propuestos por Mayhew y Wright (1970):

E. 1: túbulos seminíferos sin lumen y células germinales en cualquier fase de la espermatogénesis.

E. 2: túbulos seminíferos con lumen y espermatocitos primarios en el margen luminal.

E. 3: túbulos seminíferos con lumen y espermatocitos secundarios en el margen luminal.

E. 4: túbulos seminíferos con lumen y espermátides indifenciadas en el margen luminal.

E. 5: túbulos seminíferos con lumen y con espermátides diferenciadas.

E. 6: túbulos seminíferos con espermatozoides en el margen luminal.

E. 7: túbulos seminíferos con epitelio germinal de altura reducida y con algunas espermatogonias; lumen amplio con restos celulares (regresión inicial)

E. 8: túbulos seminíferos con espermatogonias, lumen reducido. Diámetro del túbulo reducido (regresión completa o quiescencia gonadal).

A partir de fotografías digitales y utilizando el software ImageJ1.53e (Schneider *et al.* 2012) se midió la altura del epitelio germinal de cinco túbulos seminíferos por muestra de cada ejemplar. En cada

túbulo se registraron 10 medidas al azar abarcando todo el perímetro del mismo. A partir de los datos obtenidos, se calculó la altura promedio para cada túbulo y la altura promedio de los cinco túbulos de la muestra.

Epidídimos y conductillos eferentes. Se caracterizó el epitelio de dichas estructuras y se registró la presencia / ausencia de espermatozoides.

Hembras

Ovarios. Se caracterizó la estructura histológica de los folículos ováricos en distintas fases del desarrollo, folículos atrésicos considerando las características del ovocito y del epitelio folicular. Asimismo, se describió la estructura de los cuerpos lúteos a partir de las características de las células foliculares durante el proceso de luteogénesis / luteólisis. Los estadios del desarrollo folicular, atresia y de los cuerpos lúteos se establecieron en base a los criterios propuestos por Uribe *et al.* (1995).

A partir de las fotografías digitales de los folículos y utilizando el software ImageJ1.53e (Schneider *et al.* 2012) se midió el diámetro o la longitud y ancho máximos de cada uno según su forma esférica u ovoide, respectivamente. A partir de dichas mediciones se calculó el volumen folicular aplicando la fórmula del esferoide (*op cit.*). Estos datos fueron equiparados a las mediciones hechas a partir de fotografías de lupa estereoscópica y se estableció el rango de tamaño de los folículos previtelogénicos y vitelogénicos en distintos estadios del desarrollo.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico, a partir de los datos obtenidos utilizando el software Infostat (V 2020e). Se realizó un análisis de correlación de Spearman. Para el caso de los machos se analizó la correlación entre la LHC de los ejemplares y el volumen testicular, mientras que, para las hembras se analizó la LHC y la cantidad total de folículos en hembras. Para todas las pruebas estadísticas se utilizó un p-valor del 5%.

Resultados

Machos

Análisis anatómico

El tracto reproductor consistió en un par de testículos ovoides, blanquecinos de posición asimétrica, el derecho más anterior que el izquierdo. Estos se asociaron a los epidídimos los cuales se continuaron en un par de conductos deferentes que desembocan en la cloaca (Figura 3 A). Epidídimos y conductos deferentes presentaron variaciones en cuanto a su aspecto (traslucido u opaco) y su grado de contorsión, debido a la presencia/ ausencia de espermatozoides (Figura 3 B y C, Tabla 1).

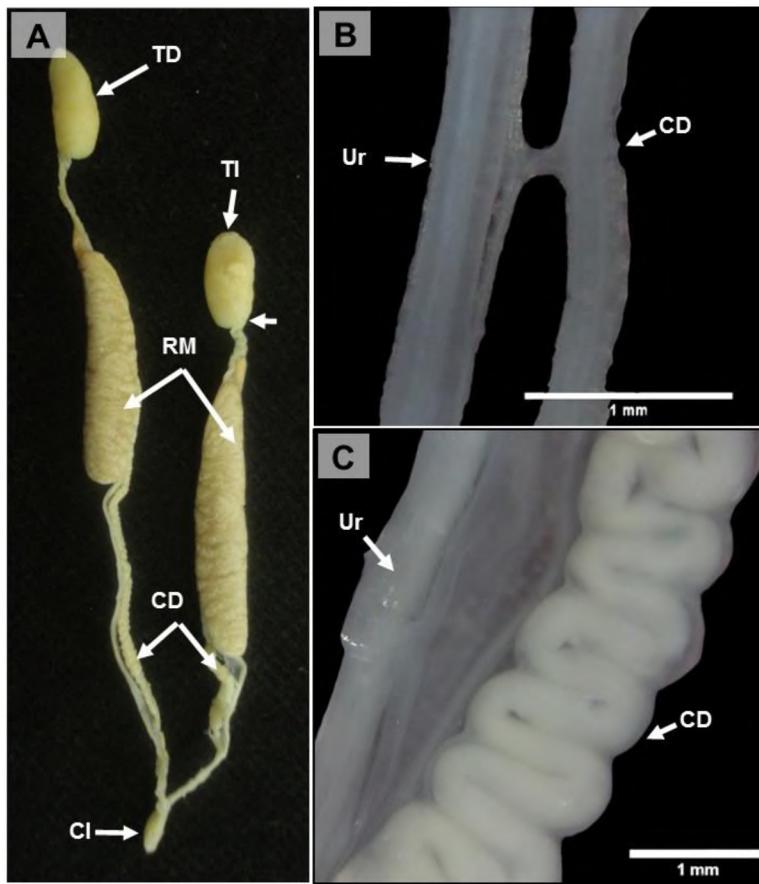


Figura 3. Tracto reproductor de machos de *Atractus reticulatus*. (A) Vista general. (B) Detalle del conducto deferente no contorneado. (C) Detalle del conducto deferente contorneado. Referencias: CD: conducto deferente, CI: cloaca. E: epidídimo, RM: riñón mesonéfrico, TD: testículo derecho, TI: testículo izquierdo, Ur: uréter.

Los datos y parámetros registrados en el tracto reproductor masculino de cada ejemplar se presentan en la Tabla 1

UNNEC	Mes de colecta	LHC (mm)	Volumen testicular derecho (mm ³)	Volumen testicular izquierdo (mm ³)	Volumen testicular promedio (mm ³)	Estadio de la espermatogénesis	Estado del conducto deferente	Presencia de espermatozoides	
								Epidídimo*	Deferente
9087	enero	220,6	90,2	82,4	86,3	6a	contorneado	presente	presente
9963	marzo	285,4	82,1	48,7	65,4	6a	contorneado	ausente	presente
9999	mayo	296,5	110,7	127,3	119	6b	contorneado	presente	presente
9547	junio	280,9	85,2	98,2	91,7	6b	contorneado	presente	presente
9548	junio	166	34,1	28,1	31,1	7a	no contorneado	S/D	ausente
10170	julio	218,8	23,9	55,6	39,7	S/D	contorneado	presente	presente
10550	septiembre	183,4	16,3	13,5	14,9	5	contorneado	ausente	presente
10549	septiembre	254,7	27,9	6,0	16,9	S/D	contorneado	S/D	presente
10558	septiembre	251,6	38,2	46,4	42,3	7a	contorneado	S/D	presente
10178	octubre	173	18,5	10,0	14,3	7b	no contorneado	S/D	ausente
10177	octubre	210,7	39,2	39,0	39,1	7a	contorneado	ausente	presente
10325	diciembre	253,3	177,2	139,4	158,3	6a	contorneado	presente	presente
10324	diciembre	284,7	192,4	156,3	174,4	6b	contorneado	ausente	presente

Tabla 1. Datos de ejemplares macho de *Atractus reticulatus*. *basado en la observación histológica.

Los testículos presentaron variaciones en su volumen a lo largo del año, alcanzando valores máximos en diciembre y valores mínimos en septiembre y octubre (Figura 4). El análisis de regresión lineal mostró una relación positiva ($r^2 = 0,43$, $F(1,11) = 8,35$, $p = 0,014$, $N = 12$) entre LHC y el volumen testicular (Figura 5).

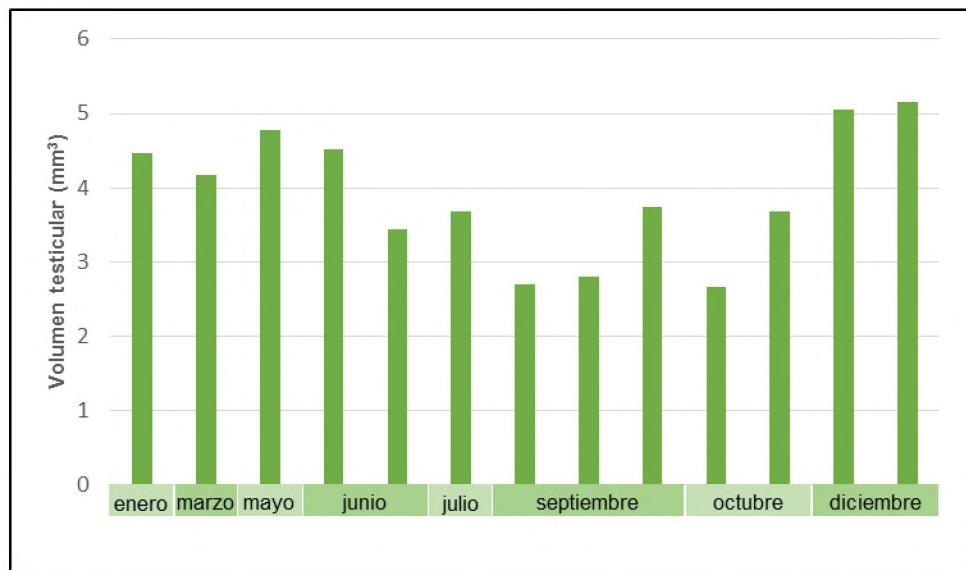


Figura 4. Volumen testicular (mm³) de ejemplares de *Atractus reticulatus* en diferentes meses del año.

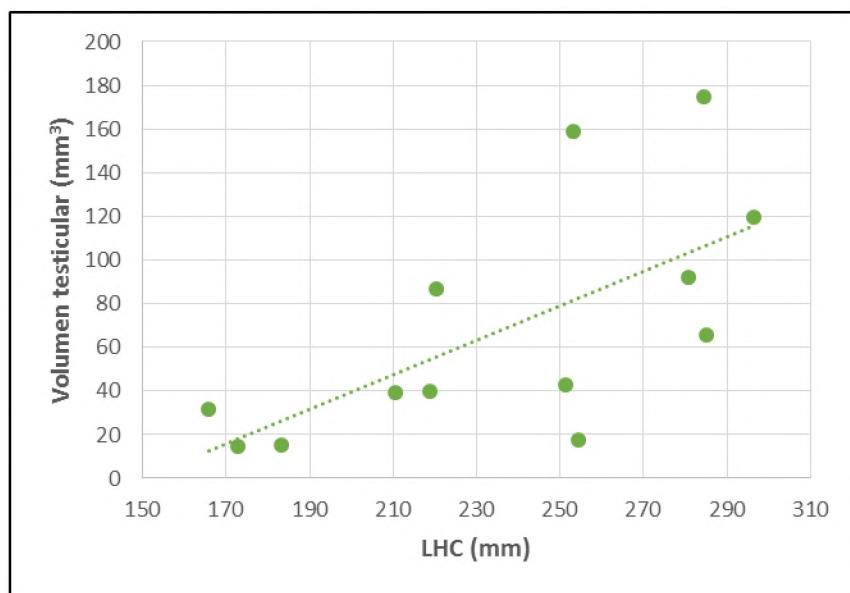


Figura 5. Regresión lineal entre LHC (mm) y el volumen testicular (mm³) de machos adultos de *Atractus reticulatus*.

Análisis histológico

Descripción de los estadios de la espermatogénesis

El análisis histológico de los testículos permitió reconocer túbulos seminíferos delimitados por la membrana basal, a la cual se encontraban adosadas células de Sertoli y espermatogonias, formando el compartimento basal. En el compartimento adluminal, se reconocieron distintos tipos celulares de

la espermatocitogénesis y espermiogénesis que variaron en número y disposición según el estadio espermatogenético de cada ejemplar (Figura 6).

Las células de Sertoli se caracterizaron por presentar contorno irregular y núcleo de forma variable, triangular o rectangular. Las espermatogonias presentaron forma globosa y citoplasma claro con núcleo redondeado de nucleoplasma claro y cromatina laxa. Los espermatocitos primarios, caracterizados por su gran tamaño, presentaron citoplasmas claro y núcleo voluminoso. Estos se observaron en distintas fases de la primera profase meiótica. Los espermatocitos primarios en leptonete, presentaron el núcleo intensamente basófilo con la cromatina condensada. Estos tipos celulares se observan en la Figura 6 A.

Los espermatocitos primarios en cigotene presentaron un mayor tamaño que los anteriores y en el núcleo se reconocieron filamentos de cromatina gruesos dispuestos en el centro del núcleo. Este tipo celular se representan en las figuras 6 B.

Los espermatocitos primarios en paquitene se caracterizaron por un citoplasma claro, un núcleo voluminoso con filamentos de cromatina finos dispuestos en forma ovillo. Los espermatocitos primarios en diplotene se caracterizaron por presentar los pares de cromosomas individualizados y conspicuos. En los espermatocitos primarios en diacinesis los cromosomas se observaron bien conspicuos, debido a su alta condensación, y dispersos en el citoplasma de la célula (indicativo de la desintegración de la membrana nuclear). Estos tipos celulares se representan en la Figura 6 C. En algunos ejemplares se reconocieron, además, espermatocitos primarios en metafase I caracterizadas por presentar cromosomas en la línea ecuatorial (Figura 6 B).

Los espermatocitos secundarios (Figura 6 B y C) se diferenciaron de los espermatocitos primarios por su menor tamaño y el núcleo pequeño e intensamente basófilo.

Las espermátides (Figura 6 B-E) se observaron en distintas fases de la espermiogénesis reconociéndose por las características del núcleo, principalmente. Las espermátides en fase 1 se observaron como células redondeadas y se diferenciaron de los espermatocitos secundarios por su menor tamaño y mayor condensación nuclear. Las espermátides en fase 2, se reconocieron por la presencia de pequeñas vesículas acrosómicas adosadas al polo anterior del núcleo el cual presentó forma redondeada. Las fases 3 a 7 se diferenciaron por un aumento gradual en la condensación y elongación del núcleo. Además, a partir de la fase 6 el núcleo presentó una curvatura y se reconoció una disminución del citoplasma. Las espermátides 5 se caracterizaron por poseer escaso contenido citoplasmático y la presencia de flagelos, reconocidos con microscopía electrónica de barrido (Figura 6 F).

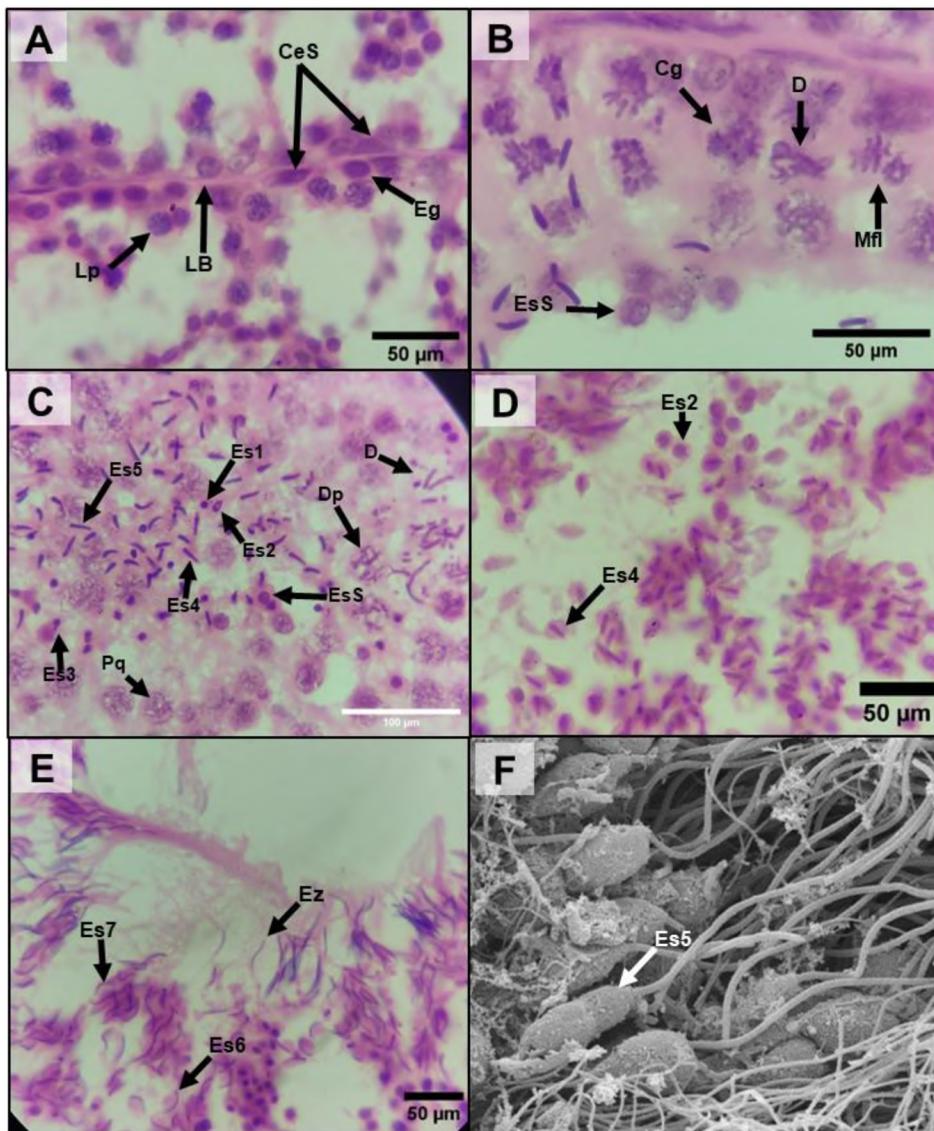


Figura 6. Tipos celulares de la línea somática y espermatogénica en túbulos seminíferos de *Atractus reticulatus*. Referencias: CeS: Célula de Sertoli, Cg: Espermatocito primario en cigotene, D: Espermatocito primario en diacinesis, Dp: Espermatocito primario en diplotene, Eg: Espermatogonia, Es1–Es7: Espermátides en distintas fases de espermiogénesis, EsS: Espermatocito secundario, Ez: Espermatozoide, Lp: Espermatocito primario en leptotene, LB: membrana basal, Mfl: Espermatocito primario en metafase I, Pg: Espermatocito primario en paquítene.

Considerando la organización y tipos celulares de la línea germinal más avanzados, presentes en los túbulos seminíferos, se reconocieron distintos estadios espermatogénéticos (Tabla 2), subdividiendo el estadio 6 y 7, propuesto por Mayhew y Wright (1970), en a y b.

Estadio 5: túbulos seminíferos con epitelio germinativo con numerosos espermatocitos primarios, escasos espermatocitos secundarios y espermátides en fase 5, en el margen luminal. Este estadio se reconoció en un ejemplar capturado en septiembre.

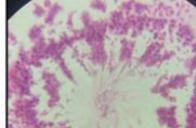
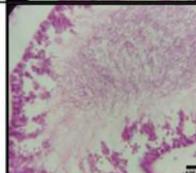
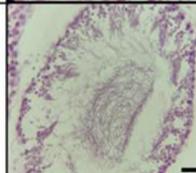
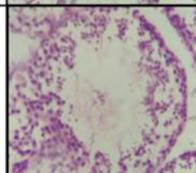
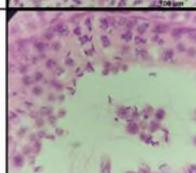
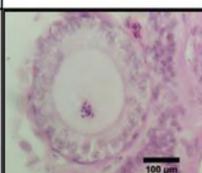
Estadio 6(a): túbulos seminíferos con epitelio germinativo muy desarrollado con numerosos espermatocitos primarios, secundarios y espermátides tempranas (en fase 2, 3 y 4) y espermátides tardías (en fase 5, 6 y 7), en el margen luminal. Este estadio se presentó en ejemplares capturados en enero, marzo y diciembre.

Estadio 6(b): túbulos seminíferos con epitelio germinativo menos desarrollado que el estadio anterior con pocos espermatocitos primarios, abundantes espermatocitos secundarios, espermátidés tempranas (en fase 2, 3, 4) y avanzadas (en fases 5, 6 y 7). Espermatozoides libres en lumen. Este estadio se observó en ejemplares capturados en mayo, junio y diciembre.

Estadio 7(a): túbulos seminíferos con un epitelio germinativo con escasas espermatogonias y espermatocitos primarios. Espermatocitos secundarios y espermátidés desprendidas del epitelio germinativo, libres en el lumen del túbulo. Este estadio se observó en ejemplares capturados en junio, septiembre y octubre.

Estadio 7(b): túbulos seminíferos con un epitelio germinativo con espermatogonias y escasos espermatocitos primarios. Lumen amplio con abundantes espermatocitos primarios, secundarios y espermátidés desprendidas del epitelio germinativo; algunas con características de apoptosis. Este estadio se presentó en un ejemplar capturado en octubre y se corresponde con el estadio de regresión.

Tabla 2. Datos del análisis morfométrico, estadios de la espermatogénesis y figuras representativas del túbulo seminífero y epidídimo de ejemplares de *Atractus reticulatus*. S/D: sin dato.

UNNEC	Mes de colecta	Altura de epitelio (μm)	Estadio de la espermatogénesis	Células espermatogénicas más avanzadas en el túbulo seminífero	Túbulo seminífero	Espermatozoides en epidídimo	Epidídimo
9087	enero	197,4	6a	espermátidés avanzadas y espermatozoides		escasos	
9963	marzo	240,2	6a	espermatozoides		S/D	S/D
9999	mayo	246,6	6b	espermatozoides		abundantes	
9547	junio	192,2	6b	espermátidés avanzadas y espermatozoides		abundantes	
9548	junio	142,4	7a	espermátidés y restos celulares en el lumen		S/D	S/D
10550	septiembre	148,5	5	espermátidés avanzadas		ausentes	

10558	septiembre	75,2	7a	espermatoцитas y restos celulares en el lumen		ausentes	
10178	octubre	74,1	7b	restos celulares (espermatoцитos primarios, secundarios y espermátides)		S/D	
10177	octubre	137,8	7a	restos celulares en el lumen (espermatoцитos secundarios y espermátides)		ausentes	
10325	diciembre	264,7	6a	espermátides avanzadas		S/D	
10324	diciembre	288,6	6b	espermatozoides		escasos	

Altura del epitelio germinal

La altura del epitelio germinal presentó variaciones a lo largo del año (Tabla 2 y Figura 7). Durante los meses de diciembre a mayo se observaron los valores más altos, siendo el valor máximo promedio registrado de 288,6 μm , en un ejemplar diciembre. Estos valores coincidieron con los estadios espermatogenéticos 5 y 6. Los valores promedio más bajos fueron registrados en los meses de septiembre (75,2 μm) y octubre (74,1 μm) y se correspondieron con la fase de regresión (estadio espermatogénico 7).

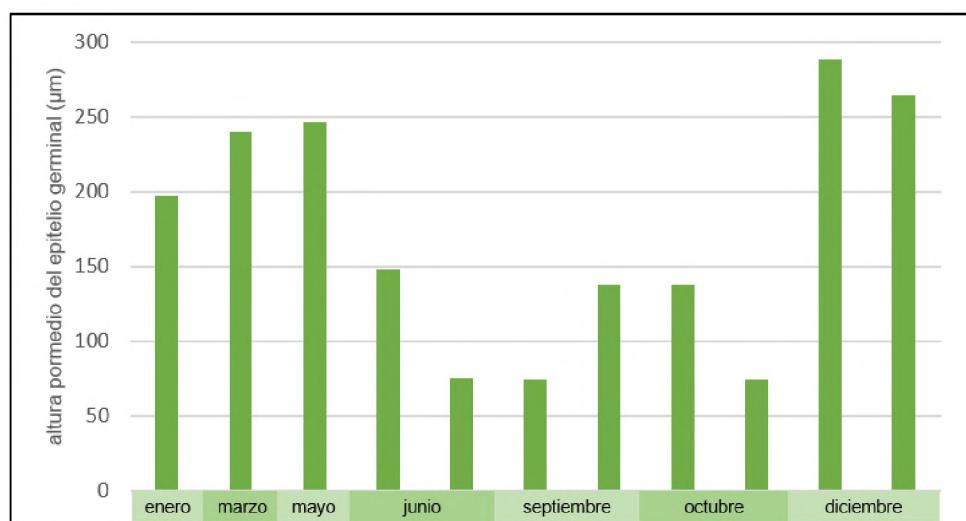


Figura 7. Variaciones de la altura del epitelio germinal de túbulos seminíferos de *Atractus reticulatus* en diferentes meses del año.

Hembras

Análisis anatómico

El tracto reproductor estuvo compuesto por un par de ovarios alargados de contorno irregular, debido a la presencia de folículos en distintas fases del desarrollo. Se dispusieron de manera asimétrica, el derecho de posición más anterior que el izquierdo. Los ovarios se asociaron a un par de oviductos regionalizados en infundíbulo, porción tubaria, útero y vagina (Figura 8).

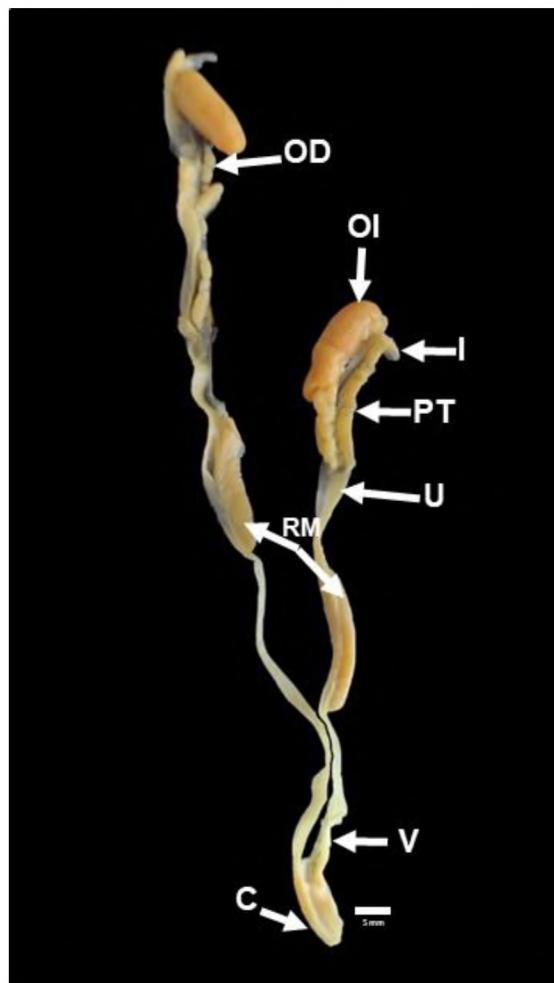


Figura 8. Tracto reproductor femenino de *Atractus reticulatus*. Referencias: C: Cloaca, I: Infundíbulo, OD: Ovario derecho, Ol: Ovario izquierdo, PT: Porción tubaria, RM: Riñón mesonéfrico, U: Útero, V: Vagina.

La tabla 3 resume la información de los parámetros registrados en las hembras analizadas. Las hembras presentaron una LCH que varió entre un máximo de 400,4 mm y un mínimo de 243,8 mm, siendo todas ejemplares adultos.

Los datos del número de folículos por ejemplar y rangos de tamaños se presentan en la tabla 3. El número de folículos totales de cada hembra varió entre un mínimo de 13 y un máximo de 31, no mostrando correlación con LCH ($r^2 = 0,15$, $F_{(1-12)} = 1,96$, $p\text{-valor} = 0,18$, $N=13$).

El análisis macroscópico permitió reconocer en cada ejemplar un número variable de folículos previtelogénicos, caracterizados por su pequeño tamaño, forma redondeada y aspecto translúcido, y folículos vitelogénicos, de forma oval y aspecto opaco y tamaño variable según el estadio del desarrollo folicular.

Considerando las características morfológicas de los folículos y los valores de su diámetro y volumen, se estableció como valor mínimo para clasificarlos en la categoría de vitelogénicos un diámetro mayor de 1,2 mm y un volumen folicular de $0,5 \text{ mm}^3$. En base a esto se clasificó a los folículos en previtelogénicos (diámetro $<1,2 \text{ mm}$; volumen $< 0,5 \text{ mm}^3$) y vitelogénicos (diámetro $\geq 1,2 \text{ mm}$; volumen $\geq 0,5 \text{ mm}^3$).

Tabla 3. Datos del análisis morfométrico de los ovarios de ejemplares de *Atractus reticulatus*.

UNNEC	Fecha de captura	LHCL (mm)	Ovario izquierdo			Ovario derecho			Nº folículos previtelogénicos totales	Nº folículos vitelogénicos totales	Total de folículos (previtelogénicos + vitelogénicos)	Diámetro folicular máximo (mm)	Longitud folicular máxima (mm)	Volumen Folicular (mm^3)	
			Nº folículos previtelogénicos	Nº folículos vitelogénicos	Nº folículos	Nº folículos previtelogénicos	Nº folículos vitelogénicos	Nº folículos						Mínimo	Máximo
9964	marzo	259,4	0	6	5	16	1	17	16	7	22	0,53	3,7	0,1	14,7
9469	marzo	247,3	7	4	11	6	8	14	13	12	25	1	2,6	0,1	8,8
9337	marzo	262	9	4	13	12	2	14	21	6	27	1,1	3,3	0,1	15,2
10.000	mayo	405,4	6	8	14	5	5	10	11	13	24	1,1	2,2	0,2	10,5
9546	junio	340	2	9	11	1	8	9	3	17	20	1,1	4,4	0,8	20,3
9545	junio	275,8	4	5	9	3	4	7	7	9	16	0,9	4,1	0,2	20,3
10169	agosto	257,7	5	7	12	2	7	9	7	14	21	0,6	4,87	0,2	27,9
9636	agosto	378,2	3	10	13	4	8	12	7	18	25	0,8	4,59	0,7	20,6
9635	agosto	243,8	2	6	8	2	8	10	4	14	18	0,9	4,75	0,2	26,3
10548	septiembre	285,2	9	7	16	3	12	15	12	19	31	0,5	6,66	0,2	35,8
10176	octubre	292,5	1	4	5	0	8	8	1	12	13	0,7	10,2	0,6	84,3
10323	diciembre	309,7	2	10	12	6	12	18	8	22	30	0,6	16,1	0,4	195,2
9837	diciembre	388	0	5	5	2	7	9	2	12	14	0,5	6,8	0,5	49,5

La Figura 9 muestra el número de folículos previtelogénicos y vitelogénicos según los meses de colecta. Como se observa, todas las hembras presentaron folículos previtelogénicos y vitelogénicos en todos los meses del año. Sin embargo, su proporción varió marcadamente en hembras colectadas en los meses de marzo, con mayor número de folículos previtelogénicos, y en hembras colectadas en los meses de mayo, junio, agosto, septiembre, octubre y diciembre, con predominio de folículos vitelogénicos.

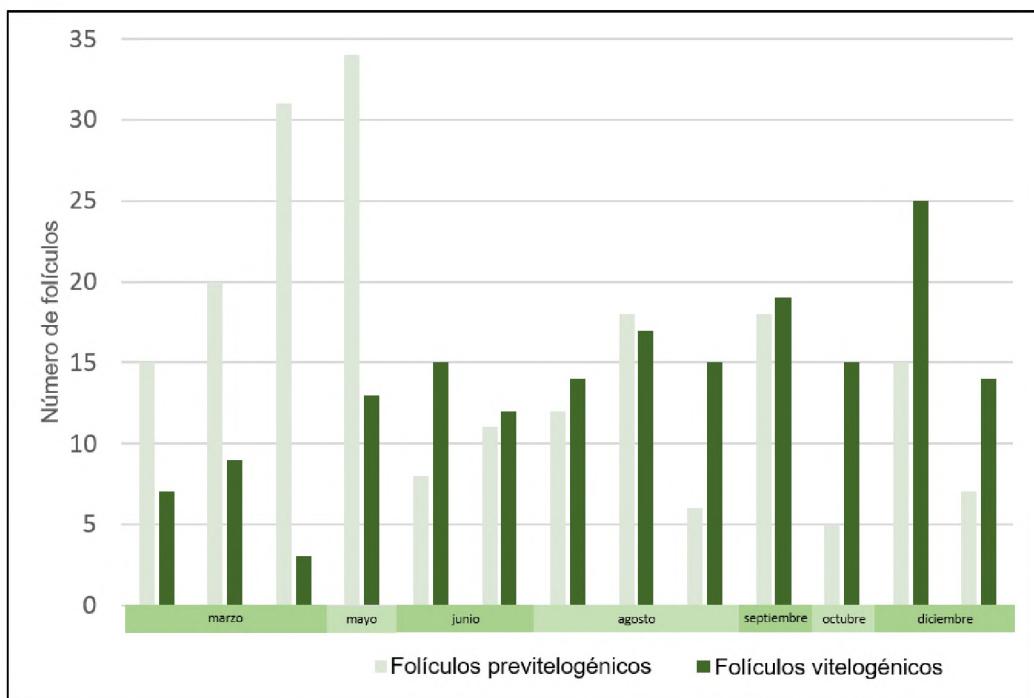


Figura 9. Número de folículos previtelogénicos y vitelogénicos en hembras de *Atractus reticulatus* en distintos meses.

Con respecto a los folículos vitelogénicos, una hembra de marzo y la hembra de mayo presentaron los folículos vitelogénicos más pequeños ($8,8 \text{ mm}^3$ y $10,5 \text{ mm}^3$, respectivamente), mientras que, la hembra de diciembre presentó los folículos vitelogénicos de mayor tamaño ($195,2 \text{ mm}^3$) (Figura 10).

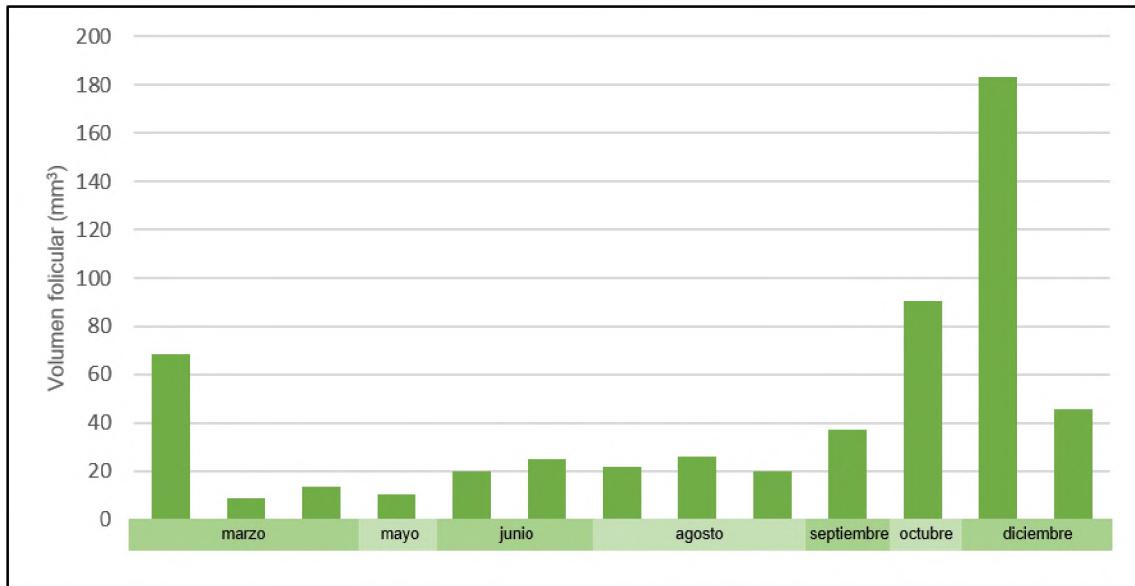


Figura 10. Volumen folicular máximo (mm^3) registrado en hembras de *Atractus reticulatus* capturadas en distintos meses.

Análisis histológico

A nivel histológico, en el ovario se reconoció una corteza bien desarrollada y una cavidad medular amplia rodeados por un epitelio simple plano, correspondiendo al tipo de ovario sacular (Figura 11 A). La corteza presentó: nidos germinales, folículos previtelogénicos y vitelogénicos en distintos estadios del desarrollo, folículos atrésicos y/o cuerpos lúteos (Figura 11 B), dependiendo del estado

reproductivo de la hembra, rodeados por un estroma laxo compuesto por fibroblastos, fibras de colágeno y vasos sanguíneos. Dicho estroma fue abundante alrededor de nidos germinales, cuerpos lúteos y folículos atrésicos y escaso alrededor de los folículos en desarrollo.

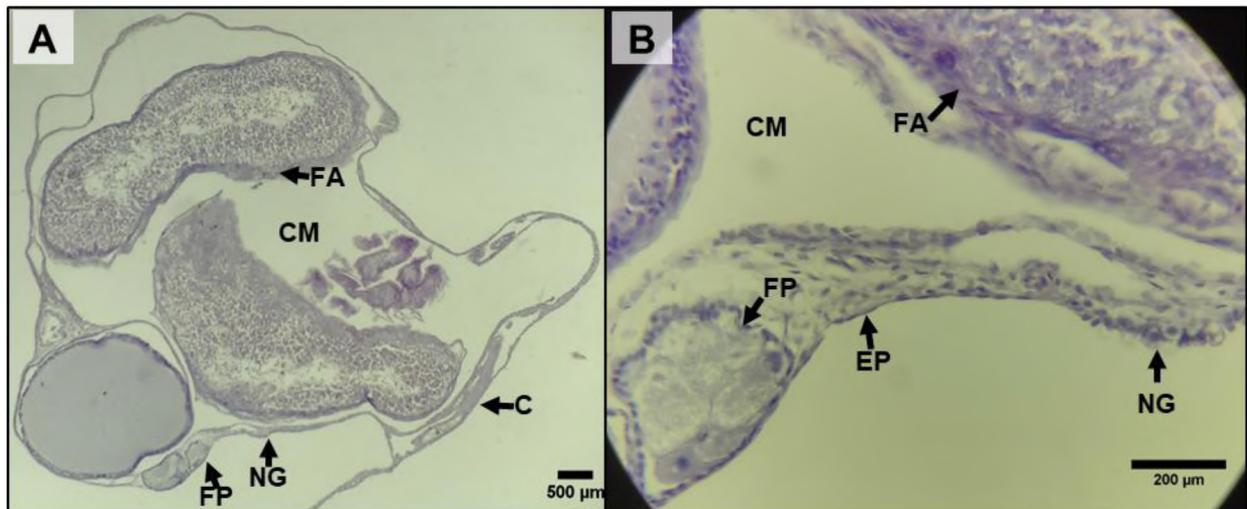


Figura 11. Ovario de *Atractus reticulatus*. (A) Vista general del ovario. (B) Detalle de la corteza ovárica.

Referencias: C: corteza, CM: cavidad medular, EP: epitelio simple plano, FA: folículo atrésico. FP: folículo previtelogénico, NG: nido germinal.

Nidos germinales: se observaron varios nidos germinales localizados en distintas regiones de la corteza ovárica. Presentaron ovogonias voluminosas, de forma esférica, con un núcleo central voluminoso y citoplasma claro, dispuestas en forma lineal en el epitelio ovárico (Figura 12).

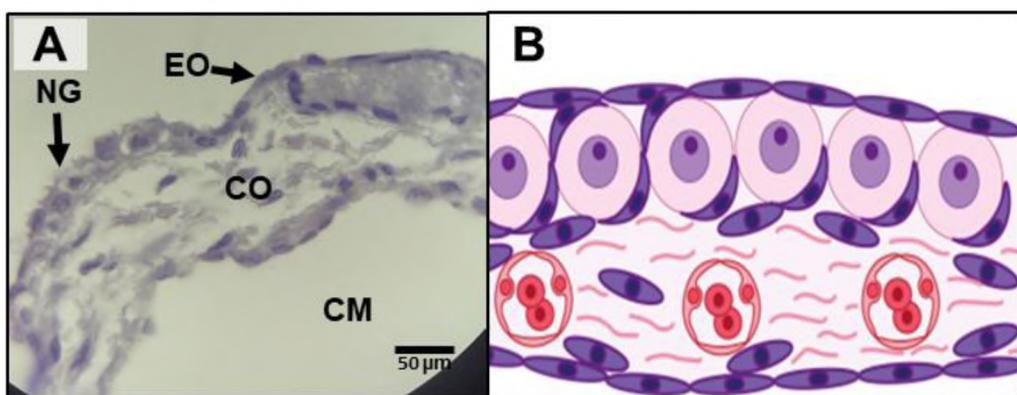


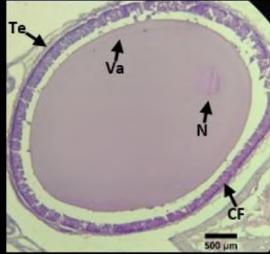
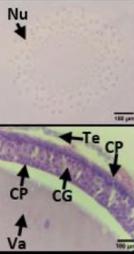
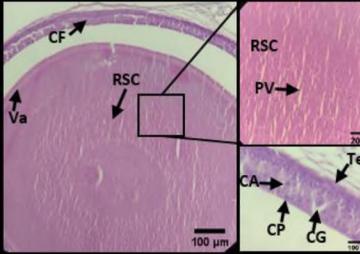
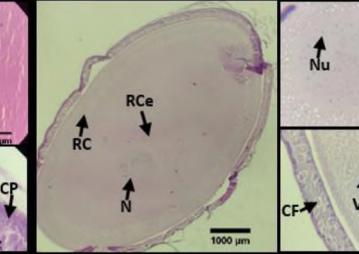
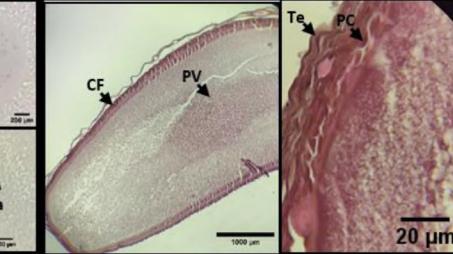
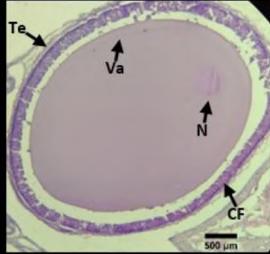
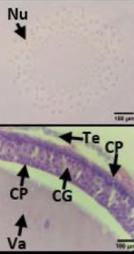
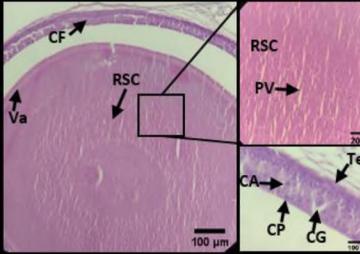
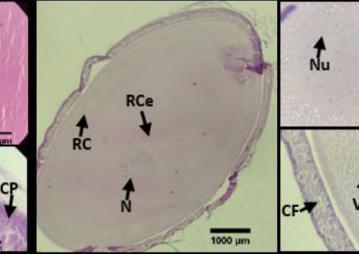
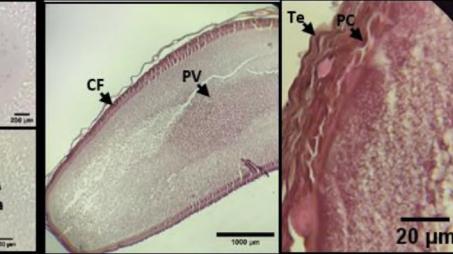
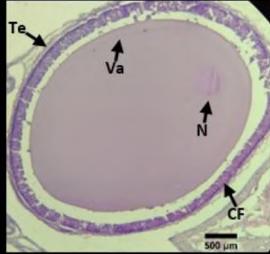
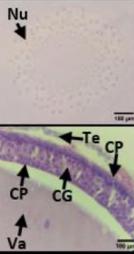
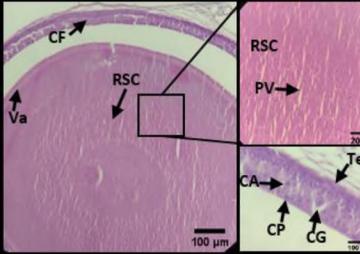
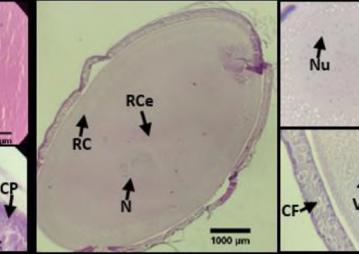
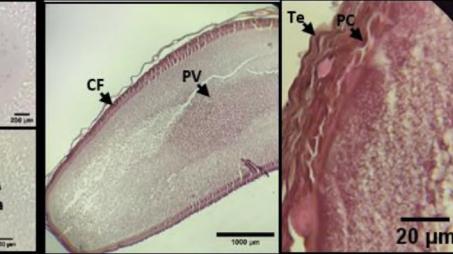
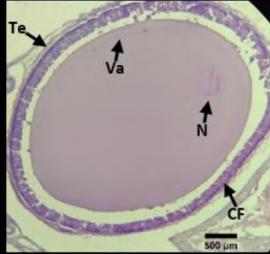
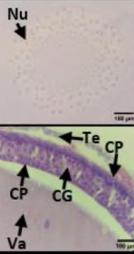
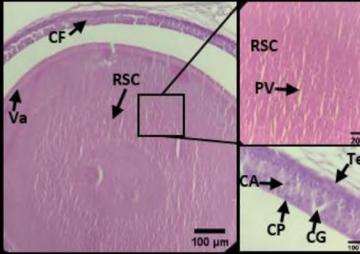
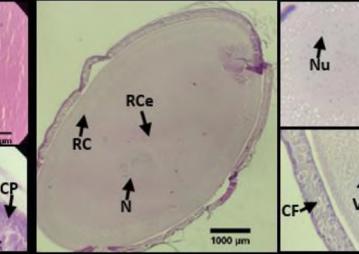
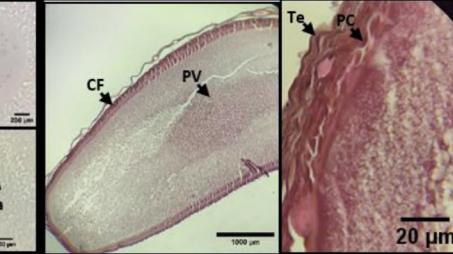
Figura 12. Nido germinal de *Atractus reticulatus*. (A) Detalle de la corteza ovárica donde se observa un nido germinal con ovogonias. (B) Esquema representativo de un nido germinal (Autor: Ayelen Vaca). Referencias: CM: cavidad medular. CO: corteza ovárica, EO: epitelio ovárico, NG: nido germinal. Referencias de esquemas: Anexo 1.

Considerando el desarrollo folicular, se reconocieron distintos estadios de previtelogénesis y vitelogénesis según lo propuesto por Uribe *et al.* (1995). Para el caso del estadio I se subdividió en a y b en función del desarrollo de la capa folicular. En la tabla 4 se describen las características de cada estadio, incluyendo esquemas e imágenes representativos de cada uno.

Tabla 4. Clasificación de folículos previtelogénicos y vitelogénicos por estadio de la foliculogénesis en *Atractus reticulatus*. (Modificado Uribe *et al.* 1995). Referencias: CA: célula apoptótica, CF: célula folicular, CG: célula grande, CI: célula intermedia, CP: célula pequeña, CPI: célula piriforme, N: núcleo, Nu: nucléolos. OV: ovocito, PC: célula plana, PV: placas vitelinas, RC: región cortical, RCe: región central, RSC: región subcortical, Te: teca, Va: vacuolas. Esquemas: Ayelen Vaca. Referencias de esquemas: Anexo 1.

CLASIFICACIÓN DE FOLÍCULOS				
PREVITELOGÉNESIS				
E. I (a)	E. I (b)	E. II	E. III	E. IV
<p>Ovocito Núcleo: posición central con un nucléolo. Citoplasma: homogéneo. Capa folicular Células foliculares dispersas formando una capa incompleta. Forma circular. Ø promedio: 60 µm</p>	<p>Ovocito Núcleo y citoplasma: <i>idem</i> anterior. Capa folicular Células foliculares formando una capa completa. Forma circular. Ø promedio: 100 µm</p>	<p>Ovocito Núcleo: posición excéntrica con varios nucléolos. Citoplasma: <i>idem</i> anterior. Capa folicular Células foliculares pequeñas e intermedias formando una capa estratificada. Células tecales dispersas. Forma circular. Ø promedio: 231.67 µm</p>	<p>Ovocito Núcleo: <i>idem</i> anterior. Citoplasma: homogéneo con vacuolas dispersas. Capa folicular Células foliculares pequeñas, formando una capa interna y externa, y células grandes formando una capa media. Dos capas de células tecales. Forma ovoide. Ancho promedio: 445 µm Largo promedio: 718 µm</p>	<p>Ovocito Núcleo: posición excéntrica de numerosos nucléolos. Citoplasma: <i>idem</i> anterior. Capa folicular Pluriestratificada y polimórfica con capa interna y externa de células pequeñas, y capa media de células intermedias y piriformes. Forma ovoide. Teca: <i>idem</i> anterior Ancho promedio: 626 µm Largo promedio: 1066 µm</p>

VITELOGÉNESIS

E. V	E. VI	E. VII	E. VIII
<p>Ovocito Núcleo: <i>idem</i> anterior. Citoplasma: vacuolas y algunas plaquetas de vitelo pequeñas en la región cortical.</p> <p>Capa folicular y tecal <i>idem</i> anterior. Forma ovoide.</p> <p>Ancho promedio: 1147 μm Largo promedio: 1781 μm</p>	<p>Ovocito Núcleo: <i>idem</i> anterior. Citoplasma: abundantes vacuolas en la región cortical y plaquetas vitelinas en la región subcortical.</p> <p>Capa folicular Células foliculares pequeñas, formando una capa interna y externa, y células grandes (con algunos con signos de apoptosis) formando una capa media.</p> <p>Teca: <i>idem</i> anterior Forma ovoide.</p> <p>Ancho promedio: 1589 μm Largo promedio: 2520 μm</p>	<p>Ovocito Núcleo: <i>idem</i> anterior. Citoplasma: abundantes vacuolas en todo el citoplasma y plaquetas vitelinas de diferentes tamaños en la región central.</p> <p>Capa folicular <i>idem</i> anterior Teca vascularizada.</p> <p>Forma ovoide.</p> <p>Ancho promedio: 2052 μm Largo promedio: 4002 μm</p>	<p>Ovocito Núcleo: <i>idem</i> anterior. Citoplasma: abundantes vacuolas y plaquetas vitelinas ocupando todo el citoplasma.</p> <p>Capa folicular Dos capas de células foliculares planas.</p> <p>Teca: <i>idem</i> anterior Forma ovoide.</p> <p>Ancho promedio: 3018 μm Largo promedio: 6903 μm</p>
    	    	    	    

El análisis histológico permitió equiparar los estadios de la foliculogénesis con sus variables morfométricas (diámetro promedio o el ancho y el largo promedio) lo que se utilizó para asignar los estadios de la foliculogénesis, en el análisis macroscópico. La tabla 5 muestra el número de folículos en cada estadio de previtelogénesis y vitelogénesis, observados en las hembras analizadas.

Tabla 5. Número de folículos en cada estadio de la foliculogénesis de hembras de las analizadas. Cabe destacar que el número de folículos registrados en algunos ejemplares no coincide con el número reportado para el mismo ejemplar en la tabla 4. (+): Representa un mayor número respecto a la tabla 4 debido a que el análisis histológico permitió reconocer folículos en E. I (no distinguibles con lupa estereoscópica). (-) representa un menor número respecto a la tabla 4 debido a que el análisis histológico permitió reconocer folículos atrésicos contabilizados, en el análisis macroscópico como folículos viables, (*): Representa la ausencia de datos por no contar con preparados histológicos para esos ejemplares.

UNNEC	Mes de captura	Previtelogénesis			Vitelogénesis				Total de folículos previtelogénicos	Total de folículos vitelogénicos
		E. I	E. II	E. IV	E. V	E. VI	E. VII	E. VIII		
9964	marzo	15	9	0	2	5	0	0	30(+)	7
9469	marzo	*	1	9	9	3	0	0	13	12
9337	marzo	*	3	4	4	2	0	0	21	6
10.000	mayo	*	2	6	9	4	0	0	11	13
9546	junio	25	10	2	4	7	6	0	38(+)	17
9545	junio	*	0	6	3	2	4	0	7	9
10169	agosto	*	0	3	5	4	5	0	7	14
9636	agosto	11	2	5	4	5	8	0	19(+)	17(-)
9635	agosto	*	0	4	3	5	6	0	4	14
10548	septiembre	*	2	6	11	3	5	0	12	19
10176	octubre	23	0	0	2	5	2	1	24(+)	10(-)
10323	diciembre	17	6	2	6	7	5	2	31(+)	20
9837	diciembre	13	1	0	2	2	7	0	16(+)	11

Si bien en los ejemplares de marzo (n=2), mayo (n=1), junio (n=1), agosto (n=1) y septiembre (n=1), el total de folículos observados coincide con el número obtenido mediante el análisis anatómico macroscópico, en los casos en los que se realizaron cortes histológicos se logró contabilizar los folículos pequeños en (E.I.), lo que explica el mayor número de folículos previtelogénicos registrado en los ejemplares de marzo (n=1), junio (n=1), agosto (n=1), octubre (n=1) y diciembre (n=2). Además, el análisis histológico también permitió identificar folículos atrésicos, lo que resultó en un

menor número de folículos vitelogénicos en comparación con el análisis macroscópico en dichos meses.

De marzo a junio las hembras presentaron mayor número de folículos previtelogénicos, en su mayoría en E.II y E.III. Sin embargo, la cantidad de folículos en estos estadios disminuyó en los meses siguientes. En hembras de junio, agosto y septiembre se observaron mayor cantidad de folículos vitelogénicos que en meses anteriores, predominando los E.V, E. VI y E.VII. Mientras que en los meses de octubre y diciembre se registraron folículos en vitelogenesis avanzada (E.VIII).

Folículos atrésicos

Todas las hembras analizadas presentaron folículos previtelogénicos y vitelogénicos en proceso de atresia que variaron en número (Tabla 6), tamaño (Tabla 7) y características morfológicas (Figura 13).

Tabla 6. Número de folículos atrésicos y número de cuerpos lúteos en hembras de *Atractus reticulatus*.

UNNEC	Mes de captura	Atresia		Cuerpos lúteos
		Previtelogénicos	Vitelogénicos	
9964	marzo	0	0	1
9546	junio	0	0	3
9636	agosto	1	1	3
10176	octubre	1	2	1
10323	diciembre	0	0	1
9837	diciembre	1	1	2

Tabla 7. Datos morfométricos de folículos atrésicos observados en hembras de *Atractus reticulatus*.

Atresia					
Folículos previtelogénicos			Folículos vitelogénicos		
Long. (mm)	Ancho (mm)	Vol. (mm ³)	long. (mm)	Ancho (mm)	Vol.(mm ³)
0,46	0,33	0,31	8,03	4,07	68,23
0,73	0,81	1,24	15,23	5,77	183,28
0,99	0,59	1,21	9,32	5,98	116,39
			9,07	5,23	99,03

Los folículos previtelogénicos en proceso de atresia se caracterizaron por presentar el ovocito con gran cantidad de vacuolas en el citoplasma y la capa folicular desorganizada (Figura 13 A).

Los folículos vitelogénicos atrésicos presentaron contorno irregular, desorganización del citoplasma (Figura 13 B). La capa folicular se observó engrosada, invadiendo el citoplasma del ovocito y fagocitando las plaquetas vitelinas observándose, además, la presencia de células semejantes a heterófilos (Figura 13 C y D).

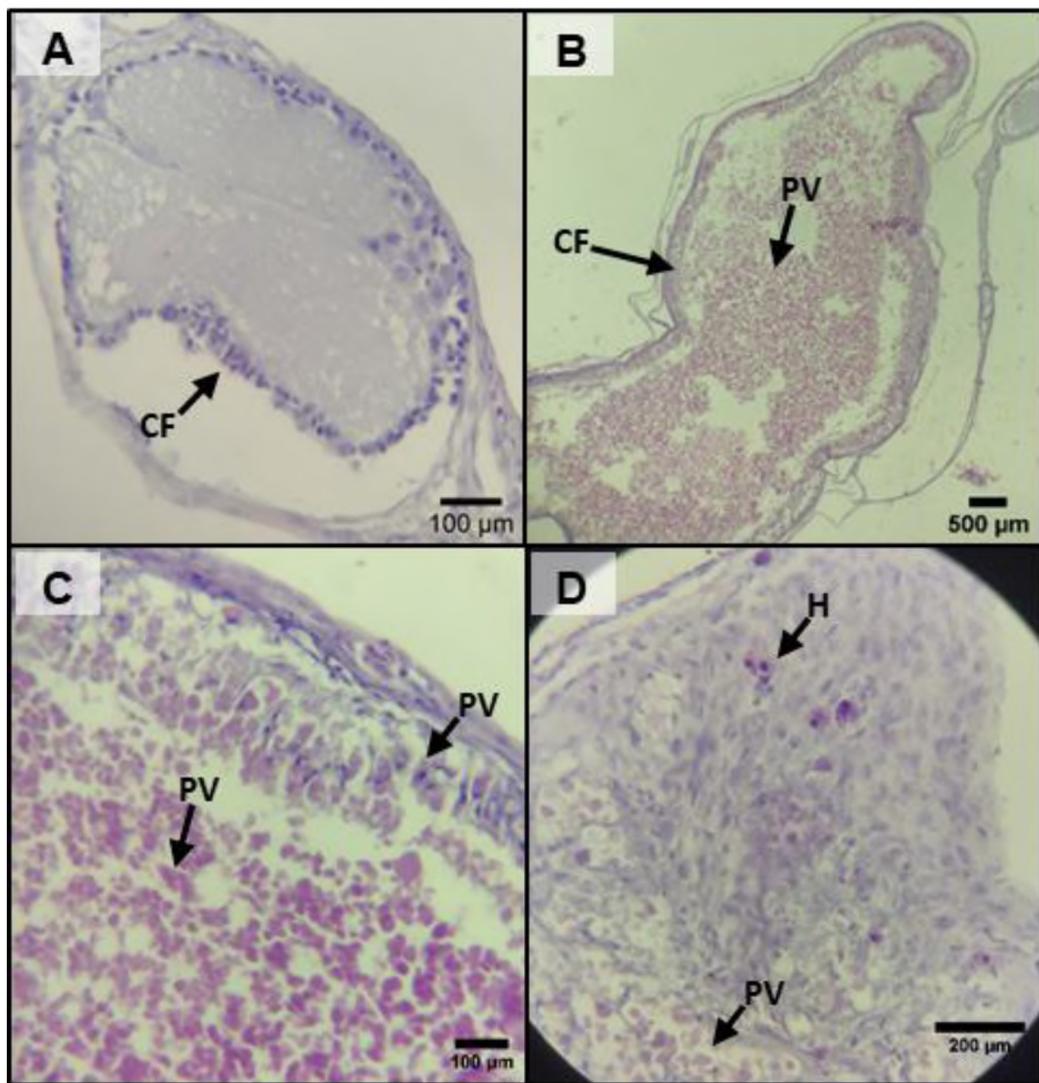


Figura 13. Folículos atrésicos de *Atractus reticulatus*. (A) Vista general de un folículo previtelogénico en proceso de atresia. (B) Vista general de un folículo vitelogénico en proceso de atresia. (C) Detalle de la región cortical de un folículo vitelogénico en proceso de atresia. (D) Detalle de capa folicular en un folículo vitelogénico en proceso de atresia. Referencias: CF: capa folicular, H: heterófilos, Ov: ovocito, PV: plaquetas vitelina.

Cuerpos lúteos

En las hembras analizadas se observaron cuerpos lúteos (Tabla 5) en distintas fases de la luteogénesis y/o luteólisis (Figura 14). Sin embargo, no pudo asignarse con precisión los estadios descritos por Uribe *et al.* (1995). A partir de las características observadas y considerando lo descripto por Martínez - Torres *et al.* (2003) se reconocieron distintas etapas del desarrollo (Figura 14).

El cuerpo lúteo se observó como una masa compacta de células con dos regiones; una región cortical formada por células derivadas de la teca y una región medular compuesta por células derivadas de las células foliculares (Figura 14 A). La región cortical se caracterizó por presentar un tejido sin una organización definida, vascularizado, con células ahuesadas similares de fibroblastos, con una matriz extracelular acidófila, que en algunas regiones se infiltró en la región medular (Figura 14 B). En la región medular se observaron dos tipos células; unas de núcleo bien basófilo y unas de núcleo claro,

las primeras más abundantes que las segundas (Figura 14 B). Esta estructura se observó en una de las hembras de diciembre y se corresponde con las características de una luteógenesis temprana.

En un hembra de marzo el cuerpo lúteo presentó una región medular con células luteínicas globosas, con citoplasma y núcleo claro y células pequeñas, de núcleo basófilo (Figura 14 C y D). Entre las células luteínicas se observaron, además, la presencia heterófilos (Figura 14 D). Rodeando a la región medular se observó una teca delgada. Esta estructura se corresponde con lo descrito para un cuerpo lúteo activo.

Por otra parte, se observaron cuerpos lúteos en distintas fases de degeneración o luteólisis. En una hembra de junio se observó un cuerpo lúteo con una cavidad central amplia rodeada por células acidófilas (Figura 14 E). El límite entre la teca y la región medular estuvo delimitado por una membrana acelular de contorno irregular. La teca se caracterizó por poseer varias capas de espesor, reconociéndose la teca externa, compacta, y la interna laxa y vascularizada. Entre las células de la teca se observaron algunas células voluminosas, fuertemente acidófilas, con un núcleo excéntrico identificadas como heterófilos (Figura 14 F). Las características observadas se corresponden con un cuerpo lúteo en luteólisis media.

En las hembras de junio y agosto, los cuerpos lúteos fueron de pequeño tamaño y se los observó incluidos en la pared ovárica, rodeados por el estroma (Figura 14 G). La teca presentó escasas células con forma de huso y células voluminosas con citoplasma granular y eosinófilo (Figura 14 H). En la región medular se observó una cavidad amplia con células voluminosas de citoplasma granular y una sustancia amorfa eosinófila. Las características observadas se corresponden a un cuerpo lúteo en luteólisis avanzada.

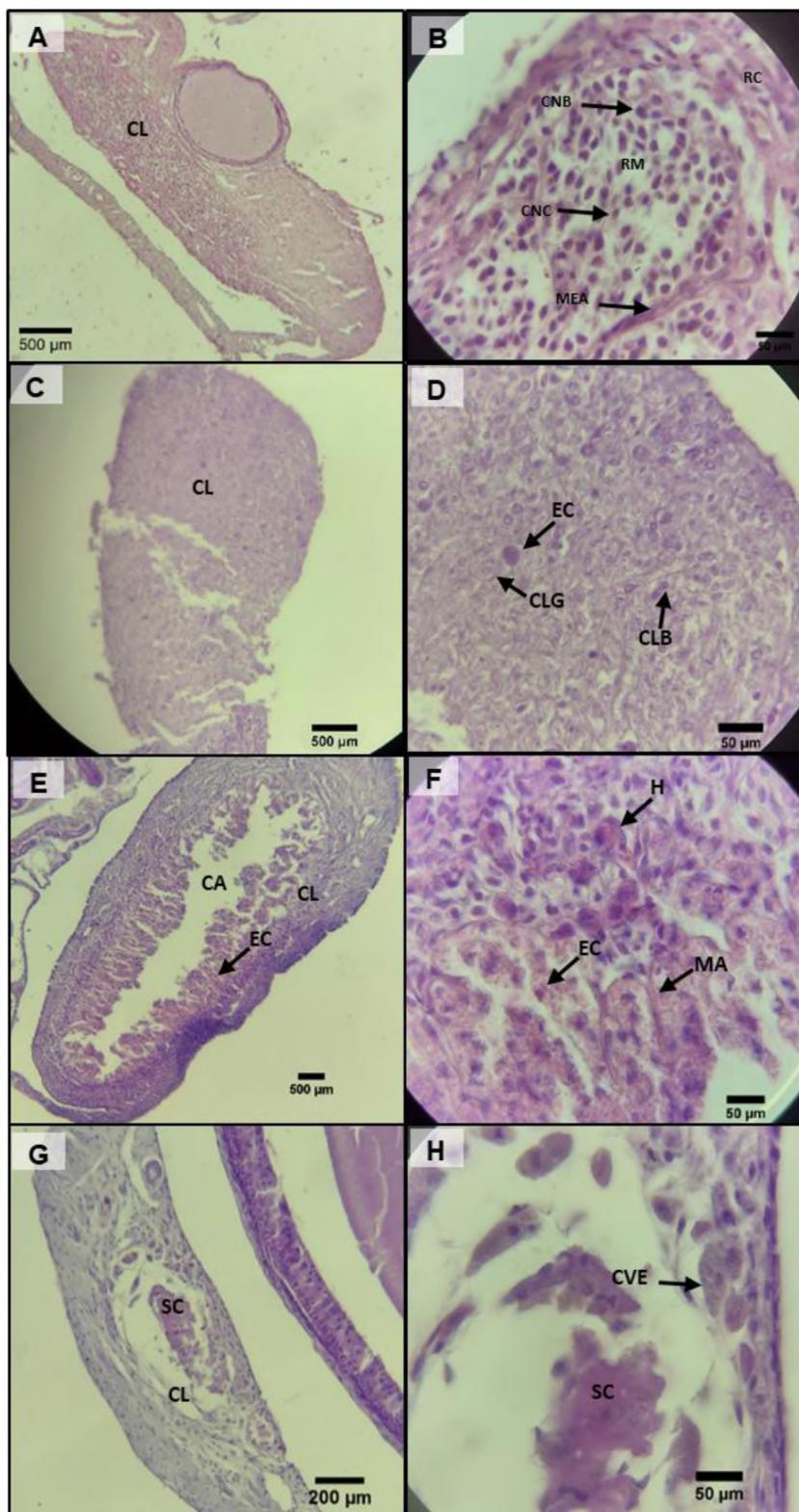


Figura 14. Vista general y detalles de cuerpos lúteos en distintas etapas del desarrollo observados en hembras de *Atractus reticulatus*. (A-B) Cuerpo lúteo en luteogénesis temprana. (C-D) Cuerpo lúteo activo. (E-F) Cuerpo lúteo en luteólisis media. (G-H) Cuerpo lúteo en luteólisis avanzada. Referencias: CA: Cavidad central, CL: Cuerpo lúteo, CLB: Células luteínicas de núcleo basófilo, CLG: Células luteínicas globosas, CNB: Células con núcleo basófilo, CNC: Células con núcleo claro, CVE: Célula voluminosa, EC: Células eosinófilas, H: heterófilo, MA: Membrana acelular, MEA: Matriz extracelular acidófila, MEC: Matriz extracelular, RC: Región cortical, RM: Región

medular, SC: Sustancia, Sustancia, amorfia, eosinófila

Oviducto

En el oviducto se reconocieron las siguientes regiones: infundíbulo, porción tubaria, útero y vagina (Figura 8). El infundíbulo se caracterizó por presentar una pared delgada, muy vascularizada y limitada por un epitelio cúbico simple (Figura 15 A). La porción tubaria presentó paredes gruesas con profundos pliegues de la mucosa limitados por un epitelio cubico o columnar de celular ciliadas (Figura 15 B y C). El útero se caracterizó por presentar una pared conspicua con un tejido conjuntivo con numerosas glándulas limitado por un epitelio cúbico ciliado (Figura 15 D, E y F). La vagina se caracterizó por poseer una pared altamente plegada, limitada por un epitelio columnar, un tejido conjuntivo aglandular y, a diferencia de otras regiones, una gruesa capa muscular (Figura 15 G y H.)

El análisis histológico y mediante MEB del oviducto, reveló la presencia de espermatozoides en los pliegues de la mucosa de la vagina, útero y/o porción tubaria de hembras capturadas en octubre y diciembre (Figura 15 B, C).

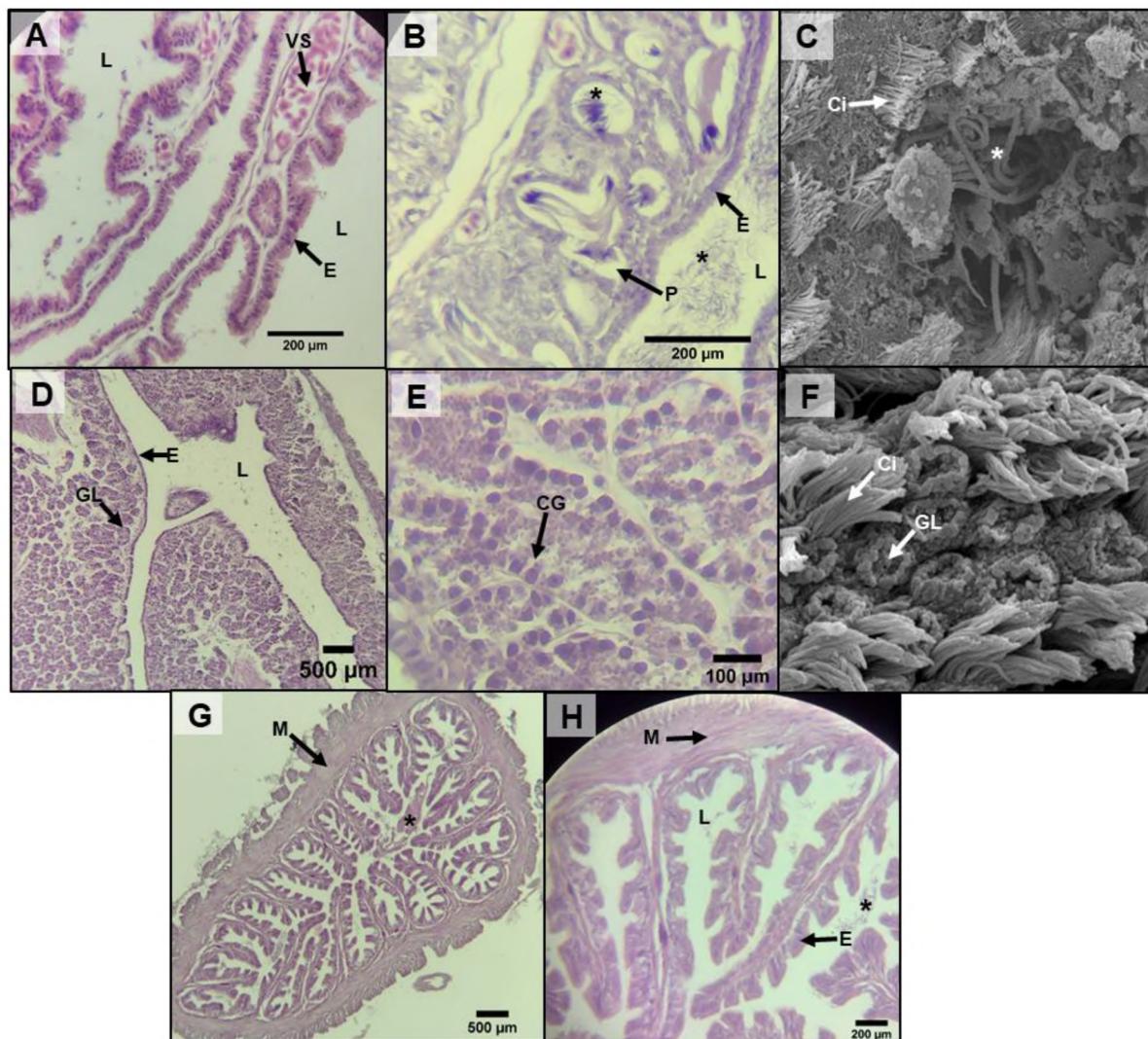


Figura 15. Regiones del oviducto observadas en hembras de *Atractus reticulatus*. (A) Infundíbulo. (B) Porción tubaria. (C) Detalle del epitelio de la porción tubaria observada con MEB. (D) Útero. (E) Detalle glándulas uterinas (F) Detalle del epitelio del útero observado con MEB. (G) Vagina. (H) Detalle de los pliegues de la mucosa de la vagina. Referencias: *: espermatozoides, CG: célula glandular, Ci: cílios, E: epitelio, GL: glándulas, L: lumen, M: músculo, P: pliegues, VS: vaso sanguíneo.

DISCUSIÓN

Las serpientes exhiben diversas estrategias reproductivas, reflejadas en la variabilidad de ciclos y modos reproductivos, el desarrollo y nutrición embrionaria, la fecundidad y frecuencia de las puestas, el dimorfismo sexual, el tamaño y/o edad a la primera reproducción y la inversión reproductiva, entre otros (Saint Girons 1982; Shine 2003; Bellini *et al.* 2019)

Ciclo gonadal masculino

Gualdrón-Durán *et al.* (2019) describen para *Atractus sp.* de los Andes Colombianos un ciclo continuo con espermiogénesis constante durante todo el año. Balestrín y Di-Bernardo (2005) reportan para una población de *Atractus reticulatus* del sur de Brasil un ciclo estacional, mientras que, Siquiera *et al.* (2022) describen para *Atractus zebrinus*, también del sur de Brasil, un ciclo continuo. Los datos de volumen testicular, altura del epitelio seminífero y los estadios de la espermatogénesis registrados en este trabajo para *Atractus reticulatus* muestran una espermatogénesis estacional extendida con un breve periodo de regresión en los meses más fríos. La recrudescencia gonadal se inicia en primavera evidenciada por el inicio de la actividad espermatogénica y el aumento de la altura del epitelio germinal y del volumen testicular. La máxima actividad espermatogenética se registró en los meses más cálidos, extendiéndose hasta finales del otoño. La presencia de espermatozoides en epidídimo y/o conducto deferente se registró durante todos los meses del año evidenciando almacenamiento de espermatozoides. Esto coincide con lo reportado por Balestrín y Di-Bernardo (2005) para la población del sur de Brasil. El almacenamiento de espermatozoides es considerado una sinapomorfía de los Squamata (Gribbins *et al.* 2006). Este mecanismo permite a los machos asegurar de una reserva espermática durante largos periodos, permitiendo que la cópula pueda realizarse en cualquier momento del año, independientemente de la actividad gonadal (Almeida-Santos y Salomão 1997). Esta característica es un patrón conservado y arraigado dentro del grupo (Braz y Almeida-Santos 2022).

Ciclo gonadal femenino

En las hembras reproductivas el ciclo ovárico comprende la foliculogénesis, donde los ovocitos en diplotene son reclutados para constituir folículos ováricos, la previtelogénesis donde ocurre un crecimiento gradual del ovocito, la vitelogénesis, que implica un crecimiento exponencial del ovocito por acumulación de plaquetas vitelinas y la culminación de la meiosis y la maduración del ovocito y finalmente la ovulación donde el ovocito es expulsado del ovario. (Ramírez-Pinilla *et al.* 2015).

Dentro de los reptiles el desarrollo folicular sigue un patrón conservado al igual que la estructura de la capa folicular, siendo característico la presencia de un epitelio polimórfico estratificado con una dinámica característica a lo largo de la foliculogénesis. Esta dinámica implica una sucesión de cambios en la organización del epitelio folicular durante la previtelogénesis y la vitelogénesis (Rodríguez-Gómez *et al.* 2018). Durante la vitelogénesis ocurren los cambios más significativos con la regresión de las células intermedias y piriformes. Motta *et al.* (1996) describen que en *Podarcis sicula* este proceso de regresión ocurre por eventos de muerte celular programada. Estos autores evidenciaron cambios nucleares, como la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN, característicos del proceso de apoptosis. Además, obtuvieron pruebas de que, durante la regresión, los constituyentes citoplasmáticos de las células intermedias y piriformes se transfieren al ovocito,

mientras que los restos de los núcleos son reciclados por las células pequeñas. En *Atractus reticulatus*, se observaron células con signos de apoptosis en el epitelio folicular de folículos vitelogénicos iniciales (E. VI). Esta observación coincide con lo reportado para *Podarcis sicula* y podría sugerir un mecanismo similar de regresión de la capa folicular para la especie en estudio.

Vitelogénesis

En los reptiles, la vitelogénesis es un evento fundamental para el desarrollo y maduración de los ovocitos y la posterior nutrición del embrión en especies ovíparas y vivíparas lecitotróficas (Guraya y Guraya 1989c). Este proceso está intrínsecamente regulado por hormonas hipofisarias y ováricas (Jones 2024) que actúan controlando el reclutamiento y selección de los ovocitos que madurarán en cada ciclo reproductivo (Etches y Petitte 1990). En las especies con reproducción continua este proceso ocurre durante todo el año, mientras que, en especies estacionales se evidencia en un determinado periodo del año, generalmente primavera-verano (Vitt y Caldwell 2014). Balestrin y Di-Bernardo (2005) describieron para *Atractus reticulatus* un ciclo estacional con vitelogénesis de agosto a diciembre. En este trabajo se registró la presencia de folículos vitelogénicos avanzados (E. VIII) en octubre y diciembre, mientras que en el resto de los meses, se registró folículos en fases más tempranas de la vitelogénesis (E. V a E.VII). Si bien se registran folículos vitelogénicos durante todo el año, la presencia de folículos en etapas avanzadas de la vitelogénesis evidencia los eventos de reclutamiento y selección folicular, que son los que conducen a la maduración final de los ovocitos que se ovularán en ese ciclo reproductivo.

Nidos germinales

La mayoría de los reptiles presentan ovulación poliautócrona, en la que ambos ovarios ovulan varios ovocitos simultáneamente en cada ciclo (Etches y Petitte 1990). Jones *et al.* (1982) describen que el número de ovocitos que maduran en cada ciclo de puesta está controlado por el número de nidos germinales, el número de folículos por nido germinal y el número de folículos que completan la vitelogénesis. El número de nidos germinales varía entre especies, pero tiende a ser constante dentro de géneros y familias (Guraya y Guraya 1989b). Dentro de los lagartos existe una gran variación interespecífica en el número de nidos germinales, independientemente del tipo de reproducción (Jones *et al.* op. cit.). Las especies poliautocrónicas con alta fecundidad generalmente presentan dos nidos germinales por ovario, mientras que las que producen puestas más pequeñas poseen un solo nido germinal. La presencia de varios nidos germinales por ovario ha sido asociada con la forma alargada de las góndadas de algunas especies de lagartos y de las serpientes (Guraya y Guraya 1989b), sin embargo, existen pocos estudios que describan nidos germinales en este último taxón. Se ha reportado para *Natrix rhombifera* (Betz 1963) y *Naja naja* (Lance y Loft 1978) la ocurrencia de múltiples nidos germinales dispersos en pequeños parches irregulares en el epitelio del estroma ovárico. En este trabajo se reporta, para *Atractus reticulatus*, el registro de varios nidos germinales, principalmente localizados en el extremo anterior del ovario. Esto estaría relacionado con una alta fecundidad, en relación al número de crías por puesta y la posibilidad de múltiples posturas a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. Además, pone en evidencia la capacidad de las hembras de mantener la actividad proliferativa de la línea germinal durante la etapa adulta. Como ya ha sido reportado por Guraya (op. cit.) esta es una característica que diferencia a los reptiles de las aves, las cuales no presentan nidos germinales en la etapa adulta.

Atresia folicular

La atresia folicular es un proceso característico de la dinámica folicular que ocurre en todos los vertebrados, e incluye procesos complejos de muerte celular programada (apoptosis), y la reabsorción de material celular por las propias células (autofagia) y por otras células (heterofagia) (Dervas *et al.* 2024). Este proceso está regulado hormonalmente (Guraya y Guraya 1989a), y puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular, desde folículos primordiales hasta folículos maduros (Guraya, 2013), como ha sido descrito para numerosas especies de reptiles (Guraya 1965; Trauth 1978; Gouder *et al.* 1979; Moodley *et al.* 2007; da Silva *et al.* 2018; García-Valdez *et al.* 2019) y observado en este trabajo para *Atractus reticulatus*.

Dervas *et al.* (2024) caracterizaron para *Chamaeleo calyptratus* tres etapas de atresia folicular (temprana, media y tardía) para folículos previtelogénicos y vitelogénicos. Durante la atresia de folículos previtelogénicos es característica la vacuolización del citoplasma de ovocito y una proliferación irregular de las células foliculares. En los folículos vitelogénicos es característico el engrosamiento de la capa folicular, la invasión de las células foliculares al citoplasma del ovocito, la fagocitosis de las plaquetas vitelinas y la presencia de macrófagos, particularmente en la etapa media y tardía. Lo observado en *Atractus reticulatus* se corresponde con estos eventos descritos. Por otro lado, en la especie en estudio se registró la presencia de heterófilos. Nili *et al.* (1996) observó que en *Gallus gallus domesticus* los heterófilos se infiltran en los folículos atrésicos y participan en la reabsorción de vitelo, demostrando que el sistema inmune desempeña un papel clave en la atresia folicular. Por otro lado, es importante mencionar que se ha asignado diferentes funciones a la atresia folicular en los reptiles, como la regulación del desarrollo folicular, el tamaño de la puesta y la regresión de las estructuras ováricas (Hsueh *et al.* 1994; Kaipia y Hsueh 1997).

Cuerpos lúteos

El cuerpo lúteo, también llamado cuerpo postovulatorio, es una estructura transitoria que se forma en los ovarios luego de una ovulación a partir de células foliculares y células tecales. Estas células proliferan, hipertrofian y luteinizan originando una estructura que se integra a la fisiología hormonal con la secreción de estrógenos y progesterona (Fox y Guillette 1987). Las secreciones del cuerpo lúteo son esenciales en la fisiología de los oviductos y aseguran los procesos postovulatorios como el depósito de secreciones que rodearán a los ovocitos o embriones en desarrollo, o el mantenimiento de la gestación (Highfill y Mead 1975).

La duración de la retención de huevos o gestación está parcialmente controlada por la actividad esteroidogénica del cuerpo lúteo (Xavier 1987; Shine y Guillette 1988) y la oviposición ha sido relacionada con la degradación del cuerpo lúteo (luteólisis) y consecuente disminución de progesterona (Jones y Guillette 1982).

El cuerpo lúteo tiene una persistencia funcional, proporcionando una condición primaria para la retención de huevos, regulando la actividad ovárica y el desarrollo folicular e inhibiendo la síntesis de vitelogenina (Callard *et al.* 1992; Jones 2011). El periodo de actividad y el periodo de degeneración del cuerpo lúteo varían considerablemente entre especies. El caimán americano *Alligator mississippiensis*, retiene los huevos en el oviducto durante aproximadamente tres semanas, periodo en el cual el cuerpo lúteo permanece activo y el proceso de luteólisis puede extenderse hasta un año

después de la ovoposición (Guillette *et al.* 1995). En la mayoría de los reptiles escamados ovíparos, el cuerpo lúteo mantiene su actividad endocrina durante el periodo de retención embrionaria (Jones y Guillette 1982) y su regresión puede ser variable entre especies. García-Valdez *et al.* (2019) registraron para *Salvator merianae* cuerpos lúteos en regresión a los 41 días de la oviposición siendo su persistencia muy prolongada, en comparación con otros congéneres.

En *Atractus reticulatus* se observaron cuerpos lúteos, en etapas de luteogénesis o luteolisis, en todas las hembras analizadas. El cuerpo lúteo en luteogénesis se observó en una hembra capturada en diciembre que presentó el oviducto distendido y folículos vitelogénicos en E. VII en el ovario, lo que sugiere una reciente oviposición. Por otro lado, se observó un cuerpo lúteo con características de actividad en una hembra de marzo que presentó folículos vitelogénicos iniciales (E. V). El registro de cuerpos lúteos activos en diciembre y marzo muestran que la actividad reproductiva de las hembras (gravidez y ovoposición) se extiende hasta finales del verano, coincidiendo con lo reportado por Balestrin y Di-Bernardo (2005) para una población del sur de Brasil. Además, se observó luteólisis media en una hembra del mes de junio lo que permite suponer la persistencia del cuerpo lúteo luego de la ovoposición, como ha sido reportado por otros autores. No hay muchos trabajos que estudien la dinámica del cuerpo lúteo en reptiles, siendo un aspecto interesante de profundizar ya que permitiría conocer la regulación intrínseca de la dinámica ovárica, particularmente la vitelogénesis.

Oviducto

El oviducto en los reptiles tiene diferentes funciones como transportar el ovocito, ser sitio de fertilización, secretar la albumina y las membranas que componen la cáscara del huevo, ser sitio de retención de huevos o gestación de embriones en especies vivíparas contribuyendo con la formación de una placenta y almacenar espermatozoides (Stewart 1993; Girling 2002; Sever y Hamlett 2002).

El almacenamiento de espermatozoides es una estrategia comúnmente observada en serpientes y lagartijas y ocurre principalmente en pliegues de la mucosa el útero y porción tubaria. Esto es una condición necesaria en especies que tienen ciclos disociados (postnupcial) donde las hembras retienen los espermatozoides por un periodo prolongado de tiempo que puede extenderse por varios meses (Crichton 2000). Almeida-Santos *et al.* (2004) demostraron que las hembras de *Crotalus durissus terrificus* almacenan espermatozoides en los úteros durante el otoño e invierno, y la fertilización tiene lugar en la primavera. Bassi *et al.* (2020) observaron espermatozoides en receptáculos del oviducto durante todas las estaciones del año en *Micrurus corallinus*, y en primavera, verano y otoño en *Micrurus frontalis*.

En especies con ciclos asociados el almacenamiento no es una condición necesaria ya que la fertilización ocurre luego de un corto periodo de tiempo después de la cópula. En *Atracus reticulatus* se observó la presencia de espermatozoides en porción tubaria, útero y vagina en hembras capturadas en los meses de octubre y diciembre. Para las hembras de esta especie no se considera el almacenamiento de espermatozoides como una estrategia dentro de su modo reproductivo, sin embargo, este dato es importante ya que permite estimar el momento en el cual ocurrirían los apareamientos.

¿Sincronía reproductiva en *Atractus reticulatus*?

Existen dos componentes clave en la reproducción que son fundamentales para evaluar los ciclos reproductivos: el momento en que ocurre la gametogénesis y el apareamiento. En los escamados, los ciclos reproductivos estacionales han sido descritos como prenupciales y postnupciales. En los ciclos prenupciales, la gametogénesis ocurre inmediatamente antes del apareamiento, mientras que en los ciclos postnupciales, los espermatozoides se producen durante el verano y permanecen almacenados en el conducto deferente hasta la cópula. Sin embargo, estos ciclos representan los extremos de una amplia gama de patrones reproductivos que pueden presentar características intermedias (Aldridge *et al.* 2020).

En *Atractus reticulatus*, se observa una sincronía parcial entre los ciclos reproductivos femenino y masculino. Al inicio de la vitelogénesis, los machos se encuentran en regresión testicular, mientras que al final de la vitelogénesis, la actividad espermatozoidal alcanza su punto máximo y se mantiene hasta finales del otoño. Los machos presentan espermatozoides en los túbulos deferentes durante todo el año, indicando almacenamiento de esperma. En las hembras, la presencia de espermatozoides en el oviducto fue observada en octubre y diciembre, coincidiendo con la presencia de folículos en estado avanzado de vitelogénesis, lo que sugiere que la cópula ocurre en este período. En este sentido, las hembras presentan características que se ajustan a un tipo de ciclo prenupcial, mientras que los machos muestran ciertas características propias de un ciclo postnupcial, como el almacenamiento de esperma.

Tanto los ciclos prenupciales como los postnupciales presentan beneficios y costos. Por ejemplo, en las especies con espermatozoides prenupciales, es poco probable que agoten sus reservas de esperma durante el período de apareamiento. En cambio, en las especies postnupciales, las reservas de esperma pueden agotarse al inicio de este período, en primavera (Aldridge *et al.* 2020). En *A. reticulatus*, producto del solapamiento parcial de los ciclos gonadales masculino y femenino, junto con el almacenamiento de espermatozoides en los machos, minimiza los costos y maximiza los beneficios de ambos ciclos (prenupciales y postnupciales). En este sentido, los espermatozoides almacenados en ciclo anterior, podrían utilizarse al comienzo del período de apareamiento (primavera) y los nuevos espermatozoides, producidos en verano, mantendrían las reservas hasta el final de la temporada de apareamiento (verano).

Conclusión

El presente estudio describe el ciclo reproductivo de *Atractus reticulatus*, caracterizado por su estacionalidad y la sincronía parcial entre los ciclos gonadales masculinos y femeninos. Se identificó una espermatozoides estacional prolongada, con almacenamiento de espermatozoides durante todo el año, lo que permitiría independizar la cópula de la actividad gonadal. En las hembras, la presencia de espermatozoides en el oviducto en octubre y diciembre sugiere que la cópula ocurre en este período, coincidiendo con la vitelogénesis avanzada.

Los resultados de este estudio indican, además, que *Atractus reticulatus* presenta un ciclo reproductivo mixto, que combina características prenupciales y postnupciales. Mientras que las hembras exhiben un patrón prenupcial, con gametogénesis previa al apareamiento, los machos

muestran actividad gonadal postnupcial, evidenciado por el almacenamiento de espermatozoides durante todo el año. Esta estrategia mixta podría representar una ventaja adaptativa en relación a su modo de vida semifosorial, permitiendo a hembras y machos contar con disponibilidad de espermatozoides durante todo el periodo de apareamiento.

Finalmente, la variabilidad de los ciclos gonadales reportada para el género *Atractus* sugiere que factores ambientales, como la temperatura y las precipitaciones, podrían desempeñar un papel clave en la regulación de la reproducción en este taxón. Esto pone de manifiesto la diversidad de estrategias y plasticidad reproductiva dentro los reptiles.

Consideraciones finales

- *Atractus reticulatus* presenta actividad reproductiva estacional de primavera-verano, pudiendo los machos extender la espermatoformación hasta finales del otoño.
- Los machos presentan almacenamiento de espermatozoides durante todo el año.
- La cópula ocurre entre octubre y diciembre, coincidiendo con la vitelogénesis avanzada y maduración de ovocitos.
- La presencia de cuerpos lúteos activos de diciembre a marzo coincide con el período de retención embrionaria observado para una población de Brasil.
- Los cuerpos lúteos mantendrían su actividad meses después de la oviposición, inhibiendo la vitelogénesis y regulando la actividad ovárica.
- Los ciclos reproductivos de *Atractus reticulatus* muestran una sincronía parcial entre sexos, combinando características del tipo prenupcial en las hembras y postnupcial en los machos.

Bibliografía

- Almeida-Santos, S. M., Laporta-Ferreira, I. L., Antoniazzi, M. M., & Jared, C. (2004). Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 139(2), 169-174.
- Almeida-Santos, S.M. y Salomão, M.G. 1997. Long-term sperm storage in the female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese Journal of Herpetology*, 17:46-52.
- Almeida-Santos, S.M. y Salomão, M.G. 2004. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Molecular and Integrative Physiology*, 139(2), 169-174.
- Arzamendia, V., y Giraudo, A. R. (2009). Influence of large South American rivers of the Plata Basin on distributional patterns of tropical snakes: a panbiogeographical analysis. *Journal of Biogeography*, 36(9), 1739–1749. doi:10.1111/j.1365-2699.2009.02116.x
- Balestrin, R.L., y Di-Bernardo, M. 2005. Reproductive biology of *Atractus reticulatus* (Boulenger, 1885) (Serpentes, Colubridae) in southern Brazil. *The Herpetological Journal*, 15(3), 195-199.
- Bassi, E. A., Coeti, R. Z., & de Almeida-Santos, S. M. (2020). Reproductive cycle and sperm storage of female coral snakes, *Micrurus corallinus* and *Micrurus frontalis*. *Amphibia-Reptilia*, 41(1), 13-27.
- Bellini, G. P., Arzamendia, V., y Giraudo, A. R. (2019). Reproductive life history of snakes in temperate regions: what are the differences between oviparous and viviparous species?. *Amphibia-Reptilia*, 40(3), 291-303. <https://doi.org/10.1163/15685381-20181076>
- Betz, T. W. (1963). The ovarian histology of the diamond-backed water snake, *Natrix rhombifera* during the reproductive cycle. *Journal of Morphology*, 113(2), 245-260.
doi:10.1002/jez.b.22625
- Blackburn, D. G., y Lorenz, R. L. (2003). Placentation in garter snakes. III. Transmission EM of the omphalallantoic placenta of *Thamnophis radix* and *T. sirtalis*. *Journal of Morphology*, 256(2), 187–204. doi:10.1002/jmor.10084
- Braz, H. B., y Almeida-Santos, S. M. (2022). The evolution of sperm-storage location in Squamata with particular reference to snakes. *Origin Early Evol Hist Snakes*, 90, 389.
- Callard, I. P., Fileti, L. A., Perez, L. E., Sorbera, L. A., Giannoukos, G., Klosterman, L. L., ... & McCracken, J. A. (1992). Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *American Zoologist*, 32(2), 264-275.

Cardozo, G., y Chiaraviglio, M. (2008). Landscape changes influence the reproductive behaviour of a key 'capital breeder' snake (*Boa constrictor occidentalis*) in the Gran Chaco region, Argentina. *Biological conservation*, 141(12), 3050-3058.

Crews, D. 1984. Gamete production, sex hormone secretion, and mating behavior uncouple. *Hormones and Behavior*, 18:22-28.

Crichton, E. G. (2000). Sperm storage and fertilization. In *Reproductive biology of bats* (pp. 295-320). Academic press.

Cruz, F. B., Teisaire, E. y Nieto, L. 1997. Reproductive biology of the lizard *Tropidurus spinulosus* in the Chaco of Salta, Argentina. *Stud. Neotrop. Fauna y Environment* 32:28-32.

da Silva, D., Cassel, M., Mehanna, M., Ferreira, A., & Dolder, M. A. H. (2018). Follicular development and reproductive characteristics in four species of Brazilian *Tropidurus* lizards. *Zoological science*, 35(6), 553-563.

de Paula Orofino, R., Marques, O. A., y Sazima, I. (2010). Reproductive biology of the Brazilian smooth snake *Pseudoboa nigra* (Serpentes: Dipsadidae). *Zoologia (Curitiba)*, 27(1), 13-18.1

Dervas, A. (2024). Morphological evidence for the physiological nature of follicular atresia in reptiles. *Journal of Comparative Physiology*, 192(3), 245-256

Dunham, A.E. 1983. Realized niche overlap, resource abundance and intensity of interespecific competition. In: Huey R.D., Pianka E.R., and Schoener T.W. (Eds), *Lizards Ecology*. Pp 261-280. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Etches, R. J., y Petitte, J. N. (1990). Reptilian and avian follicular hierarchies: Models for the study of ovarian development. *Journal of Experimental Zoology*, 256(S4), 112-122. doi:10.1002/jez.1402560419

FITCH, H. S. 1982. Reproductive cycles in tropical reptiles. *Occasional Papers of the Museum of Natural History of Kansas* 96:1-53

Fox, S. L., & Guillette Jr, L. J. (1987). Luteal morphology, atresia, and plasma progesterone concentrations during the reproductive cycle of two oviparous lizards, *Crotaphytus collaris* and *Eumeces obsoletus*. *American Journal of Anatomy*, 179(4), 324-332.

García-Valdez, M. V., Sánchez-Loria, O. L., & Chamut, S. N. (2019). Oogenesis and ovarian histology of the South American lizard *Salvator merianae*. *Rev. Agron. Noroeste Argent*, 39(2), 141-154.

Gemmell, R. T. (1995). A comparative study of the corpus luteum. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(3), 303-312.

Giraudo, A. R., Arzamendia, V., Bellini, G. P., Bessa, C. A., & Costanzo, M. B. (2014). Ecología de una gran serpiente sudamericana, *Hydrodynastes gigas* (Serpentes: Dipsadidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1206-1216.

Giraudo, A.R., Arzamendia, V., Bellini, G.P. et al. 2012. Categorización del estado de conservación de las Serpientes de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26 (Supl. 1):303-326.

- Girling, J. E. (2002). The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. *Journal of Experimental Zoology*, 293(2), 141-170.
- Gouder, B. Y. M., Nadkarni, V. B., & Rao, M. A. (1979). Histological and histochemical studies on follicular atresia in the ovary of the lizard, *Calotes versicolor*. *Journal of Herpetology*, 451-456.
- Gribbins, K. M. (2011). Reptilian spermatogenesis: A histological and ultrastructural perspective. *Spermatogenesis*, 1(3), 250–260. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.16902>
- Gribbins, K.M., Elsey, R.M. y Gist, D.H. 2006. Cytological evaluation of the germ cell development strategy within the testis of the *American alligator*, *Alligator mississippiensis*. *Acta Zoologica* (Stockholm) 87:59-69.
- Gualdrón-Durán, L. E., Calvo-Castellanos, M. F., y Ramírez-Pinilla, M. P. 2019. Annual reproductive activity and morphology of the reproductive system of an Andean population of *Atractus* (Serpentes, Colubridae). *South American Journal of Herpetology*, 14(1):58-70.
- Guillette, LJ, Woodward, AR, You-Xiang, Q., Cox, MC, Matter, JM y Gross, TS (1995). Formación y regresión del cuerpo lúteo del caimán americano (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Morphology*, 224(1), 97–110. doi:10.1002/jmor.1052240111
- Guraya, S. S. (1965). A histochemical study of follicular atresia in the snake ovary. *Journal of Morphology*, 117(2), 151-169.
- Guraya, S. S. (2013). Ovarian follicles in reptiles and birds (Vol. 24). Springer Science & Business Media.
- Guraya, S. S., & Guraya, S. S. (1989a). Atresia folicular. Folículos ováricos en reptiles y aves, 201-238.
- Guraya, S. S., y Guraya, S. S. (1989b). Germinal beds, oogenesis and folliculogenesis. Ovarian follicles in reptiles and birds, 6-21.
- Guraya, S. S., y Guraya, S. S. (1989c). Vitellogenesis. *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*, 63-95.
- Hartmann, M., Marques, O., & Almeida-Santos, S. (2004). Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). *Amphibia-Reptilia*, 25(1), 77-85.
- Highfill, D.R. y Mead, R.A. (1975). Function of corpora lutea of pregnancy in the viviparous garter snake. *General and Comparative Endocrinology*, 27(3), 401-407.
- Hsueh, A. J., Billig, H., y Tsafirri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews*, 15(6), 707-724.
- Saint Girons H. (1982). Ciclos reproductivos de serpientes macho y sus relaciones con el clima y los ciclos reproductivos femeninos. *Herpetologica*, 38(1), 5–16. <http://www.jstor.org/stable/3892357>
- Ibargüengoytía, N.R. 2008. Estrategias reproductivas en reptiles. *Herpetología de Chile*, 391-425.
- Jones R.E., y Guillette J. (1982). Hormonal control of oviposition and parturition in lizards. *Herpetologica* 38: 80-93

Jones, R. E., Swain, T., Guillette, L. J., y Fitzgerald, K. T. (1982). La anatomía comparada de los ovarios de los lagartos, con énfasis en el número de lechos germinales. *Revista de Herpetología*, 16(3), 240–252. <https://doi.org/10.2307/1563717>

Jones, R. E., y Guillette, L. J. (2010). *Reproductive biology and phylogeny of lizards and tuatara*. CRC Press.

Jones, S. M. (2011). Hormonal Regulation of Ovarian Function in Reptiles. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, 89–115. doi:10.1016/b978-0-12-374930-7.10004-4

Jones, S. M. (2024). Hormonal regulation of ovarian function in reptiles. In *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (Second Edition): Volume 3: Reptiles (pp. 89–114). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16022-6.00001-9>

Kaipia, A., y Hsueh, A. J. W. (1997). REGULATION OF OVARIAN FOLLICLE ATRESIA. *Annual Review of Physiology*, 59(1), 349–363. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.349

Lance, V., y Loftis, B. (1978). Studies on the annual reproductive cycle of the female cobra, *Naja naja*. IV. Ovarian histology. *Journal of Morphology*, 157(2), 161-179.

Leyton, V.C., Veloso, A. y Bustos-Obregón, E. 1982. Modalidad reproductiva y actividad cíclica gonadal en lagartos iguánidos de distintos pisos altitudinales del interior de Arica (lat. 18°10'S). En: Veloso A. y Bustos-Obregón E. (eds.), *El hombre y los ecosistemas de montaña 1: La vegetación y los vertebrados ectodérmicos del transecto Arica-Lago Chungará*, pp. 293-315. Contribución sistemática al conocimiento de la herpetofauna del extremo norte de Chile. Oficina Regional de Ciencias y Tecnología de la UNESCO para América Latina y el Caribe, Montevideo, Uruguay.

Loebens, L., Theis, T. F., Almeida-Santos, S. M., y Cechin, S. Z. (2022). Reproductive biology, sperm storage, and sexual maturity of *Thamnodynastes strigatus* (Serpentes: Dipsadidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94, e20211087.

López, M. S., y Giraudo, A. R. (2008). Ecology of the snake *Philodryas patagoniensis* (Serpentes, Colubridae) from northeast Argentina. *Journal of Herpetology*, 42(3), 474-480.

López, S.M., Giraudo, A.R., Arzamendia, V. y Chiaraviglio. M. 2009. Biología reproductiva de la serpiente semiacuática *Liophis semiaureus* (Serpentes, Colubridae) en el nordeste de Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82:233-244.

Martínez-Torres, M., Hernández-Caballero, M. E., Alvarez-Rodriguez, C., Luis-Díaz, J. A., & Ortíz-López, G. (2003). Luteal development and progesterone levels during pregnancy of the viviparous temperate lizard *Barisia imbricata imbricata* (Reptilia: Anguidae). *General and comparative endocrinology*, 132(1), 55-65.

Mathies, T. 2011. *Reproductive Cycles of Tropical Snakes*. En: Aldridge R.D. y Server D.M. (eds.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*, pp. 511-550. Science Publishers, Enfield, USA.

Mayhew, W.W. y Wright, S.J. 1970. Seasonal changes in testicular histology of three species of the lizard genus *Uma*. *Journal of Morphology*, 130(2):163-185.

Mendoza Galeano, M., Núñez, K., Zárate, G., Ortiz, F y Weiler, A. 2020. Ampliación de la distribución de *Atractus reticulatus* (Boulenger, 1885) (Reptilia: Serpentes: Dipsadidae) en Paraguay. Cuadernos de Herpetología, 34(1):131-133.

Moodley, G. K., & Van Wyk, J. H. (2007). Folliculogenesis and ovarian histology of the oviparous gecko, *Hemidactylus mabouia* (Sauria: Gekkonidae). African Journal of Herpetology, 56(2), 115-135.

Motta, C. M., Filosa, S., y Andreuccetti, P. (1996). Regression of the epithelium in late previtellogenic follicles of *Podarcis sicula*: A case of apoptosis. The Journal of Experimental Zoology, 276(3), 233–241. doi:10.1002/(sici)1097-010x(19961015)276:3<233::aid-jez7>3.0.co;2-o

Nili, H. y Kelly, W. R. (1996). Forma y función de las lagunas en el ovario de la gallina ponedora. El registro anatómico, 244(2), 165–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199602\)244:2<165::AID-AR4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199602)244:2<165::AID-AR4>3.0.CO;2-0)

Nogueira C.C., Argôlo A.J.S., Arzamendia V., Azevedo J.A., Barbo F.E., Bérnuls R.S., Martins M.C.M. 2019. Atlas of Brazilia snakes: verified point-locality maps to mitigate the Wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. South American Journal of Herpetology 14 (Special Issue 1): 1-274. <http://doi.org/10.2994/SAJH-D-19-00120.1>

Pinto, R.R., y Fernandes, R. 2004. Reproductive biology and diet of *Liophis poecilogyrus poecilogyrus* (Serpentes, Colubridae) from southeastern Brazil. Phylomedusa: Journal of Herpetology, 3(1): 9-14.

Pizzatto, L. 2005. Body size, reproductive biology and abundance of the rare pseudoboini snake's genera *Clelia* and *Boiruna* (Serpentes, Colubridae) in Brazil. Phylomedusa: Journal of Herpetology, 4(2): 111-122.

Pizzatto, L. y Marques, O.A. 2006. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. Journal of Herpetology. 16:353-362.

Pough, F. H., Andrews, R. M., Cadle, J. E., Crump, M. L., Savitsky, A. H., y Kentwood, D. W. (2004). Herpetology as a field of study. Herpetology, 3rd edn. Prentice Hall, New York, 3-20.

Ramírez-Pinilla, M. P., de Pérez, G. R., y Alvarado-Ramírez, C. (2015). Oogenesis and the ovarian cycle. *Reproductive biology and phylogeny of lizards and tuatara*, 213-252.

Rebelato, M.M., Pontes, G.M., y Tozetti, A.M. 2016. Reproductive biology of *Thamnodynastes hypoconia* (Serpentes: Dipsadidae) in Brazilian subtemperate wetlands. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88:1699-1709.

Rodríguez-Gómez, Y., Sanz-Ochotorena, A., Torres-López, J., Lara-Martínez, R., Segura-Valdés, M. D. L., y Jiménez-García, L. F. (2018). Folliculogénesis en seis especies de lagartos y serpientes del Orden Squamata (Reptilia). Acta Microscopica, 27(3), 182-188.

Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods, 9(7):671-675.

Sever, D. M., y Hamlett, W. C. (2002). Female sperm storage in reptiles. Journal of Experimental Zoology, 292(2), 187-199.

- Shanbhag, B.A. 2002. Reproductive biology of Indian reptiles. *Proceedings of Indian National Science Academy*, 68(6): 497-528.
- Shine, R. 2003. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society B* 270:995-1004.
- Shine, R., y Guillette, L. J. (1988). The evolution of viviparity in reptiles: A physiological model and its ecological consequences. *Journal of Theoretical Biology*, 132(1), 43–50. doi:10.1016/s0022-5193(88)80189-9
- Silva, K.M., Silva, K.B., Sueiro, L.R., Oliveira, M.E.E., y Almeida-Santos, S.M. 2019. Reproductive biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the brazilian Amazon. *Herpetologica*, 75(3):198-207.
- Siqueira, L.H.C., Lima-Santos, J. y Pereira Silva, K.M. 2022. Reproductive strategies of the semifossorial snake *Atractus zebrinus* from the Atlantic Forest. *Cuadernos de Herpetología*, 36(1):33-45.
- Sivan, J., Panzera, A., y Maneyro, R. (2016). Male Reproductive Cycle of a Neotropical Snake, *Lygophis anomalus* (Dipsadidae), in a Temperate Geographic Distribution. *South American Journal of Herpetology*, 11(2), 114–118.
- Stewart, J.R. (1993). Yolk sac placentation in reptiles: structural innovation in a fundamental vertebrate fetal nutritional system. *J. Exp. Zool.* 266: 431-449.
- Trauth, S. E. (1978). Ovarian cycle of *Crotaphytus collaris* (Reptilia, Lacertilia, Iguanidae) from Arkansas with emphasis on corpora albicantia, follicular atresia, and reproductive potential. *Journal of Herpetology*, 461-470.
- Uetz, P. (2022). The Reptile Database. <https://www.reptile-database.org/>
- Uribe, M.C. 2002. Aparato reproductor masculino. En: Estrada Flores E. y Uribe M.C. Aranzábal (eds.), *Atlas de histología de vertebrados*, pp. 133-148. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Uribe, M.D.C.A., Omana, M.E.M., Quintero, J.G., y Guillette Jr, L.J. 1995. Seasonal variation in ovarian histology of the viviparous lizard *Sceloporus torquatus torquatus*. *Journal of Morphology*, 226(1):103-119.
- Vitt L.J. y Caldwell J.P. 2014. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 4th Edition. Academic Press, USA.
- Xavier, F. (1987). Functional morphology and regulation of the corpus luteum. In *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles* (pp. 241-282). Boston, MA: Springer US.

Anexo 1. Referencias de esquemas.

