



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA**

**LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Orientación: Zoología**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**Gametogénesis en *Rhinella bergi* (Céspedes, 2000) (Anura: Bufonidae): aspectos histológicos e inmunohistoquímicos asociados a eventos de apoptosis y proliferación celular**

**TESINISTA**: Esteban Omar Cheij.

**DIRECTORA**: Dra. Carolina Flores Quintana.

**LUGAR DE TRABAJO**: Cátedra de Histología Animal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura- Universidad Nacional del Nordeste.

## Denominación

“Gametogénesis en *Rhinella bergi* (Céspedes, 2000) (Anura: Bufonidae): aspectos histológicos e inmunohistoquímicos asociados a eventos de apoptosis y proliferación celular.”

## Resumen

El estudio de la biología reproductiva comúnmente involucra el análisis de caracteres anatómicos y funcionales además de la influencia de los eventos intrínsecos y extrínsecos del proceso. Esto incluye las características generales del sistema reproductor y sus cambios a lo largo del ciclo reproductivo, procesos de espermatogénesis y ovogénesis, regulación neuroendocrina y ambiental de la actividad reproductiva, comportamiento reproductivo de machos y hembras y eventos de proliferación celular y apoptosis, asociados a la atresia folicular y recrudescencia gonadal. Los anuros presentan una gran diversidad en sus modos, estrategias reproductivas y de desarrollo. Las diferentes especies exhiben características reproductivas particulares en respuesta al medio que habitan. La progresión de la gametogénesis de los anfibios está regulada por varios factores, y el equilibrio dinámico entre la proliferación y la muerte de las células germinales es un factor decisivo que determina la velocidad a la que se produce la gametogénesis. La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular programada, responsable de la eliminación de células germinales en todas las etapas gametogénicas, como así también, de otras líneas celulares del organismo. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar las gónadas y los procesos de foliculogénesis y espermatogénesis de machos y hembras de *Rhinella bergi* detectando los eventos de proliferación celular y apoptosis, a través de un análisis anatómico, histológico e inmunohistoquímico. Este análisis pretende contribuir al conocimiento de los procesos involucrados durante la foliculogénesis y espermatogénesis de la especie mencionada. Para ello, se trabajó con ejemplares colectados previamente en las estaciones de primavera y verano (2014-2015) incluidos en la Colección Didáctica de la asignatura Histología Animal de la UNNE, en los cuales se estudiaron las gónadas a partir del análisis morfológico, histológico e inmunohistoquímico. Se analizó la anatomía del sistema reproductor en microscopio estereoscópico y microscopio electrónico de barrido (MEB). Se realizaron preparados histológicos siguiendo el protocolo convencional de deshidratación, inclusión en parafina y coloración con hematoxilina-eosina; tricrómica de Mallory y reacciones histoquímicas de PAS. Para caracterizar las células mitóticas y meióticas activas en ovarios y testículos, se realizó la inmunomarcación con la proteína de proliferación celular PCNA. Para la detección de eventos de muerte celular programada se procedió con la inmunomarcación de la proteína de la familia Bcl (Bax y Bcl- XL). Además, se calculó el IA (índice apoptótico) e IP (índice proliferativo) en base a la inmunomarcación de los órganos reproductores. Las características anatómicas, tanto como la gametogénesis y los procesos de proliferación celular y muerte que subyacen a dicho evento en *Rhinella bergi* concuerdan con lo propuesto para otras especies analizadas de la familia Bufonidae. Con respecto a la proliferación celular durante la ovogénesis, se da principalmente en hembras juveniles y ovulatorias de primavera. La apoptosis en el ovario es más marcada en los ovarios de las hembras post-ovulatorias, en las cuales se observó un predominio de folículos atrésicos. Dichas hembras corresponden a ejemplares colectados en verano. La proliferación celular durante la espermatogénesis se da en espermatogonias y espermatocitos I. Con un mayor índice proliferativo de espermatogonias en primavera. La apoptosis en el testículo es significativamente mayor en el período comprendido entre los meses de enero y marzo, con alta

incidencia apoptótica en testículos de individuos recolectados en meses de verano. Al analizar cuáles son los estadios de la espermatogénesis que sufren muerte celular, se observó que la apoptosis ocurre en los espermatoцитos I, II y en las espermátidas. El órgano de Bidder presenta actividad proliferativa en primavera y actividad asociada a eventos de muerte celular en verano. Los resultados del presente trabajo sirven como base para posteriormente caracterizar el ciclo reproductivo de *Rhinella bergi*; y a la vez, proporciona información antecedente sobre el análisis de la actividad gametogénica por IHQ a partir del estudio de la expresión de la proteína de proliferación celular PCNA y muerte celular (Bax-Bcl-XL). Futuros análisis estarán focalizados en la evaluación del ciclo reproductivo en dicha especie tanto en ovarios y testículos como órgano de Bidder, a fin de comparar y correlacionar con los resultados obtenidos en este estudio.

## Índice

### 1- Introducción

Origen y Fundamentos 5

Antecedentes del tema 7

### 2- Objetivos General y Específicos 10

### 3- Materiales y Método

Colección y fijación de animales 11

Análisis macroscópico 11

Análisis histológico 12

Análisis morfométrico 13

Análisis inmunohistoquímico 14

### 4- Resultados

Hembras: ovario 15

Ovogénesis 17

Machos: testículos 22

Túbulos seminíferos 23

Compartimento intersticial 25

Órgano de Bidder 26

Análisis de la proliferación y muerte celular 27

### 5- Discusión 32

### 6- Conclusiones 36

### 7- Agradecimientos 37

### 8- Bibliografía 38

## INTRODUCCIÓN

### Origen y fundamentos de la investigación

Los anfibios actualmente comprenden alrededor de 8407 especies alrededor del mundo (AmphibiaWeb 2021). En la clase Amphibia, se incluyen los órdenes Anura con 7426 especies, Caudata con 766 sp y Gymnophiona con 215 sp (AmphibiaWeb, 2021). Según Vaira et al. (2012), Argentina alberga la décima fauna más grande de anfibios, considerando los 40 países incluidos en la región Neotropical. En nuestro país existen 172 especies de anuros (ranas y sapos) y solo 4 especies de gimnofiones (cecilias) (AmphibiaWeb, 2021). Los anfibios son animales ectotermos, poseen la piel altamente permeable (Croteau et al., 2008) y cumplen diversos roles en los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Estos vertebrados son fundamentales en la red trófica siendo presas de diferentes grupos de vertebrados: peces, serpientes, aves, algunos mamíferos e inclusive otros anfibios. En su fase adulta son exclusivamente carnívoros, alimentándose de una variedad de invertebrados; entre ellos insectos, siendo por tal motivo reconocidos como eficaces controladores biológicos de plagas (Blaustein et al., 2002; Attademo et al., 2005). Una de las causas principales de su vulnerabilidad es que poseen un ciclo de vida complejo, ya que habitan en dos medios diferentes: terrestre y acuático (Stuart et al., 2004). Por lo tanto, en cualquier momento de su ciclo vital, estos organismos presentan elevada sensibilidad a agentes físico químicos que pueden afectar su homeostasis y normal desarrollo durante sus fases embrionarias, larvales y/o en la vida adulta (Boyer y Grue, 1995; Herkovits y Pérez-Coll, 2003).

El estudio de la biología reproductiva comúnmente involucra el análisis de caracteres anatómicos y funcionales además de eventos intrínsecos y extrínsecos del proceso. Esto incluye las características generales del sistema reproductor y sus cambios a lo largo del ciclo reproductivo, los procesos de espermatogénesis y ovogénesis, el tipo de ovocito en referencia al contenido y distribución del vitelo, el mecanismo de fertilización, el tipo de desarrollo y nutrición embrionaria, la regulación neuroendocrina y ambiental de la actividad reproductiva; como así también, el comportamiento reproductivo de machos y hembras. Asimismo, la edad o tamaño mínimo reproductivo, el tamaño de la camada, el número de camadas por estación reproductiva y las condiciones ambientales necesarias para el adecuado desarrollo de la cría, representan algunos de los parámetros esenciales para caracterizar las estrategias reproductivas en los vertebrados (Stuart et al., 2004; Haddad y Prado, 2005).

Los anuros presentan una gran diversidad en sus modos y estrategias reproductivas y de desarrollo (Haddad y Prado, 2005). Las diferentes especies exhiben características reproductivas particulares en respuesta al medio que habitan. En las regiones tropicales, donde los factores ambientales varían poco durante el año, muchas especies poseen ciclos reproductivos continuos, siendo las precipitaciones el evento que desencadena el proceso reproductivo (Pereira y Maneyro 2012). En regiones templadas con marcada estacionalidad, la actividad reproductiva está principalmente regulada por la temperatura y la humedad (Pombal, 2007). Adicionalmente, los modos reproductivos están definidos también por factores relacionados con el sitio de oviposición, el tipo de desarrollo y las características de los huevos y de las puestas (Salthe y Duellman, 1973; Pombal y Haddad, 2007).

La progresión de la gametogénesis de los anfibios está regulada por varios factores, y el equilibrio dinámico entre la proliferación y la muerte de las células germinales también define la velocidad a la que se produce la gametogénesis (Scaia et al., 2019). Se evidencia, entonces, que tanto la apoptosis como la proliferación celular son eventos celulares complejos que abarcan escalas a nivel ecológico, como las variaciones climáticas estacionales, y a nivel molecular, como los mecanismos de expresión génica que codifican a las proteínas implicadas en la muerte celular o en su división (Olea et al., 2021).

El testículo de los anfibios al igual que el de los demás grupos de vertebrados está organizado en dos compartimentos: el intersticial, integrado por las células de Leydig, células musculares, tejido conectivo y vasos sanguíneos (Scaia et al., 2016), y el germinal, formado por túbulos seminíferos, sitio donde ocurre la espermatogénesis (Curi et al., 2014). En los vertebrados anamniotas, la unidad funcional de la espermatogénesis es el espermatocisto o cisto, que se forma cuando una espermatogonia es rodeada por las proyecciones citoplasmáticas de una célula de Sertoli (Duellman y Trueb, 1986; Pudney, 1995). Dentro de cada cisto las espermatogonias I proliferan por mitosis y se diferencian a espermatogonias II que luego comienzan la meiosis y dan origen a los espermatocitos, espermátidas y espermatozoides maduros, los cuales permanecen asociados a las células de Sertoli hasta su liberación próximos a la luz del túbulo. La organización cística lleva a que las células germinales dentro de cada cisto se encuentren en el mismo estadio de la espermatogénesis. Este proceso ha sido ampliamente estudiado en diversas especies de anfibios (Pozzi y Ceballos, 2000; Scaia et al., 2019; Brum et al., 2020; Olea et al., 2021).

Para el caso del ovario, este contiene ovogonias que pueden generar una nueva cohorte de ovocitos cada año. Cuando las ovogonias entran en la primera división meiótica, se convierten en ovocitos primarios (Montezol, et al., 2017). En esta etapa, los ovocitos progresan a través de la primera profase meiótica y permanecen detenidos en la etapa de diplotene (Prado et al., 2017). Los ovocitos primarios se someten a un complejo proceso de citodiferenciación y división que da como resultado la producción del gameto femenino. Para el caso de los anuros, estos eventos van asociados a un incremento en el tamaño del ovocito dado por un aumento en la cantidad de vitelo (vitelogenina) acumulado en el citoplasma (vitelogénesis) (Ogielska, 2009; Curi et al., 2014). Este proceso se puede dividir en tres etapas principales: previtelogénesis, vitelogénesis y postvitelogénesis o madurez (Olea et al., 2021). Esta clasificación sirve como marco para la mayoría de los estudios sobre ovogénesis en anuros y es útil para comparar este proceso en diferentes especies.

La diferenciación del linaje germinal parecería estar determinada por un equilibrio dinámico entre la proliferación celular y la muerte celular. En los testículos y ovarios normales no todas las células de la línea germinal ingresan en meiosis para dar lugar a espermatozoides maduros y folículos postvitelogénicos. Muchos de ellos mueren antes de la iniciación del proceso o inclusive durante el mismo (Hikim et al., 2003). De este modo, un gran número de células ingresan a apoptosis para mantener la homeostasis gonadal dado que se requiere un tipo de muerte celular en la cual no se desencadene una respuesta inmune y se proteja el microambiente celular, así como también un equilibrio constante con la proliferación celular (Scaia et al., 2016; Scaia et al., 2019; Olea et al., 2021).

## Antecedentes del tema

El estudio de los procesos reproductivos en los anuros de América del Sur ha sido abordado en varias especies como *Leptodactylus fuscus* (Maragno y Cechin, 2009); *Scinax fuscomarginatus* (Pereira, 2004); *Dendropsophus minutus* (Santos et al., 2007); *Pseudis minuta* (Melchioris et al., 2004) y *Phyllomedusa azurea* (Rodrigues et al., 2007) para el Sur de Brasil, donde se analiza el desarrollo gonadal de machos y hembras, el esfuerzo reproductivo, las relaciones tamaño-fecundidad y la aparición de dimorfismo sexual en el tamaño corporal, caracterización histológica de ovarios y testículos durante el ciclo reproductivo. Para el caso de Chile, en *Pleurodema thaul* se describió el patrón temporal de la reproducción y parámetros de oviposición y huevos, comparando dos temporadas reproductivas consecutivas (Moncada y Úbeda, 2020). En Uruguay se describió la inversión reproductiva para *Physalaemus riograndensis* (Pereira y Maneyro, 2012), como así también, aspectos de la biología reproductiva de una población de *Elachistocleis bicolor* teniendo en cuenta el dimorfismo sexual, tamaño de la puesta y ciclicidad (Elgue y Maneyro, 2017).

En nuestro país, se han realizado trabajos que abordan algunos aspectos reproductivos referentes a variables ambientales (precipitaciones y temperatura), tamaño corporal, dimorfismo sexual y tamaño de los ovocitos en las hembras para *Elachistocleis bicolor*, *Leptodactylus latinasus* y *Rhinella fernandezae* (Martori et al., 2010) en la provincia de Córdoba. Trabajos que inspeccionan de manera comparada los parámetros reproductivos asociados al ambiente en un ensamble de anuros del Chaco Semiárido, Salta (Perotti, 1997). Trabajos que asocian patrones comportamentales, reproductivos y alimentarios en *Pseudopaludicola boliviana* (Duré et al., 2004); *Scinax nasicus* (Hamman et al., 2009); *S. fuscomarginatus* (Toledo y Haddad, 2005). Trabajos donde abordan las diferencias en las puestas de huevos y dimorfismo sexual en *Leptodactylus chaquensis* (Zaracho et al., 2005; Schaefer et al., 2006), *Physalaemus biligonigerus*, *P. albonotatus* y *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Zaracho et al., 2005). Sin embargo, trabajos que vinculen características morfológicas a nivel anatómico e histológico son escasos habiendo información para *Dendropsophus sanborni* (Curi et al., 2014); *Leptodactylus latinasus* (Ponssa y Candiotti, 2012); *L. chaquensis* (Villagra et al., 2014); *Rhinella arenarum* (Scaia, 2015; Scaia et al., 2016; 2019).

Recientemente se han publicado dos trabajos para nuestra región donde se estudiaron aspectos asociados al sistema reproductor en anuros. En uno de ellos, se tiene en cuenta los procesos de proliferación celular a partir del estudio de la inmunodetección de proteínas de proliferación celular (Olea et al., 2021) y en el otro, se analizan especies de anuros como bioindicadores ambientales en estudios ecotoxicológicos teniendo como referencia el sistema reproductor e hígado (Curi et al., 2021).

Se han estudiado mecanismos moleculares en *Hypselotriton orientalis* y *Rhinella arenarum*, donde la evidencia sugiere que la apoptosis puede ocurrir por activación de caspasa-3 a través de vías extrínsecas e intrínsecas (Jin et al., 2018; Scaia et al., 2016). En *R. arenarum* los cistos que no forman espermatozoides se eliminan de los testículos por apoptosis después de la reproducción y antes de la siguiente ola espermatogénica (Scaia et al., 2016). En cuanto a la proliferación de células de la línea germinal, se caracterizó en *Cynops pyrrhogaster* (Yuwen et al., 2008), *R. arenarum* (Scaia, 2015; Scaia et al., 2016) y con más detalle en *Pelophylax esculentus* (Izzo et al., 2011). La proliferación de

gametogonias en *R. arenarum* y *P. esculentus* ocurre durante la temporada reproductiva (Ferrara et al., 2004; Scaia et al., 2016). Sin embargo en *P. esculentus* la variación estacional de las proliferaciones parece estar asociada a cambios en el antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA), lo que sugiere altos niveles de este marcador en las espermatogonias I en marzo y en las espermatogonias II en julio, octubre y noviembre (Chieffi et al., 2000).

Como se puede evidenciar, existen pocos estudios que examinan los mecanismos de muerte celular y proliferación asociados a los ovarios y testículos en anuros de nuestra región. La mayoría de ellos se centran en las variaciones estacionales de la apoptosis y la espermatogénesis indicando una línea de estudio en expansión que merece interés científico. Debido a ello, resulta oportuno profundizar en el análisis de la espermatogénesis y ovogénesis con énfasis en los procesos de proliferación y muerte celular durante la etapa reproductiva en anuros del Nordeste argentino, teniendo como especie de estudio a *Rhinella bergi*.

La familia Bufonidae está compuesta por 34 géneros de amplia distribución en el mundo. Los miembros de esta familia tienen ciertos rasgos característicos tales como presencia de órgano de Bidder (algunos géneros), dientes ausentes, músculo constrictor posterior ausente, cuerpos grasos inguinales y cráneo altamente osificado. Esta familia incluye a los “sapos”, poseen miembros anteriores cortos los cuales utilizan para caminar o saltar, piel seca y cubierta de verrugas, y glándulas parótidas localizadas detrás de los ojos (Montero y Autino, 2004). En Argentina habitan 17 especies del género *Rhinella*, 11 especies de *Melanophryniscus* y una especie de *Nannophryne* (Frost, 2018).

La especie en estudio, *Rhinella bergi* (Céspedes, 2000), es conocida vulgarmente como “sapito granuloso chico” (Figura 1). Se trata de un anuro de hábitos terrestres con una LHC que no supera los 50mm. Se distribuye en las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes, Santa Fe y Córdoba, y en los países vecinos Paraguay y Brasil (Zaracho et al., 2012). Se reproduce en los meses de septiembre a diciembre luego de intensas lluvias, donde los machos cantan desde el agua, entre vegetación marginal, o apoyados en el fondo del charco (Schaefer y Kehr, 2006). Si bien actualmente se trata de una especie que se encuentra en la categoría de Preocupación menor (Vaira et al., 2012; IUCN, 2021), en un futuro esta condición podría revertirse, y las poblaciones de *R. bergi* podrían declinar sumándose a la larga lista de anuros que a escala mundial se encuentran en progresiva disminución. Por lo cual contar con datos referentes a su sistema reproductor, brindará los conocimientos necesarios para su adecuada conservación y elaboración de planes de manejo sustentable en ambientes con intervención antrópica.

## Clasificación taxonómica de la especie

Phyllum: Chordata

Clase: Amphibia

Subclase: Lissamphibia

Orden: Anura

Familia: Bufonidae

Género: *Rhinella*

Especie: *Rhinella bergi*



**Figura 1:** Ejemplar adulto de *Rhinella bergi*. Fuente: Olea et al., 2019.

## **Objetivo General**

- Caracterizar las gónadas y los procesos de foliculogénesis y espermatogénesis de machos y hembras de *Rhinella bergi* detectando los eventos de proliferación celular y apoptosis a través de un análisis anatómico, histológico e inmunohistoquímico.

## **Objetivos Particulares**

- Caracterizar los cambios histológicos e histoquímicos en gónadas de *Rhinella bergi* durante la foliculogénesis y espermatogénesis.
- Analizar la inmunomarcación de proteínas asociadas a la proliferación celular (PCNA) en la línea germinal y células somáticas gonadales a fin de establecer su actividad proliferativa.
- Analizar la inmunomarcación de proteínas Bax y Bcl-XL, moléculas involucradas en los procesos de apoptosis, a fin de establecer la actividad apoptótica de las células de la línea germinal y somática.

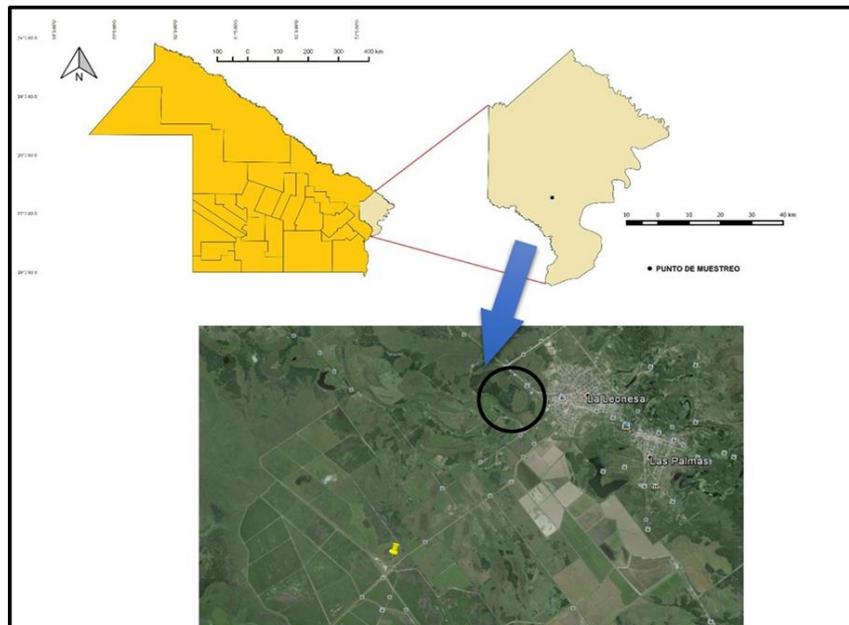
## MATERIALES Y MÉTODO

- *Colección y fijación de animales*

Se analizaron 14 ovarios y 12 testículos de ejemplares juveniles y adultos de *Rhinella bergi* (N=26), de los cuales 3 testículos y 1 ovario corresponden a los ejemplares juveniles. Los individuos fueron colectados en viajes de campo en la localidad de La Leonesa (27°02'33.0"S 58°42'21.0"W) (Chaco – Argentina) durante el año 2014 y 2015 en los meses de noviembre a marzo (primavera-verano) (Figura 2). Los ejemplares fueron fijados en formol bufferado al 10% y en solución de Bouin (24 hs) y posteriormente colocados en formol al 10%. Actualmente pertenecen a la colección científica de la Cátedra de Histología Animal del Departamento de Biología de la FaCENA-UNNE. Los individuos fueron sacrificados siguiendo los lineamientos de AVMA guía para la eutanasia animal: edición 2013 (Underwood et al., 2013) para su posterior análisis.

- *Análisis Macroscópico*

Los ovarios y testículos de *Rhinella bergi* fueron observados y fotografiados bajo lupa estereoscópica y microscopio electrónico de barrido (MEB) (Figura 3 A y B). La preparación de los ejemplares para MEB se realizó siguiendo el protocolo estandarizado de deshidratación en soluciones de concentración creciente de Acetona (12.5, 25, 50, 75, 100%), secado a punto crítico y metalizado con oro. Las observaciones fueron realizadas en un Microscopio JEOL JSM-5800 LV perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).



**Figura 2:** Lugar de muestreo. La Leonesa, localidad del este de la provincia del Chaco- Argentina.



**Figura 3:** Toma de muestra para análisis del sistema reproductor de *Rhinella bergi*. A- disección de los ejemplares de *R. bergi* en microscopio estereoscópico. B- Detalle macroscópico de gónadas de *R. bergi*. C-D- Procesamiento histológicos de ovarios y testículos. E- Observación de los preparados histológicos.

- **Análisis Histológico**

Para el análisis histológico del sistema reproductor y caracterización de cada tipo celular tanto en machos (N=12) como en hembras (N=14), se realizaron preparados siguiendo la técnica convencional de deshidratación, inclusión, cortes con micrótopo y coloración. La deshidratación se realizó en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70%, 80% y 96%) y alcohol absoluto (100%) durante 25 a 45 minutos dependiendo del tamaño de la muestra. Se procedió a incluir en xilol-parafina (50-50%) durante 24 horas y parafina pura durante toda la noche. Al día siguiente, se confeccionaron tacos y se orientaron las muestras para la obtención de secciones transversales o longitudinales de 3 – 5  $\mu\text{m}$  (Figura 3 C). Estas fueron obtenidas con micrótopo rotatorio tipo Spencer manual. Las muestras se colorearon con Hematoxilina-Eosina y Tricrómica de Mallory para distinción de tejido conectivo del tejido muscular liso (Figura 3 D). También se utilizó reacción histoquímica de PAS (Periodic Acid-Schiff) para la diferenciación de mucopolisacáridos en machos y hembras, distinción y delimitación de estructuras como

lámina basal de células foliculares y delimitación de cada cisto dada por las células de Sertoli. Los preparados histológicos primeramente fueron observados para su diagnóstico en un microscopio Olympus CX 31 (Figura 3 E) y posteriormente las imágenes fueron capturadas mediante el uso de un microscopio modelo Olympus BX 41 con cámara acoplada Olympus C-7070 y un Software de captura de imágenes soportado por el programa ENUTV-4. Para la medición y análisis de tejidos, células y compartimentos internos de ovarios y testículos se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ.

- *Análisis Morfométrico*

En las hembras (N=14) para la morfología folicular, se tomaron los diámetros mínimo y máximo ( $\mu\text{m}$ ) de los folículos y ovocitos encontrados en las secciones histológicas del ovario en distintos momentos de la foliculogénesis. Con el objetivo de 10x, se seleccionaron y fotografiaron 10 campos microscópicos elegidos al azar y se contaron los ovocitos de cada clase. Con el registro del diámetro de cada folículo, se obtuvo un promedio del tamaño en cada etapa de la foliculogénesis. Para ello, se siguió la clasificación propuesta por Valdez Toledo y Pisanó (1980) que categoriza a los folículos en sus diferentes etapas de ovogénesis: folículos previtelogénicos, folículos vitelogénicos y folículos post-vitelogénicos. También se registró la presencia de folículos atrésicos. Las observaciones se compararon con lo descrito para *Rhinella arenarum* (Echevarría y González, 1994.).

Se consideraron hembras juveniles (N=1) a aquellas que presentaron nidos de ovogonios, folículos primordiales, primarios y predominio de folículos pre-vitelogénicos. Hembras maduras ovulatorias (N=7) las que presentaron ovarios con predominio de folículos post-vitelogénicos, y hembras post-ovulatorias o post-desove (N= 6) aquellas con ovarios con predominio de folículos atrésicos y cuerpos post-ovulatorios (Curi et al., 2014, Olea et al., 2021).

En los machos (N=12) se realizaron estudios morfométricos midiendo el diámetro mínimo y máximo ( $\mu\text{m}$ ) de los túbulos seminíferos y cistos del linaje en diferenciación. De ellos, se consideraron machos juveniles (N=3) a aquellos con cistos inmaduros con predominio de espermatogonias y sin luz en el túbulo seminífero. Machos adultos (N=9) con cistos maduros fueron aquellos que presentaron espermátides y/o espermatozoides unidos a células de Sertoli y libres en la luz del túbulo seminífero. Machos con cistos inmaduros fueron aquellos que mostraron cistos con espermatogonias y espermatoцитos I y II (Curi, 2019). De este modo, se tuvieron en cuenta para la caracterización de la espermatogénesis a espermatogonias, espermatoцитos I, espermatoцитos II, espermátidas y espermatozoides. Con el objetivo de 40x se seleccionaron y fotografiaron 10 campos microscópicos elegidos al azar y se contaron el número de cistos por túbulo seminífero que contienen las agrupaciones celulares propias del linaje espermatogénico en diferenciación.

Para ambos casos, las variables cuantitativas fueron expresadas con la media y su correspondiente desvío estándar. Para la medición y análisis de tejidos, células y compartimentos internos de ovarios y testículos se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ.

- *Análisis Inmunohistoquímico*

Se reveló la expresión del antígeno de proliferación celular PCNA con la finalidad de detectar eventos de proliferación celular en los tejidos germinales analizados. Para ello se utilizó como anticuerpo primario PCNA origen conejo anti ratón. Se realizó la permeabilización de las membranas celulares por incubación con Tritón X-100 al 1% en PBS (Phosphate Buffered Saline) durante 5 minutos y bloqueo de peroxidasa interna con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS durante 10 minutos. Previo a la incubación de las muestras con el anticuerpo, se efectuó un bloqueo con 5% de leche descremada en PBS. Luego de lavar el anticuerpo con PBS, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado universal de DAKO (K0679) listo para usar. Se lavó el anticuerpo secundario y se incubó con la estreptavidina conjugada a peroxidasa de Rábano picante (HRP), lista para usar (DAKO K0690) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se reveló la peroxidasa con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) de DAKO (K3468) a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Se utilizó hematoxilina como tinción de contraste.

Para la detección de eventos apoptóticos asociados a los diferentes tipos celulares los tejidos germinales, tanto de machos como hembras, se realizó la inmunodetección de Bcl-XL y Bax, utilizando como anticuerpo primario el policlonal anti Bcl-XL origen conejo anti ratón. Para Bax, se utilizó como anticuerpo primario el monoclonal anti Bax origen ratón anti humano, rata y ratón. Al igual que con PCNA, en ambos casos el revelado se realizó según el protocolo indirecto de "L-estreptavidina biotina" - HRP (DAKO K0690) y revelado con DAB (diaminobencidina).

El control negativo se efectuó incubando con el anticuerpo secundario y terciario de DAKO pero sin la incubación con el anticuerpo primario. Los preparados fueron observados y fotografiados con un sistema compuesto por un microscopio Olympus BX 41 con cámara acoplada Olympus C-7070 y un Software de captura de imágenes soportado por el programa ENUTV-4.

A partir de cada inmunodetección, se procedió a contabilizar las células de la línea germinal tanto de machos (juveniles y adultos) como de hembras (juveniles y adultas) con reacción positiva a cada anticuerpo a fin de establecer los índices proliferativos (IP) y apoptóticos (IA):

. **IP**= n<sup>o</sup> de células de la línea germinal PCNA positivas / n<sup>o</sup> de células contadas en 10 campos al azar en un aumento de 20X x 100.

. **IA**= n<sup>o</sup> de células de la línea germinal BAX positivas / n<sup>o</sup> células contadas en 10 campos al azar en un aumento de 20X x 100.

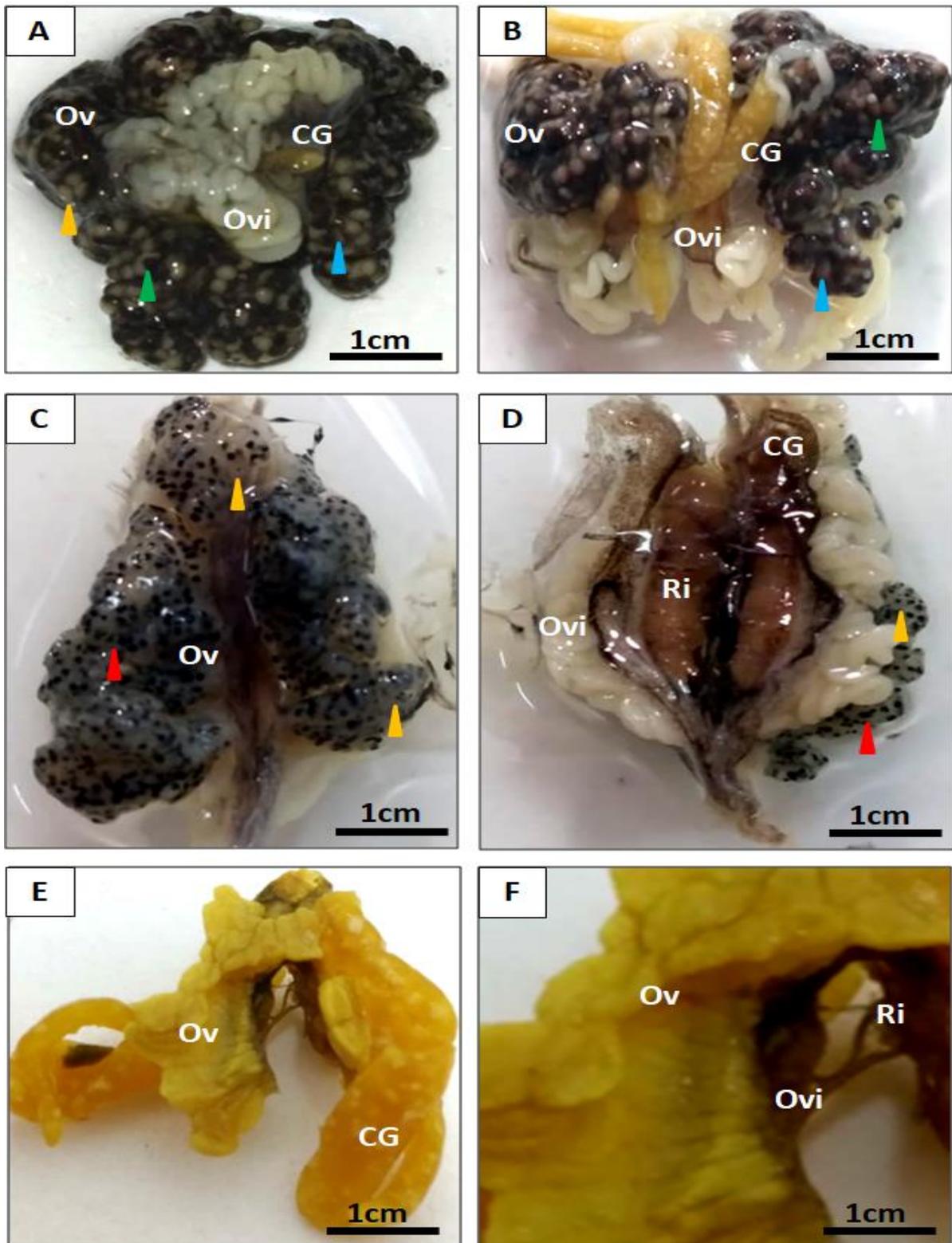
## RESULTADOS

### *Hembras*

En las observaciones macroscópicas en lupa estereoscópica en hembras adultas (Figura 4 A-D) se observa la presencia de ovocitos en diferentes etapas del desarrollo folicular: desde ovocitos previtelogénicos hasta ovocitos postvitelogénicos, con lo cual se pone de manifiesto el estado reproductivo de las hembras recolectadas (ovulatorias en primavera; ovulatorias y postovulatorias en verano). También se pudo evidenciar en hembras juveniles recolectadas en primavera, el escaso desarrollo del ovario con la presencia de folículos previtelogénicos (Figura 4 E-F) y folículos atrésicos.

### *Ovarios*

Los ovarios presentan una estructura racimosa debido a la presencia de ovocitos en diferentes etapas de la ovogénesis dependiendo del estadio en el que se encuentre. A estos órganos se los puede observar de un color blanco-amarillento en hembras juveniles (Figura 4 E), mientras que en adultas son pigmentados, diferenciándose a simple vista una región más oscura dada por la presencia de pigmentos y una región más clara, determinada por la ausencia de pigmentos. Estas zonas son coincidentes con la polaridad animal - vegetal encontrada en los ovocitos (Figura 4 A, B). Mientras que si el estado en el que se lo observa es el de post-desove (hembras post-ovulatorias), los ovarios se ven translúcidos con algunos ovocitos atrésicos y grandes vasos (Figura 4 D). Estos órganos se encuentran ventrales, próximos a los riñones y están ligados a la pared del cuerpo por los mesovarios, los cuales están formados por un revestimiento mesotelial celómico de tejido conectivo denso no modelado provisto de una conspicua vascularización. A nivel histológico, el revestimiento peritoneal forma una cubierta de epitelio simple plano a cúbico al que subyace escaso tejido conectivo que contiene paquete vasculo-nervioso (Figura 5 B, 6 D).



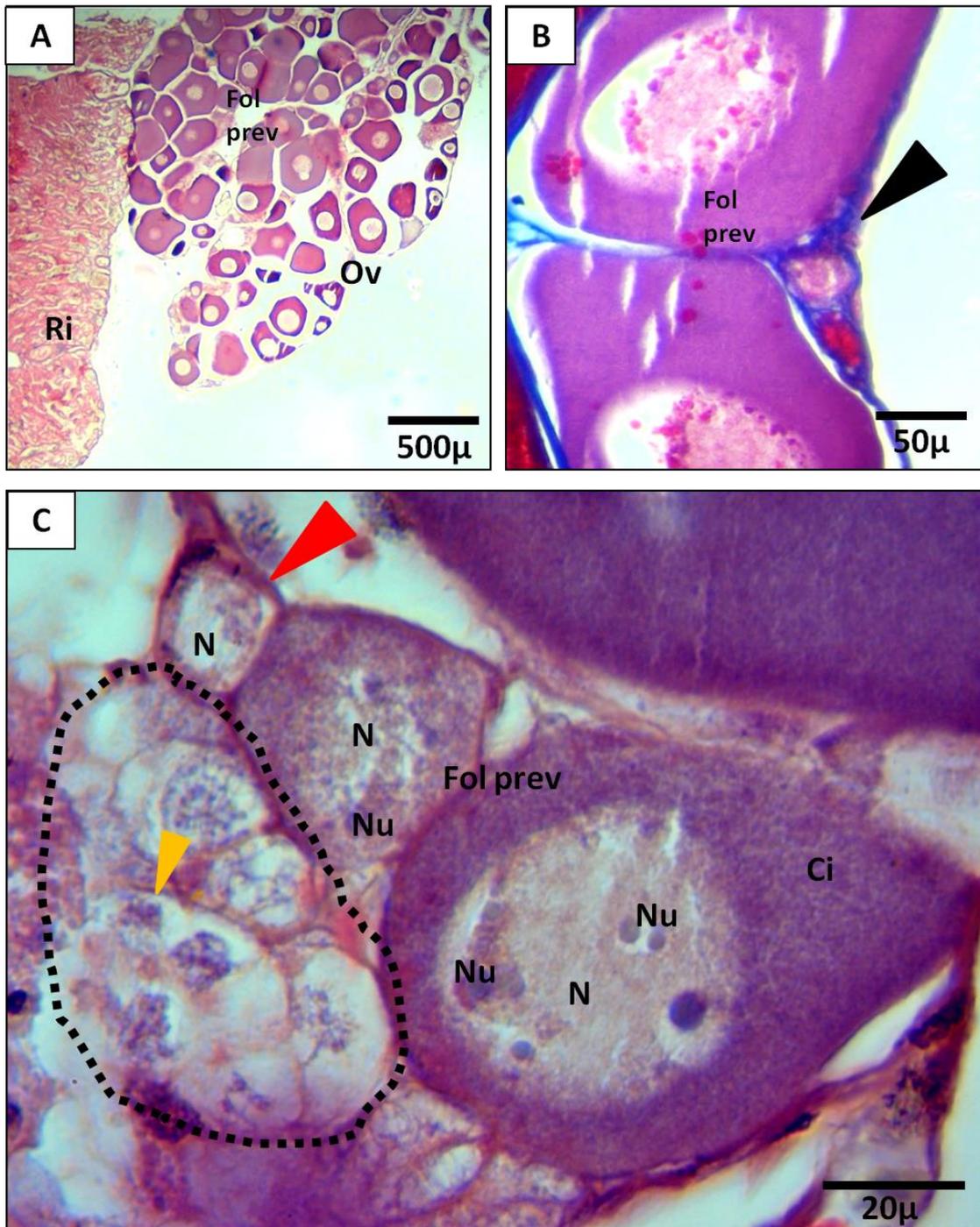
**Figura 4:** Ovarios hembras adultas (A-D) y juvenil (E-F) de *Rhinella bergi*, con folículos pre-vitelogénicos, vitelogénicos y post-vitelogénicos (A-B), y folículos atrésicos (C-D). **Referencias:** CG: cuerpos grasos. Ov: ovario. Ovi: oviducto. Punta de flecha: folículos previtelogénicos (amarilla), vitelogénicos (verde) post-vitelogénicos (celeste) atrésicos (roja). Ri: riñones. **Magnificación:** (A-E): 2,5x, (F): 4x.

## *Ovogénesis*

Las ovogonias ( $26,3 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ) son células con núcleo basófilo y citoplasma hialino, las cuales se dividen por mitosis y mantienen conexiones citoplasmáticas entre ellas. Formando un nido o quiste (Figura 5 C) de un tamaño promedio de  $116,1 \pm 50,7 \mu\text{m}$ , estos grupos de células se encuentran rodeados por células somáticas pre-foliculares. Una vez que las células germinales ingresan a meiosis, los ovocitos meióticos (paquiteno tardío / diploteno temprano) comienzan a separarse. Cada ovocito primario en desarrollo también está rodeado por células pre-foliculares (Figura 5 C).

Las ovogonias en nidos observadas en ejemplares juveniles, también persisten en los ovarios maduros, ya sea individualmente o dispuestas en el nido y entran continuamente en mitosis, siendo inmunoreactivos positivos para la proteína de proliferación celular PCNA (Figura 12 A). Los ovocitos primarios en los nidos se desarrollan sincrónicamente y se encuentran desde la etapa de interfase premeiótica hasta la etapa tardía de paquitene.

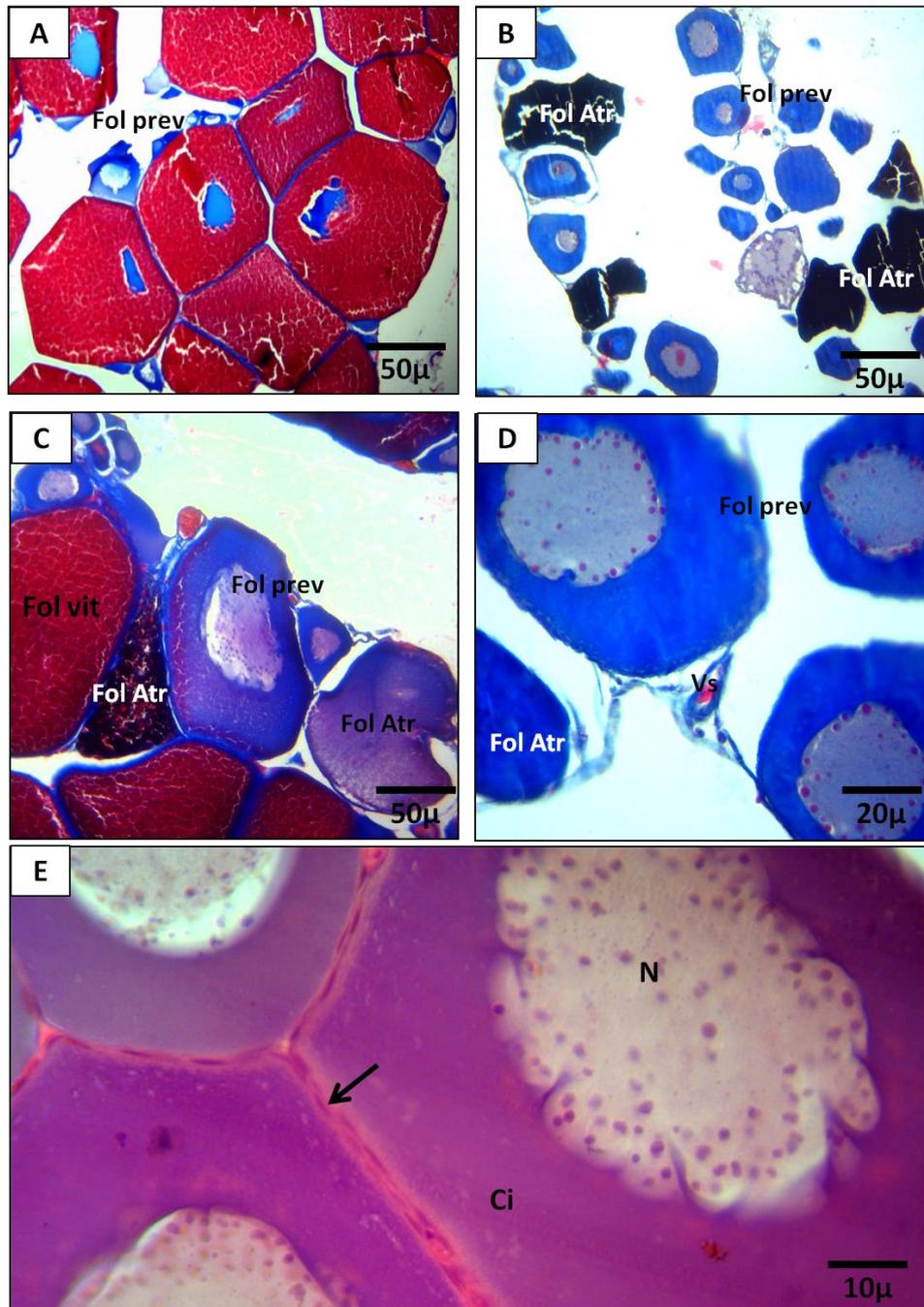
Los folículos ováricos primordiales están formados por el ovocito en diplotene rodeado individualmente por las células pre-foliculares. Posteriormente los ovocitos se separan y ya no se encuentran en nidos (Figura 5 C). Los folículos recién formados, rodeados por una monocapa de células foliculares, también están envueltos por una fina vaina de tejido conjuntivo (capa tecal) derivada de la capa mesenquimatosa del tejido gonadal (Figura 5 B). En la periferia del núcleo se pueden observar múltiples nucléolos que desaparecen gradualmente (Figura 6 E).



**Figura 5:** Microfotografía de ovarios de hembras juveniles. A- Detalle de la ubicación de los ovarios en relación con los riñones de *Rhinella bergi* (Coloración: Hematoxilina-Eosina). B- Detalle de la envoltura de tejido conectivo y paquete vascular (Coloración Tricrómica de Mallory). C- Detalle de nidos de ovogonias, folículos primordiales y folículos previtelogénicos en desarrollo (Coloración: Hematoxilina-Eosina). **Referencias:** Ci: citoplasma. Fol prev: folículo previtelogénico. Línea de puntos: nido de ovogonias. N: núcleo. Nu: nucléolo. Ov: ovario. Punta de flecha negra: tejido conectivo y vasos sanguíneos. Punta de flecha roja: folículo primordial. Punta de flecha naranja: células pre-foliculares. Ri: riñón. **Magnificación:** (A):10x, (B): 40x, (C):100x.

Los folículos pre-vitelogénicos están presentes en todas las hembras recolectadas (juvenil y adulta e incluso en las hembras post desove) (Figura 5 A-B, Figura 6 A). En estos folículos, la cubierta está formada por células foliculares planas y por otra capa de células que conforman la teca (Figura 5 E). Además, se evidencia un núcleo irregular, el cual está situado hacia la zona central del ovocito y de un

gran tamaño en comparación con el citoplasma (Figura 6 C y D). La variación en tamaño y proporción de cada tipo celular se representa en la Tabla 1.



**Figura 6:** Microfotografía de ovarios de hembras adultas de *Rhinella bergi*. A- Corte transversal del ovario de hembra ovulatoria con detalle de folículos pre-vitelogénicos y vitelogénicos (Coloración: Tricrómica de Mallory). B-Corte transversal del ovario de hembra post-ovulatoria con detalle de folículos pre-vitelogénicos y atrésicos (Coloración: Tricrómica de Mallory). C- Detalle de folículos pre-vitelogénicos, vitelogénicos y atrésicos (Coloración: Tricrómica de Mallory). D- Detalle de folículos pre-vitelogénicos y atrésicos (Coloración: Tricrómica de Mallory). E- Detalle de las células foliculares y de la teca de folículos pre-vitelogénicos (Coloración H/E). **Referencias:** Ci: citoplasma. Flecha negra: células foliculares. Fol Atr: folículo atrésico. Fol prev: folículo previtelogénico. Fol vit: folículo vitelogénico. N: núcleo. Vs: vaso sanguíneo. **Magnificación:** (A-B):10x, (C-D):40x, (E):100x.

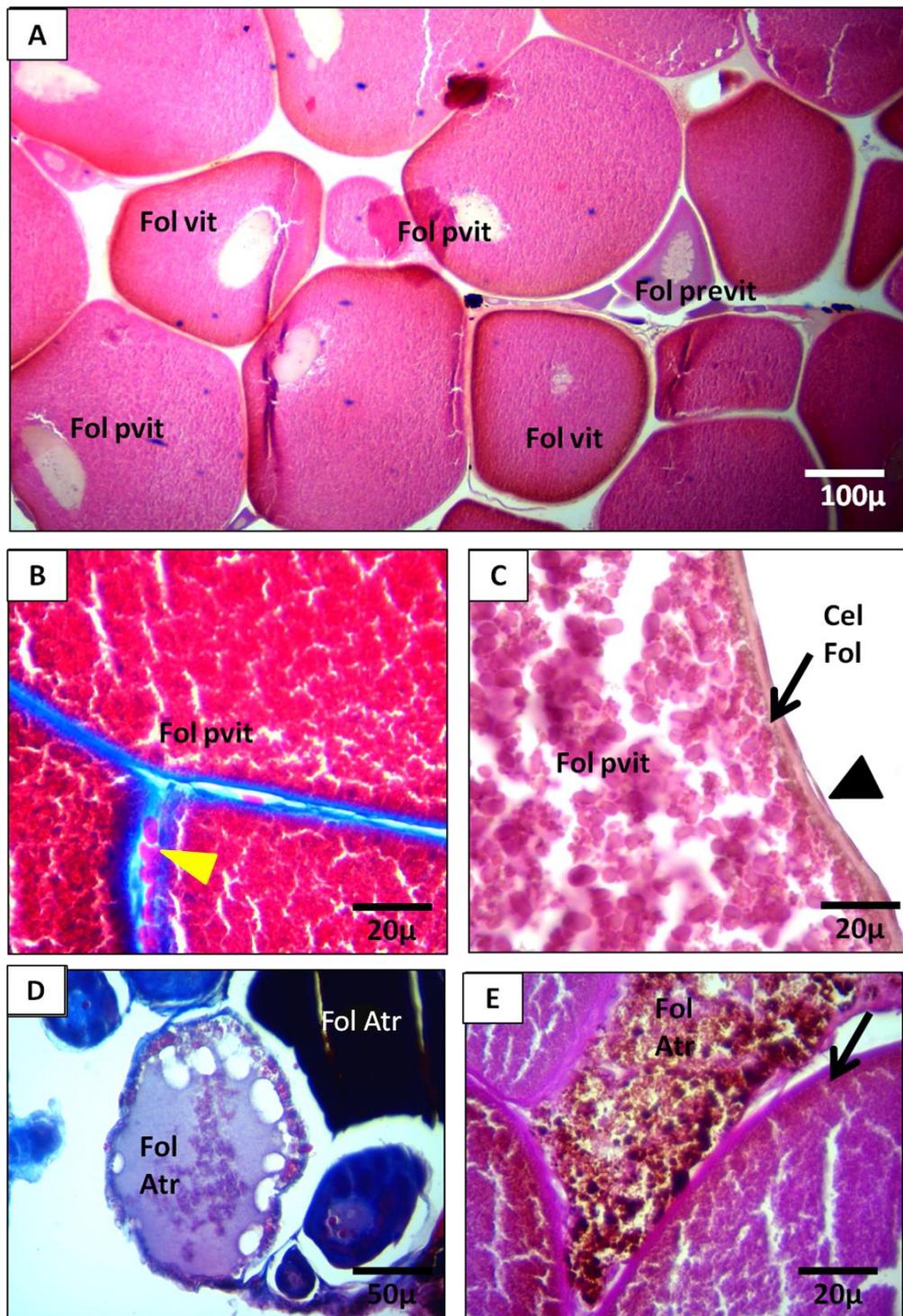
Los folículos vitelogénicos, al igual que los folículos pre-vitelogénicos, presentan una capa de células foliculares muy unidas a las células de la teca (Figura 6 A, Figura 7 A). Se encuentran presentes

en todas las hembras adultas colectadas y son reconocibles por su gran tamaño. Su citoplasma es muy abundante y muestra una acumulación progresiva de vitelo en forma de plaquetas vitelinas que rodean al núcleo (Figura 7 A), el cual queda desplazado hacia la periferia (polo animal) liberando la zona donde son más abundantes las plaquetas vitelinas (polo vegetativo). El aumento en tamaño y cantidad de las plaquetas vitelinas da el paso a la etapa post-velogénica o etapa ovulatoria (Figura 7 B, C). Los ovocitos han aumentado considerablemente de tamaño, encontrándose en la capa folicular, las células foliculares muy aplanadas y la teca externa rodeando todo el folículo (Figura 7 C). También se encuentra rodeando al folículo, una delgada capa de tejido conectivo con fibroblastos (células grandes y muy alargadas con núcleo voluminoso), vasos sanguíneos y fibras de colágeno (Figura 7 B). En los cortes histológicos de todas las hembras analizadas también se pueden diferenciar folículos atrésicos en diferentes grados de desarrollo pertenecientes a folículos atrésicos pre-vitelogénicos, donde se observó que la atresia se caracteriza por la compactación de la cromatina y desintegración del núcleo, volviéndose irregular y con la envoltura nuclear pareciendo ser discontinua con la vacuolización del citoplasma (Figura 7 D). En folículos atrésicos vitelogénicos de algunas hembras ovulatorias y en las post-ovulatorias, se evidenció la etapa de pigmentación donde se puede observar un grado de pigmentación variable en el citoplasma de los mismos (Figura 7 E). La variación morfométrica de estos tipos celulares se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1.** Resumen de los valores morfométricos medidos en ovarios de hembras de *Rhinella bergi*.

	Conteo celular cada 100 células (10x)			
	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Juveniles(1)	ovulatorias(7)	post-ovulatorias(6)
Ovogonias	26,3 $\pm$ 12,1	11%	-	-
Nido de ovogonias	116,1 $\pm$ 50,7	1%	-	-
Folículos previtelogénicos	127,9 $\pm$ 69,4	71%	27%	81%
Folículos vitelogénicos	466,1 $\pm$ 113,8	-	44%	-
Folículos postvitelogénicos	822,3 $\pm$ 170,5	-	20%	-
Folículos atrésicos	119,1 $\pm$ 78,5	17%	9%	19%

Valores expresados como media  $\pm$  desvío estándar y % porcentajes. ( ) n° de ejemplares correspondientes a cada categoría.

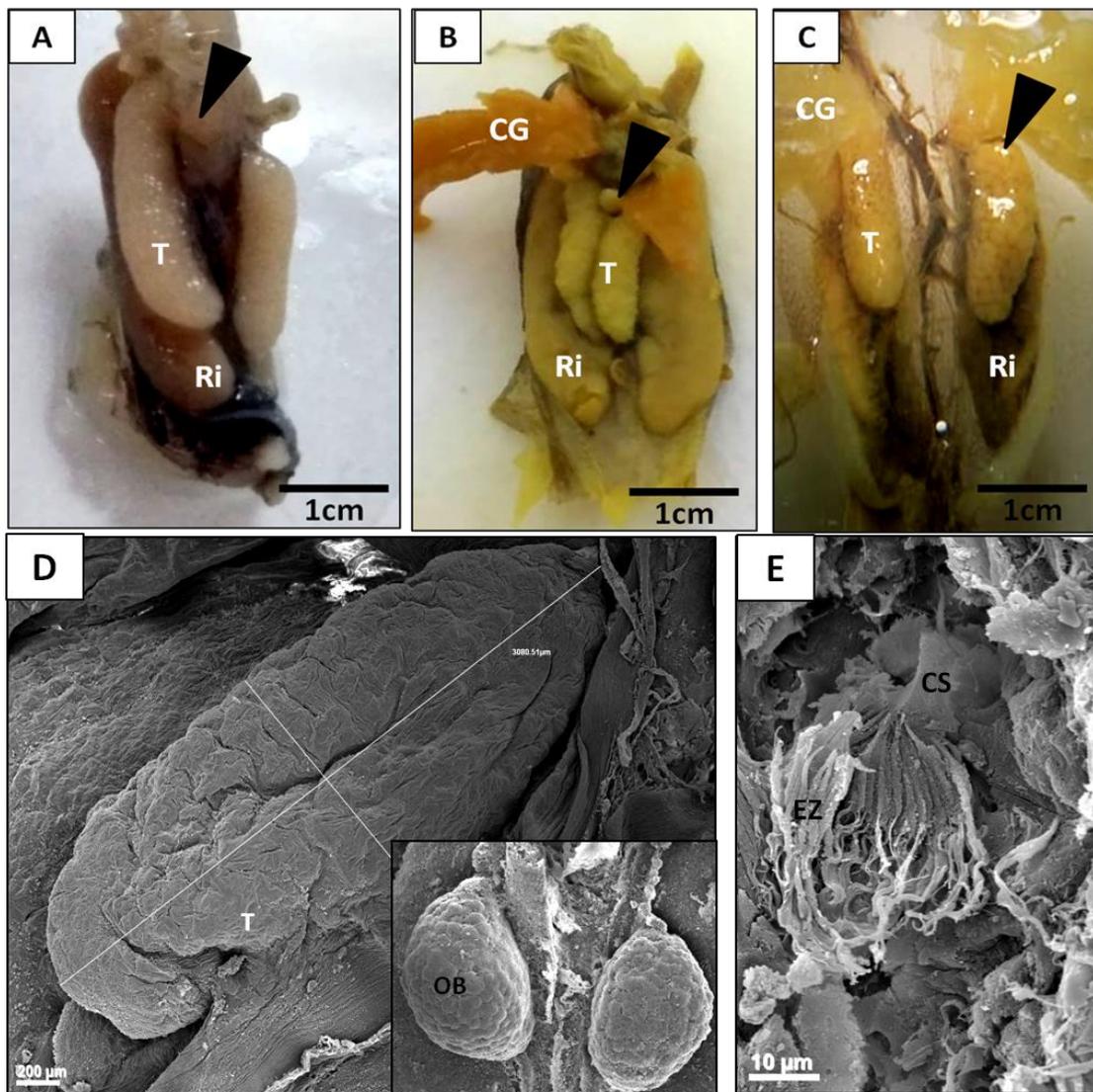


**Figura 7:** A- Detalle de folículos vitelogénicos y postvitelogénicos (Coloración H/E). B-C-Detalle de las células tecales y vascularización en folículos post-vitelogénicos de hembra ovulatoria (Coloración: Tricrómica de Mallory- H/E). D- Detalle de folículo pre-vitelogénico atrésico de hembra post-ovulatoria (Coloración: Hematoxilina-Eosina). E- Detalle de folículo vitelogénico atrésico de hembra ovulatoria (Coloración: PAS). **Referencias:** Cel Fol: células foliculares. Flecha: plaquetas vitelinas. Fol Atr: folículo atrésico. Fol previt: folículo pre-vitelogénico. Fol vit: folículo vitelogénico. Fol pvit: folículo post-vitelogénico. Punta de flecha amarilla: vasos sanguíneos y tejido conectivo. Punta de flecha negra: células tecales. **Magnificación:** (A):4x, (B, C, E):100x, (D):40x.

## Machos

### Testículos

Los testículos de *Rhinella bergi* se caracterizaron por ser órganos pares sin pigmentación externa; amarillentos y cilíndricos, con un tamaño promedio de  $2,3 \pm 1,2$  mm de largo y  $1,1 \pm 0,9$  mm de ancho. Asociados se encuentran los riñones y cuerpos grasos (Figura 8 A-C).



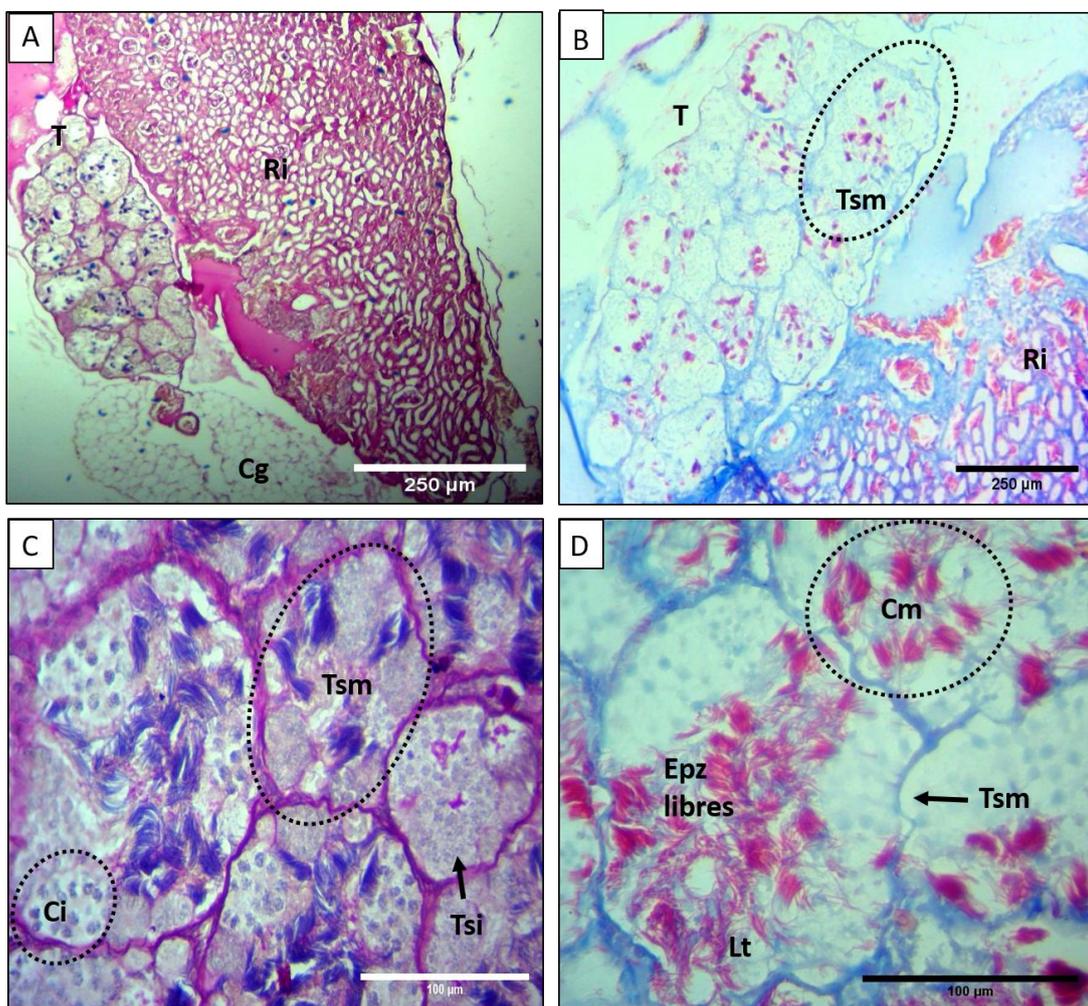
**Figura 8:** Detalle de los testículos juveniles de *Rhinella bergi* asociados al órgano de Bidder (A-B). C- Detalle de los testículos de individuos adultos de *R. bergi*. D- Microfotografía de MEB de los testículos con detalle del órgano de Bidder. E- Detalle microfotográfico de MEB de las matas de espermatozoides con su célula de Sertoli. **Referencias:** CG: cuerpos grasos. CS: célula de Sertoli. EZ: espermatozoides. OB: Órgano de Bidder. Punta de flecha: órgano de Bidder. Ri: riñón. T: testículos. **Magnificación:** (A-B-C): 2,5 x.

Rodeando a cada testículo, se evidencia la túnica albugínea constituida por tejido conectivo denso, la cual envía proyecciones o tabiques hacia el interior delimitando los túbulos seminíferos (Figura 11 A). En estas proyecciones de tejido conectivo intersticial se observa fibras de colágeno, músculo liso y vasos sanguíneos (Figura 9 B). Los túbulos seminíferos contienen a los cistos con las células germinales en diferenciación y al compartimento adluminal, en dirección hacia la luz del túbulo (Figura 9 D). Los cistos

incluyen una célula de Sertoli sobre la que se ubican las células sexuales en un mismo estadio de diferenciación (Figura 9 C). El tejido intersticial está compuesto por células intersticiales de Leydig, fibroblastos y vasos sanguíneos. (Figura 10 F).

#### *Túbulos seminíferos: espermatogénesis*

En todos los machos analizados (juveniles y adultos) se pudo observar que los testículos contienen diferentes tipos celulares organizados en túbulos seminíferos, donde cada túbulo presenta cistos en diferentes estados de desarrollo (Figura 9 A-C). Sin embargo, cada cisto internamente se encuentra integrado por células en el mismo estadio de la espermatogénesis: agrupaciones de espermatogonias en el compartimento basal del epitelio, (Figura 9 C), espermatocitos I, II (Figura 9 C, D), espermátidas y espermatozoides (Figura 9 D).



**Figura 9:** Microfotografía testicular de machos adultos de *Rhinella bergi*. A- Detalle de testículo junto a riñón y cuerpos grasos (Coloración: PAS). B- Detalle de testículo y túbulo seminífero maduro (Coloración: tricrómica de Mallory). C- Detalle de túbulos seminíferos maduro e inmaduro con cistos maduros e inmaduros (Coloración: PAS). D- Detalle de túbulos seminíferos maduros con la luz (Coloración: tricrómica de Mallory). **Referencias:** Cg: cuerpos grasos. Ci: cisto inmaduro. Cm: cisto maduro. Epz libres: espermatozoides libres. Lt: luz del túbulo seminífero. Ri: riñón. T: testículo. Tsm: túbulo seminífero maduro. Tsi: túbulo seminífero inmaduro. **Magnificación:** (A): 4x, (B): 10x, (C-D):40x

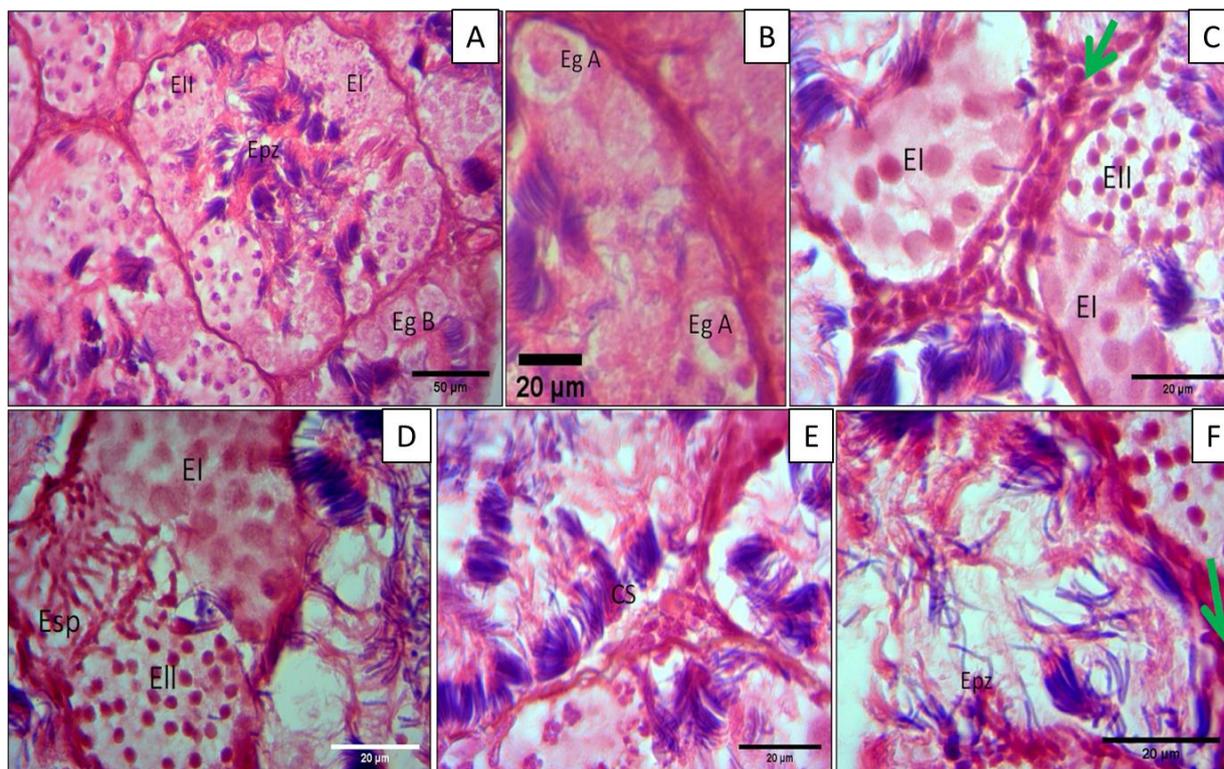
Las espermatogonias tipo A son las células germinales más grandes encontradas en el testículo. Tienen forma redonda a oval con un citoplasma hialino. Están caracterizadas por un núcleo esférico central prominente que contiene un único nucléolo (Figura 10 B). Las espermatogonias tipo B están agrupadas en espermatocistos, rodeadas por procesos citoplasmáticos de células de Sertoli. Se caracterizan por una forma redondeada y un núcleo esférico prominente que contiene un nucléolo, siendo más pequeñas en tamaño que tipo A (Figura 10 A, B).

Los espermatocitos primarios son similares en tamaño y forma a las espermatogonias tipo B. Presentan un citoplasma hialino y un núcleo esférico que difiere en apariencia según el estadio de la profase meiótica y contiene un nucléolo (Figura 10 A, C, D). Los espermatocitos secundarios presentan una disminución en el tamaño muy evidente cuando se los compara con estadios previos. El núcleo esférico está rodeado por un citoplasma pobremente distinguible (Figura 10 C, D).

Las espermatidas tempranas tienen núcleo esférico con hebras irregulares de cromatina densa (Figura 10 D). Los espacios entre las células dentro de los espermatocistos se vuelven cada vez más grandes y el núcleo cada vez más pequeño dado que la cromatina va condensándose (Figura 10 E), en algunos casos se las pudo observar en la luz de los túbulos junto con los espermatozoides (Figura 10 F).

Los espermatozoides son células flageladas, con núcleos alargados de cromatina compacta (Figura 10 E). Se los puede observar conformando matas o penachos asociados a la célula de Sertoli. La espermiación está acompañada por la separación del penacho de espermatozoides y la liberación de los mismos a la luz del tubo seminífero (Figura 10 F). Los espermatozoides son sostenidos en la luz por un entramado de tejido conectivo.

Las células de Sertoli adoptan distintas formas de acuerdo con el espacio disponible en el epitelio germinal y tienen un núcleo de forma triangular a poliédrico con un nucléolo excéntrico (Figura 10 E). Estas células se apoyan en una delgada membrana basal PAS positiva que limita los cistos del testículo, separándolos del compartimento intersticial (Figura 9 C).



**Figura 10:** Microfotografía de la configuración testicular de adultos de *Rhinella bergi* (Coloración: Hematoxilina-Eosina) A-F: Detalle de túbulos seminíferos maduros con cistos que contienen a los diferentes linajes celulares de la espermatogénesis. **Referencias:** CS: célula de Sertoli. Eg A: espermatogonias A. Eg B: espermatogonias B. E I: espermatoцитos primarios. E II: espermatoцитos secundarios. Esp: espermátidas. Epz: espermatozoides libres. Flecha verde: Célula de Leydig. **Magnificación:** (A): 40x (B-F):100x.

**Tabla 2.** Resumen de los valores morfométricos del diámetro de los cistos y túbulos seminíferos en testículos de machos de *Rhinella bergi*.

Diámetro ( $\mu\text{m}$ )				
<i>Juveniles</i>	<i>Cistos</i>		<i>Túbulos seminíferos</i>	
	$29,9 \pm 9,7$		$43,6 \pm 22,02$	
<i>Adultos</i>	<i>Inmaduros</i>	<i>Maduros</i>	<i>Inmaduros</i>	<i>Maduros</i>
	$58,9 \pm 11,3$	$40,19 \pm 10,9$	$32,09 \pm 8,5$	$199,5 \pm 46,7$

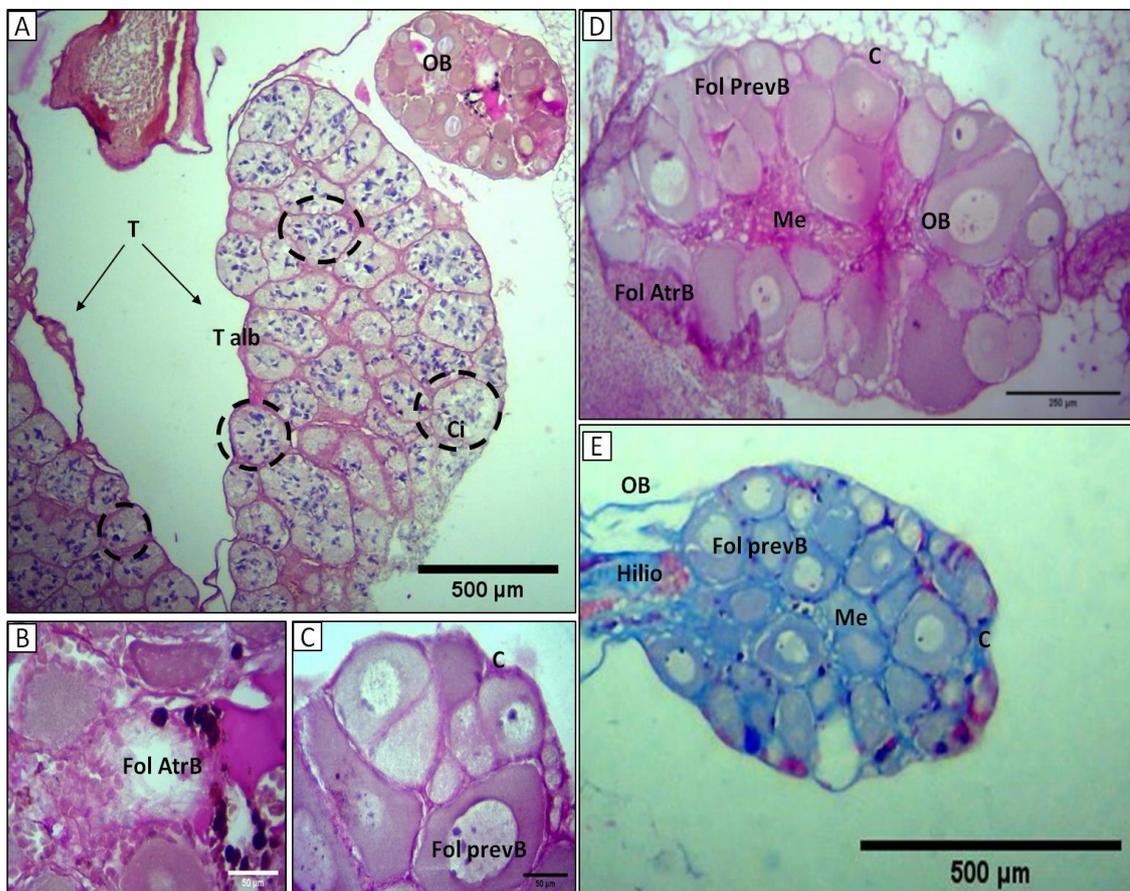
#### *Compartimento Intersticial*

Las células de Leydig son células ovales que se disponen en grupos en los espacios adyacentes entre túbulos cerca de los capilares. Los núcleos esféricos contienen un nucléolo periférico. El citoplasma se presenta típicamente acidófilo y finamente granular. (Figura 10 C). Las células mioides son

el tipo celular más abundante en el compartimento intersticial. Ellas se encuentran en estrecha proximidad a las fibras colágenas, rodeando los túbulos seminíferos (Figura 10 F).

### Órgano de Bidder

El Órgano de Bidder (OB) se lo observó asociado a los testículos, situado en la región craneal de los mismos (Figura 8 A-D; Figura 11 A). Histológicamente consta de dos regiones bien delimitadas: una corteza y una región medular (Figura 11 D, E). En la corteza se observan ovocitos rodeados por células foliculares (folículos bidderianos), los cuales se encuentran en estadios previtelogénicos (Figura 11 C). En la región medular se observan vasos sanguíneos y tejido conjuntivo con contenido de fibras y en algunos casos células pigmentarias y folículos atrésicos (Figura 11 B, E). De los ejemplares analizados, se logró evidenciar inmunodetección positiva para la proteína de proliferación celular PCNA en ejemplares juveniles y adultos colectados en primavera (Figura 12 E) y folículos bidderianos positivos para la proteína Bax en machos con cistos maduros colectados en verano (Figura 13 E).



**Figura 11:** Detalle de testículo y Órgano de Bidder en macho adulto de *Rhinella bergi*. A- Microfotografía de testículos junto con Órgano de Bidder. B- Detalle de folículo atrésico del Órgano de Bidder. C-Detalle de folículo previtelogénico. (Coloración A-D: PAS). D, E- Vista general de Órgano de Bidder (Coloración: Tricrómica de Mallory). **Referencias:** Ci: cistos. Círculo punteado: túbulo seminífero. C: corteza. Fol AtrB: folículo atrésico (bidderiano) Fol PrevB: folículo previtelogénico (bidderiano). Me: médula. OB:Órgano de Bidder. T: testículos. T alb: túnica albuginea. **Magnificación:** (A-E): 4x, (B):100x, (C): 40x, (D): 10x.

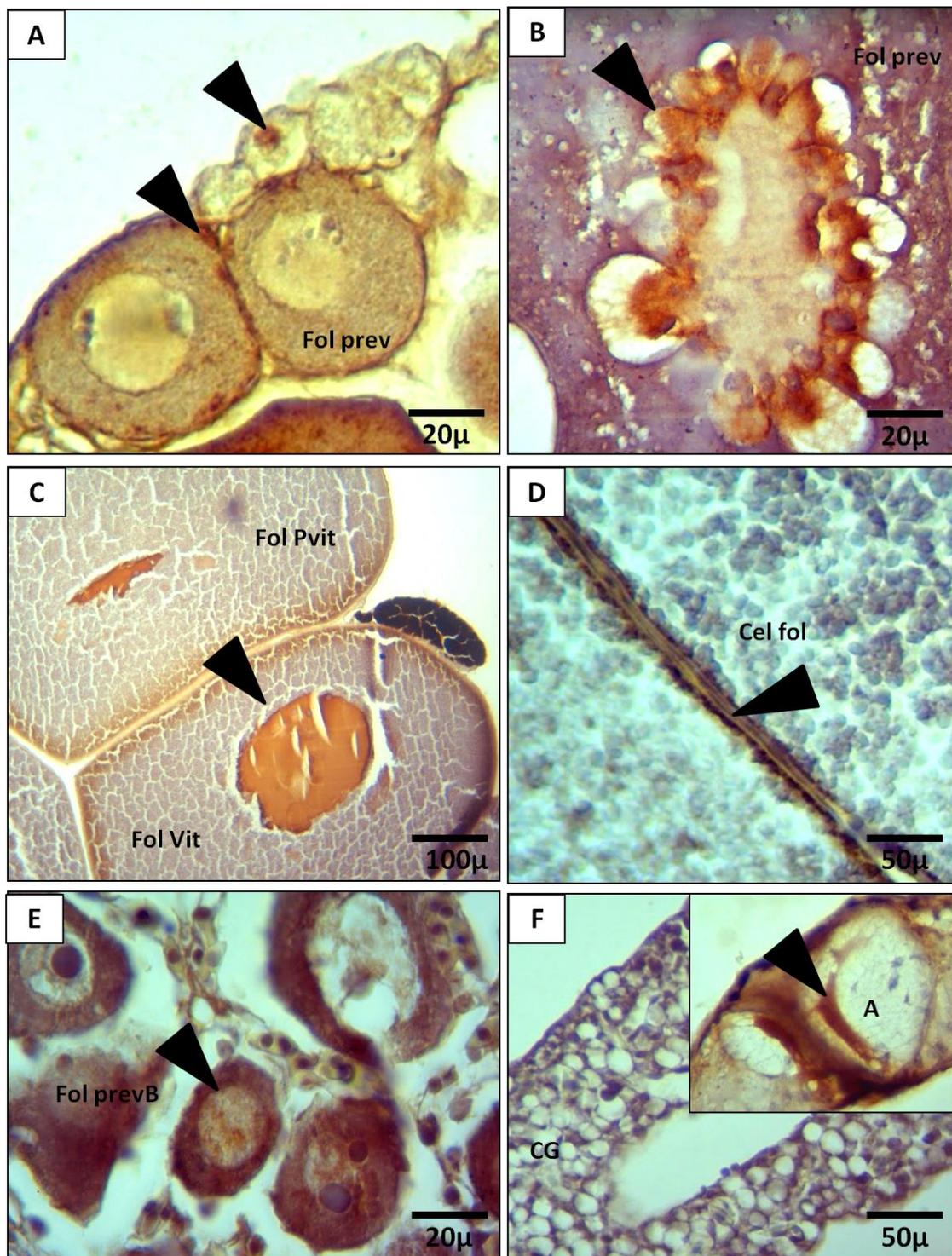
### *Cuerpos grasos*

Son estructuras con íntima relación topográfica y funcional con ovarios y testículos. Están estructurados en lóbulos de aspecto espumoso y macroscópicamente se observan variaciones de color amarillo (Figura 8 B, C). Histológicamente, el tejido adiposo corresponde a grasa blanca donde se identifican núcleos periféricos y aplanados, vasos sanguíneos y cubierta de epitelio plano (Figura 9 A). Se logró evidenciar actividad mitótica de los adipocitos en ejemplares juveniles de ambos sexos mediante la inmunomarcación positiva para PCNA (Figura 12 F).

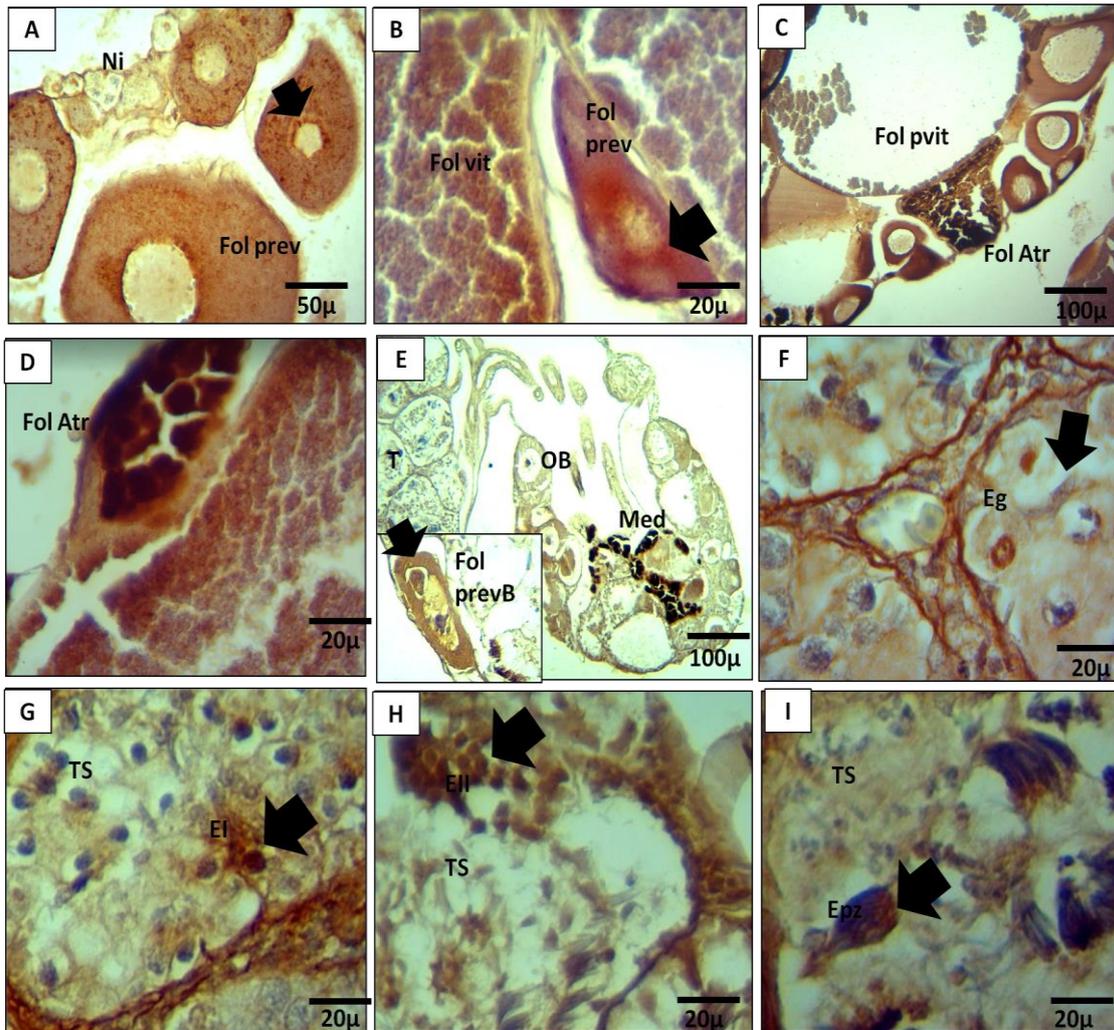
### **Análisis de la proliferación y muerte celular durante la gametogénesis**

En las hembras el crecimiento de los ovocitos se da en simultáneo con el crecimiento y la proliferación de las células del folículo, donde dicho evento se evidenció a partir de la inmunodetección positiva de la proteína de proliferación celular PCNA en los ovogonias en nidos, folículos primordiales y folículos primarios (Figura 12 A), con un IP de 87% en hembras juveniles y 74% adultas ovulatorias recolectadas en primavera. Durante la etapa de folículo pre-vitelogénico temprano donde el ovocito se encuentra previo a la etapa de diplotene, no se evidencia inmunodetección para dicha proteína (Figura 12 A). La proteína PCNA vuelve a presentar inmunomarcación positiva cuando el ovocito previtelogénico aumenta el número de nucléolos, y se produce la transición a folículos vitelogénicos y post-vitelogénicos en hembras ovulatorias recolectadas en verano (Figura 12 B-C) presentando un IP de 82%. En las células foliculares y tecaes se observó actividad de proliferación independiente al estadio del ovocito en todos los folículos (Figura 12 D), excepto en folículos atrésicos.

En cuanto al proceso de muerte celular, en los ovarios de todas las hembras analizadas se pudo evidenciar una variación en cuanto a la inmunodetección positiva de las proteínas Bax-Bcl-XL, pudiéndose observar en hembras juveniles folículos atrésicos provenientes de folículos pre-vitelogénicos (Figura 13 A-B), presentándose un IA de 10% en hembras juveniles. En las hembras adultas se evidenció inmunomarcación positiva en folículos atrésicos previtelogénicos y vitelogénicos para las proteínas Bax (Figura 13 C-D), observándose un incremento en el índice apoptótico desde las hembras ovulatorias 22% a las hembras post-ovulatorias 45%.

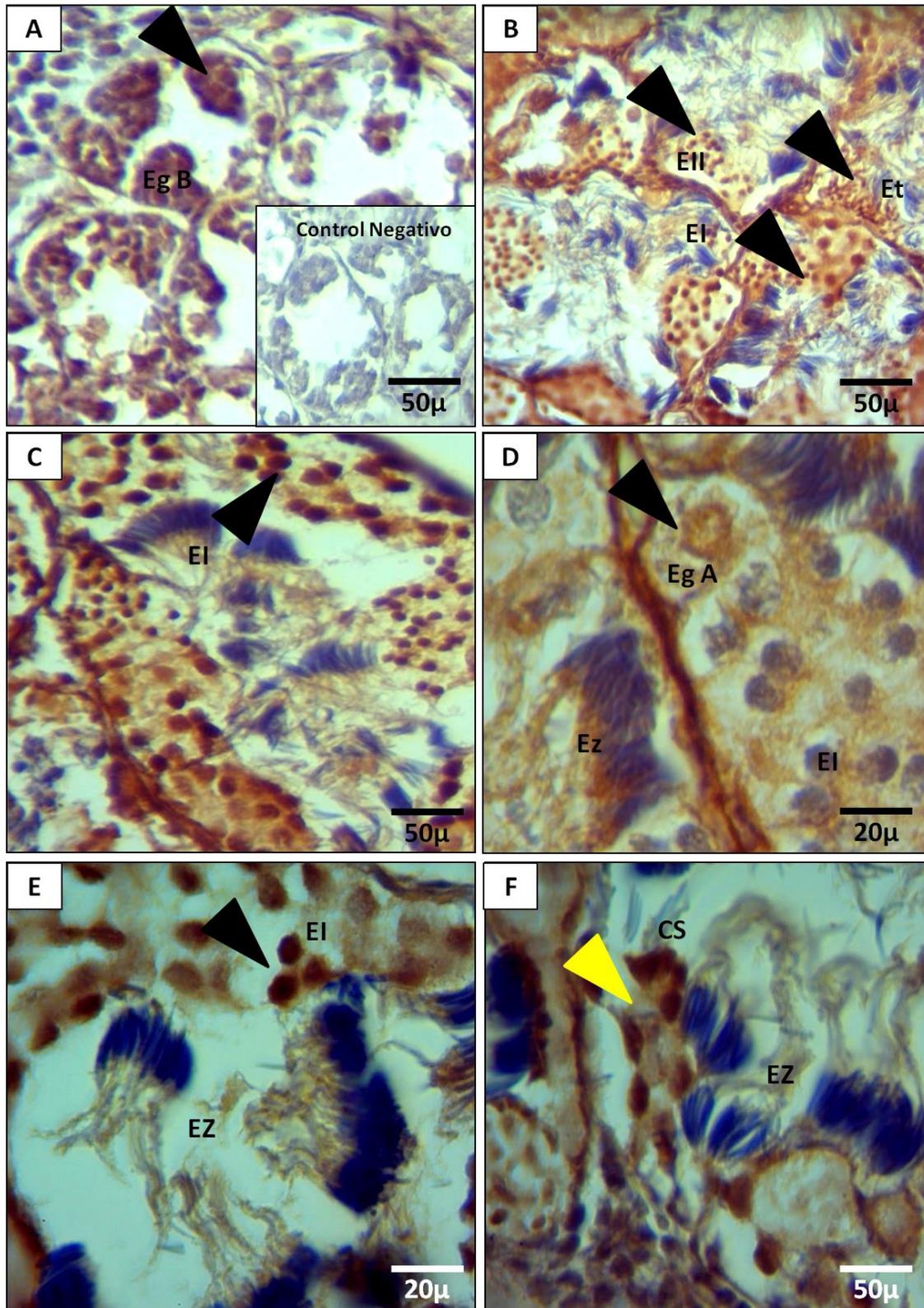


**Figura 12:** Inmunomarcación de la proteína de proliferación celular PCNA determinada por IHQ en cortes de ovarios de *Rhinella bergi* juvenil (A) y adultas (B-D) y en órgano de Bidder (E) y cuerpos grasos (F). **Referencias:** A: adipocito. CG: cuerpos grasos. Cel fol: células foliculares. Fol prev: folículo pre-vitelogénico. Fol prevB: folículo pre-vitelogénico bidderiano. Fol Vit: folículo vitelogénico. Fol Pvit: folículo post-vitelogénico. Punta de flecha negra: células con inmunomarcación positiva para PCNA. **Magnificación:** (C): 10x; (A-F): 100x.



**Figura 13:** Inmunomarcación de las proteínas Bcl-XL (A) y Bax (D-F) determinada por IHQ en cortes de ovarios de *Rhinella bergi* juvenil (A) y adulta (B-D) y en órgano de Bidder (E) y testículos juveniles (F-G) y adultos (H-I). **Referencias:** Flecha negra: células con inmunomarcación positiva para BCL-XL y Bax. Eg: espermatogonia. EI: espermatocono primario. EII: espermatocono secundario. Epz: espermatozoides en penachos. Fol. prev: folículo pre-vitelogénico. Fol vit: folículo vitelogénico. Fol pvit: folículo post-vitelogénico. Fol Atr: folículo atrésico. Fol prevB: folículo pre-vitelogénico bidderiano. T: testículo. OB: órgano de Bidder. Med: Médula. Ni: nido de ovogonias. TS: túbulo seminífero. **Magnificación:** (A, C, E): 10x; (B, D- I): 100x.

En el caso de los machos, la proliferación de las células de la línea germinal se observó tanto en ejemplares juveniles como en adultos a partir de la inmunodetección positiva de la proteína de proliferación celular PCNA presente en todos los tipos celulares de la línea germinal (Figura 14 A-F), con un IP de 71% en cistos de juveniles recolectados en primavera y un IP de 87% en cistos de machos adultos de primavera (14% espermatogonias, 73% espermatoconos I) y del 92% en cistos de machos adultos de verano (61% espermatogonias, 31% espermatoconos I). En cuanto a las células de Sertoli se las pudo evidenciar en división mitótica sólo durante la espermatogénesis temprana (Figura 14F) presentando inmunodetección positiva para PCNA.



**Figura 14:** Inmunomarcación de la proteína de proliferación celular PCNA determinada por IHQ en cortes de testículo de *Rhinella bergi* e individuos juveniles (A) y en adultos (B) con detalle de los distintos tipos celulares de la línea espermatogénica (C-E) y de las células de Sertoli (F). **Referencias:** CS: células de Sertoli. Eg A: espermatogonia A. Eg B: espermatogonia B. EI: espermatocito primario. EII: espermatocito secundario. Et: espermátida. Ez: espermatozoides. Punta de flecha negra: células con inmunomarcación positiva para PCNA. Punta de flecha amarilla: células de Sertoli con inmunomarcación positiva para PCNA. **Magnificación:** (C): 40x; (A-F): 100x.

En cuanto al proceso de muerte celular, en los testículos de todos los machos analizados se pudo evidenciar una variación en cuanto a la inmunodetección positiva de las proteínas Bax/Bcl-XL, observándose en machos juveniles espermatogonias y espermatocitos I Bax positivas, con un IA de 5% (Figura 13 F, G) . En los machos adultos se evidenció inmunomarcación positiva para Bax en espermatocitos secundarios y espermatozoides en penachos (Figura 13 H, I) con un IA en adultos de 8% en primavera y de 16% en verano.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo permitió evidenciar que *Rhinella bergi* presenta un sistema reproductor semejante al descrito para otras especies de anuros de la familia Bufonidae. La ubicación y características externas tanto de los ovarios como de los testículos de los ejemplares analizados coinciden con lo descrito por otros autores para los anuros (Cajade et al., 2010; Carezzano et al., 2013; Curi et al., 2014; Dias et al., 2017; Montezol et al., 2018; Olea et al., 2021). En todos los casos son órganos pares, asociados a cuerpos grasos y con gran vascularización, situados en la cavidad abdominal. La forma de los ovarios varía de acuerdo al momento reproductivo en el que se encuentre la hembra, tal como se describe en el presente trabajo. Para el caso de los machos los testículos son de forma ovoide sin pigmentación en la túnica albugínea.

La ovogénesis en anfibios es un proceso que varía según las especies resultando en diferentes tamaños y número de ovocitos formados. Estas variaciones reflejan la necesidad de adaptarse a los distintos ambientes en que deben poner sus huevos y así asegurar su desarrollo para perpetuarse (Del Pino, 1989). Estas diferencias concuerdan con los diversos patrones de reproducción observados en las especies de anfibios, algunos de los cuales revelan un rápido desarrollo temprano, por ejemplo, *Xenopus laevis* (Dumont, 1972), *Rana pipiens* (Kessel et al., 1972), *Bufo arenarum* (Toledo y Pisanó, 1980), *Ceratophrys cranwelli* (Villecco et al., 2002) y otros más lento, por ejemplo, *Gastrotheca riobambae* (del Pino et al., 1986), *Flectonotus pygmaeus* (Del Pino et al., 1978).

En los anfibios, el ovario contiene ovogonias que pueden generar una nueva cohorte de ovocitos cada temporada reproductiva. Cuando las ovogonias entran en la primera división meiótica, se convierten en ovocitos primarios. En esta etapa, los ovocitos avanzan a través de la profase I meiótica y permanecen detenidos en la etapa de diplotene (Jørgensen, 1992). Los ovocitos primarios se someten a un complejo proceso de citodiferenciación y división que da como resultado la producción del gameto de la hembra. Este proceso se puede dividir en tres etapas principales: pre-vitelogénesis, vitelogénesis y post-vitelogénesis o madurez. La ovogénesis en *R. bergi* es un proceso continuo y los ovocitos en todas las etapas del desarrollo se encuentran dispersos en el ovario. Esta arquitectura ovárica si bien coincide con lo propuesto por Curi et al. (2014) y Olea et al. (2021), sin embargo, otros autores han descrito que en el ovario los ovocitos se distribuyen en dos zonas: una zona proximal que contiene ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos, y una zona distal con ovocitos vitelogénicos y completamente desarrollados (Villecco et al., 2002). En el presente estudio se pudo dividir la ovogénesis de *R. bergi* en tres etapas fundamentales: previtelogénesis, vitelogénesis y post-vitelogénesis. Asimismo, los ovarios y los cuerpos grasos, presentaron cambios morfológicos durante su ciclo reproductivo. El análisis histológico reveló distintos tipos celulares: nidos de ovogonias, folículos primordiales, folículos previtelogénicos, vitelogénicos, post-vitelogénicos y atrésicos. Con las tinciones empleadas (H/E, Tricrómica y PAS) se observó que el vitelo presenta variaciones en cuanto a su coloración: pigmentación más oscura cercana al polo animal y coloraciones más claras en el polo vegetal. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por otros autores para la foliculogénesis en anuros (Pucci Alcaide et al., 2012; Curi et al., 2014; Olea et al., 2021). La vitelogénesis es continua y el vitelo ocupa progresivamente todo el citoplasma. El ovocito y su núcleo experimentan un aumento de tamaño durante el desarrollo

folicular, especialmente en los ovocitos de la primera y segunda fase de crecimiento. Esta relación entre el núcleo y el tamaño del ovocito se describió en *Rana cyanophlyctis* (Pancharatna y Saidapur, 1992).

Algunos de los ovarios analizados tanto en hembras juveniles como adultas presentaron folículos atrésicos, tanto para su estado pre-vitelogénico, vitelogénico y post-vitelogénico, los cuales presentaron inmunopositividad para la proteína Bax. Dicho proceso es común en los ovarios de los anuros, en los cuales se observa que durante el proceso de ovulación, no todos los folículos llegan a pasar al oviducto (Pucci Alcaide et al., 2012; Curi et al., 2014; Olea et al., 2021). El crecimiento de los ovocitos procede simultáneamente con el crecimiento y la proliferación de las células del folículo. Ambos experimentan una secuencia de cambios altamente coordinados asociado al crecimiento del folículo y diferenciación de las células foliculares y tecales, esenciales para la producción de un folículo viable.

Los anfibios son un apropiado modelo biológico para estudiar las interacciones que tienen lugar en los folículos ováricos ya que pasan por diferentes períodos (previtelogénicos, vitelogénicos y maduración) durante el cual ocurren procesos relacionados con el crecimiento de los ovocitos y la maduración. Las células foliculares participan en una serie de eventos regulados por gonadotropinas, involucrados en el crecimiento de ovocitos de anfibios y maduración como esteroidogénesis, inicio de la absorción de la proteína de la yema vitelina, formación de envoltura y transferencia de ARN (Szydłowski et al., 2017).

Los cambios propios del órgano y el estadio diferenciación de las células de la línea germinal y las células acompañantes (Sertoli en machos y foliculares y tecales en hembras) fueron significativos para evidenciar la proliferación y muerte celular durante la gametogénesis de la especie en estudio, como así también, la proliferación de las células de Sertoli y foliculares y/o tecales. En este estudio se observó que el proceso de muerte celular asociado a la atresia folicular se da tanto en hembras juveniles como adultas. Los folículos en degeneración en anfibios sexualmente maduros fueron descritos en especies pertenecientes a Urodela (Uribe 2009), Gymnophiona (Exbrayat, 2009; Brun et al., 2017) y Anura (Ogielska y Bartmanska, 2009; Szydłowski et al., 2017), y en ocasiones han sido designadas como cuerpos atrésicos o cuerpos post-ovulatorios (Perry et al., 1976). La degeneración de ovocitos en diplotene se informó principalmente como la respuesta fisiológica de un organismo femenino a varios estreses, como la escisión de cuerpos grasos o el cautiverio a largo plazo en *Rana cyanophlyctis* (Pancharatna y Saidapur, 1992), inanición en *Xenopus laevis* (Dumont, 1972) y hacinamiento en cautiverio en *Bufo bufo* (Jørgensen, 1992). Este último autor sugirió que los cambios en las condiciones ambientales conducen a una disminución del nivel circulante de gonadotropina; esto a su vez puede ser una respuesta indirecta del sistema nervioso central a un entorno anormal. Sin embargo, estos autores no describieron la morfología de ovocitos en degeneración debido a que consideraron sólo la presencia de vesículas pigmentadas negras como folículos atrésicos. En el presente trabajo se logró evidenciar folículos atrésicos en las etapas pre-vitelogenica, vitelogénica y post-vitelogénica. En la etapa inicial se pudo observar que la atresia se caracteriza por la desintegración del núcleo, compactación de la cromatina volviéndose irregular y con la envoltura nuclear pareciendo ser discontinua. Este proceso se observó tanto en juveniles como en adultas. En una etapa más avanzada se observó gran vacuolización en el citoplasma. Finalmente, en algunas hembras ovulatorias y en post-ovulatorias se observó la etapa

de pigmentación. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Ogielska y Bartmanska (2009) para *Rana temporaria*, *Rana lessonae* y *Rana ridibunda*.

Histológicamente para el caso de los machos, se pudo observar que la espermatogénesis en *R. bergi* es similar a la descrita para otros anuros (de Oliveira et al., 2002; de Oliveira et al., 2003; Curi et al., 2014). Los espermatoцитos I generalmente se observan en la profase de la primera división meiótica, con diferentes niveles de condensación de la cromatina. Al final de la espermatogénesis, los espermatozoides permanecen unidos en los penachos, todavía sostenidos por células de Sertoli. Sin embargo, con su liberación a la luz del túbulo seminífero estos permanecen allí hasta que son liberados al exterior durante el amplexo. La disposición de la línea espermatogénica organizada en cistos con células en un mismo estadio de diferenciación fue observada en otros anuros, lo cual demuestra la conservación de esta estructura también descrita en el resto de los anamniotas (Curi et al., 2014; Olea et al., 2021).

Respecto a lo observado en el órgano de Bidder, se describió para *R. arenarum* que el volumen es mayor en aquellos animales que se encuentran en el período reproductivo en comparación con aquellos de animales de la estación no reproductiva (Scaia, 2015). En los machos de *Rhinella bergi* se observó la proliferación del órgano de Bidder en ejemplares de primavera, y atrofia y degeneración en los ejemplares de verano. Estos resultados concuerdan con lo expuesto para *R. arenarum*.

En cuanto a los eventos de proliferación celular, PCNA es una proteína nuclear altamente conservada y es un componente esencial en la replicación y reparación del ADN. Es por ello que es uno de los marcadores moleculares más utilizados para el estudio de la mitosis y meiosis del epitelio germinal. En el presente trabajo se observó inmunomarcación positiva en las espermatogonias y espermatoцитos I, como así también en células de Sertoli. Con respecto a las variaciones estacionales, la máxima expresión de PCNA en las espermatogonias se evidenció en los ejemplares de verano, mientras que en los espermatoцитos I se dio en primavera. Vincent et al., (1998) y Sette et al., (2004) adjudican la presencia de PCNA en los espermatoцитos I al hecho de que esta proteína además de estar involucrada en la replicación del ADN, también participa en su reparación. Estos resultados sugieren que la máxima proliferación durante el período reproductivo está asociada a altos niveles de PCNA.

La apoptosis en el testículo está relacionada con el equilibrio entre el número de células germinales y la capacidad de soporte de las células de Sertoli, y es por ello que el estudio de las variaciones estacionales en la espermatogénesis en anfibios está íntimamente relacionado con la apoptosis en la línea germinal (Scaia et al., 2016). En el presente trabajo, la muerte celular programada en cistos maduros fue confirmada mediante la inmunomarcación positiva de Bax y Bcl-XL en espermatogonias y espermatoцитos I. De este modo, en la especie en estudio se observaron elevados índices apoptóticos en los cistos en período reproductivo hacia finales de primavera y durante el verano, lo cual concuerda con lo propuesto por Sasso-Cerri et al. (2006) para anuros de regiones tropicales.

Teniendo en cuenta los resultados y en concordancia con lo propuesto por Scaia et al. (2016) para *R. arenarum*, se sugiere que los espermatoцитos que no alcanzan a diferenciarse en espermatozoides durante el período reproductivo mueren por apoptosis en el período post-reproductivo. De este modo, y

dado que la proliferación de espermatogonias es máxima en la temporada reproductiva, los espermatozoides del año siguiente serían consecuencia de esta nueva onda espermatogénica. Además, podría ocurrir que haya una disminución de los factores regulatorios y la apoptosis podría actuar como un mecanismo de control. Por lo que los resultados expuestos en este trabajo sugieren que la apoptosis en los espermatocitos y espermátidas contribuye a eliminar los cistos que no alcanzaron a formar espermatozoides, mientras que las espermatogonias positivas para PCNA son las que iniciarán un nuevo ciclo espermatogénico en el próximo período reproductivo.

Para el caso de las hembras, en *Xenopus laevis* durante el inicio de la foliculogénesis se ha reportado una proliferación intensiva de células somáticas y de ovogonias positivas para PCNA, las cuales quedan encerradas por una monocapa de células epiteliales celómicas aplanadas (Piprek et al., 2017). Esto concuerda con lo observado en *Rhinella bergi*. Asimismo, en comparación con estudios en otros grupos de anamniotas (Korfsmeier, 2002), se determinó la presencia de PCNA en núcleos de ovogonias y ovocitos en profase meiótica, detallando una fuerte positividad durante los eventos de amplificación de los genes del ARNr, momento en donde aparecen numerosos nucléolos en el carioplasma periférico. En concordancia con lo propuesto por Korfsmeier (2002) y Thomé et al. (2012), se atribuye dicha marcación de PCNA durante la meiosis a la amplificación del ARNr y a la función que desempeña PCNA en la reparación y revisión del ADN sintetizado, asegurando el éxito del desarrollo folicular.

En cuanto al proceso de muerte celular, usando la tinción inmunohistoquímica de caspasa-3 activa, Szydłowski et al. (2017) han demostrado que las células de la línea germinal de *Pelophylax* degeneran por muerte celular programada. Las células germinales apoptóticas que se detectaron en las gónadas de dicha especie fueron ovogonias en nidos, así como ovocitos en diplotene y folículos previtelogénicos tempranos. Del mismo modo evidenciaron un patrón diferente de tinción de caspasa-3 activa confinado al citoplasma que rodea el núcleo celular ("tinción circular"), pero dicha marcación se da en células que no mostraron ninguna característica de degeneración, por lo cual no pueden confirmar que estén comprometidas con la apoptosis. En contraste y concordancia con la descripción morfológica dada anteriormente, este estudio ha demostrado que las células de la línea germinal de *Rhinella bergi* están dirigidas a la muerte celular programada durante el desarrollo folicular, evidenciándose marca positiva para la proteína Bax en ovogonios en nidos y folículos previtelogénicos y vitelogénicos en proceso de atresia folicular. La elección de la proteína de muerte celular Bax, en vez de Caspasa-3 activa, se debió a que la activación de caspasa-3 sin entrar en la vía apoptótica se describió previamente en células madre embrionarias de ratón como un factor crucial que lleva a las células desde el estado de autorrenovación a la diferenciación (Fujita et al., 2008).

A partir de estos resultados se hace evidente que tanto la proliferación como la apoptosis, son procesos complejos que involucran diversas proteínas y mecanismos moleculares. La activación diferencial de cada uno de ellos en distintos estadios de la gametogénesis determina el balance entre proliferación celular y apoptosis. De este modo, resulta casi imposible estudiar la gametogénesis en anfibios sin hacer referencia a las variaciones estacionales en la proliferación y apoptosis gamética.

## CONCLUSIONES

- Las características anatómicas, tanto como la gametogénesis y los procesos de proliferación celular y muerte que subyacen a dichos eventos en *Rhinella bergi* concuerdan con lo propuesto para otros miembros analizados de la familia Bufonidae.
- La proliferación celular durante la ovogénesis ocurre principalmente en hembras juveniles y ovulatorias de primavera.
- La apoptosis en el ovario es más frecuente en ovarios de hembras post-ovulatorias, donde se observó un predominio de folículos atrésicos. Dichas hembras corresponden a ejemplares colectados en verano.
- La proliferación celular durante la espermatogénesis se da en espermatogonias y espermatocitos I. Con un mayor índice proliferativo de espermatogonias en primavera.
- La apoptosis en el testículo es significativamente mayor en el período comprendido entre los meses de enero y marzo, con mayor incidencia en testículos de individuos correspondientes a meses de verano. Al analizar cuáles son los estadios de la espermatogénesis que sufren muerte celular, se observó que la apoptosis ocurre en los espermatocitos I, II y en las espermátidas.
- El órgano de Bidder presenta actividad proliferativa en primavera y actividad asociada a eventos de muerte celular en verano.

Los resultados del presente trabajo sirven como base para la posterior caracterización del ciclo reproductivo en *Rhinella bergi* y proporcionan información que sienta antecedente sobre el análisis de la actividad gametogénica por IHQ a partir del estudio de la expresión de la proteína de proliferación celular PCNA y muerte celular (Bax-Bcl-XL). Debido a ello, futuros análisis se concentrarán en la evaluación del ciclo reproductivo en la especie mencionada, tanto en ovarios y testículos como órgano de Bidder, a fin de comparar y correlacionar con resultados obtenidos en este estudio.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este Trabajo Final de Graduación (TFG) fue posible gracias al financiamiento otorgado por la SGCyT-UNNE (PI18B005) Res. 1100/18 CS. y por el otorgamiento de la Beca de Pregrado de la SGCyT-UNNE Res. 459/2020 CS, ambos dirigidos por la Dra. Carolina Flores Quintana. Los especímenes analizados en este trabajo fueron colectados en el marco de un proyecto aprobado por la SGCyT- UNNE (código de identificación: 12F004) con la denominación: "Historia Natural de Anfibios y Reptiles del Nordeste Argentino". Además, se contó con el apoyo institucional de la cátedra de Morfología (FaCENA-UNNE) a cargo de la Bioq. Natalia Serrano. LIBIM (FMed-UNNE) dirigido por la Dra. Ma. Victoria Aguirre, laboratorios donde se realizaron algunas de las metodologías llevadas a cabo durante este TFG.

Un especial agradecimiento a la Dra. Carolina Flores Quintana por brindarme el espacio y acompañamiento necesario para la realización de este TFG. Al Lic. Jorge Céspedes por brindar su colaboración en la colecta y determinación del material de estudio y a los integrantes de la Cátedra de Histología Animal (FaCENA-UNNE) y Cátedra de Histología y Embriología (Fvet-UNNE) por su incesante ánimo durante esta tarea.

## BIBLIOGRAFÍA

- AmphibiaWeb. 17 de noviembre de 2021. *Especies de anfibios en cifras*. Obtenido de AmphibiaWeb: <https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M. y Lajmanovich, R. C. 2005. Anfibios presentes en la soja e implicaciones para el control biológico en Argentina. *Agricultura, ecosistemas y medio ambiente*, 106 (4), 389-394.
- Blaustein, A. R., Belden, L. K. y Olson, D. H. 2002. Fenología de los anfibios y cambio climático. Los efectos del calentamiento climático en el tiempo estacional de las actividades de animales y plantas están recibiendo cada vez más. *Biología de la conservación*, 16 (6), 1454-1455.
- Boyer, R. y Grue, C. E. 1995. La necesidad de criterios de calidad del agua para las ranas. *Perspectivas de salud ambiental*, 103 (4), 352-357.
- Brun, C., Raquet, M.A., Measey, G. J. y Exbrayat, J. M. 2017. Variación cíclica de la estructura del oviducto de *Boulengerula taitana*, una especie ovípara de Gymnophiona: cambios morfológicos, proliferación y apoptosis. *Revista africana de herpetología*, 66 (2), 93-105.
- Cajade, R., Schaefer, E. F., Duré, M.I., Kehr, A. I. y Marangoni, F. 2010. Biología reproductiva de *Argenteohyla siemersi pedersenii*. Williams y Bosso, (Anura: Hylidae) en el noreste de Argentina. *Revista de Historia Natural*, 44 (31-32), 1953-1978.
- Carezzano, F., Urquiza, S., Dorflinger, K., y Alonso, M. 2013. Testicular morphohistology of *Ceratophrys ornata* (Bell) (Amphibia, Anura, Ceratophryidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 103, 190-194.
- Chieffi, P., Franco, R., Fulgione, D., Staibano, S. 2000. PCNA in the testis of the frog, *Rana esculenta*: a molecular marker of the mitotic testicular epithelium proliferation. *Gen Comp Endocrinol*. 119: 11-16.
- Croteau, M.C., Hogan, N., Gibson, J.C., Lean, D. y Trudeau, V. L. 2008. Amenazas toxicológicas para anfibios y reptiles en entornos urbanos. *Herpetología urbana*, 197-209.
- Curi, L. M., G., Olea, B. B., Álvarez, J. A., Céspedes y D. M., Lombardo. 2014. Reproductive aspects of *Dendropsophus sanborni* (Anura, Hylidae) in northeastern Argentina. *Iheringia. Série Zoologia*, 104(4): 432-43.
- Curi, L. M. 2019. Impacto de las actividades agroindustriales en la reproducción de anuros (Amphibia) del litoral mesopotámico de Argentina. Tesis Doctoral. Repositorio UNNE. <https://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/27732>
- Curi, L. M., Cuzziol Boccioni, A. P., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Bassó, A., León, E. J., & Lajmanovich, R. C. (2022). Signals from predators, injured conspecifics, and pesticide modify the swimming behavior of the gregarious tadpole of the Dorbigny's Toad, *Rhinella dorbignyi* (Anura: Bufonidae). *Canadian Journal of Zoology*, 100(999), 19-27.
- De Oliveira, C., Zanetoni, C., Zieri, R., Oliveira, C., Zanetoni, C. y Zieri, R. 2002. Observaciones morfológicas en los testículos de *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chil. Anat*, 20 (3), 263-268.
- De Oliveira, C., Vicentini, C. A. y Taboga, S. R. 2003. Caracterización estructural de fenotipos nucleares durante la espermatogénesis de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Cariologia*, 56 (1), 75-83.

- Del Pino, E. M., y Humphries Jr, A. A. 1978. Multiple nuclei during early oogenesis in *Flectonotus pygmaeus* and other marsupial frogs. *The Biological Bulletin*, 154(2), 198-212.
- Del Pino, E. M., Steinbeisser, H., Hofmann, A., Dreyer, C., Campos, M., y Trendelenburg, M. F. 1986. Oogenesis in the egg-brooding frog *Gastrotheca riobambae* produces large oocytes with fewer nucleoli and low RNA content in comparison to *Xenopus laevis*. *Differentiation*, 32(1), 24-33.
- Del Pino, E. M. 1989. Modificaciones de la ovogénesis y el desarrollo en ranas marsupiales. *Desarrollo*, 107 (2), 169-187.
- Dias, T. M., dos Santos, T.G., Maragno, F.P., Oliveira, V.F., Lima, C. y Cechin, S.Z. 2017. Biología reproductiva, territorialidad y uso de sitios reproductivos por *Phyllomedusa iheringii* (Anura: Phyllomedusidae) de la Pampa Sudamericana en Brasil. *Salamandra*, 53 (2), 257-266.
- Duellman, W. E., Trueb, L., 1986. *Biology of Amphibians*, McGraw- Hill Book Company, New York 1986, p. 670.
- Dumont, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, 136(2), 153-179.
- Duré, I. M.; E. F, Schaefer, M. I., Hamman y A. I., Kehr. 2004. Consideraciones ecológicas sobre la dieta, reproducción y parasitismo de *Pseudopaludicola boliviana* (Anura, Leptodactylidae) de Corrientes, Argentina. *Phyllomedusa* 3(2):121-131.
- Elgue, E. y Maneyro, R. 2017. Biología reproductiva en una población uruguaya de *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Meneville, 1838) (Anura, Microhylidae). *Cuadernos de Herpetología*, 31.
- Exbrayat, J. M. 2009. Oogenesis and female reproductive system in amphibia-Gymnophiona. *Reproduction of Amphibians*, 305-342.
- Ferrara, D., Palmiero, C., Branno, M., Pierantoni, R. y Minucci, S. 2004. Actividad testicular de Mos en la rana, *Rana esculenta*: un nuevo papel en la proliferación de espermatogonias. *Biología de la Reproducción*, 70 (6), 1782-1789.
- Frost, D. R. 2018. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejoze, M., Kyba, M., Flavell, R. A. y Zwaka, T. P. 2008. Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 2(6), 595-601.
- Haddad, C. F., y Prado, C. P. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience*, 55(3), 207-217.
- Hamman, M. I., A., Kehr, C. E, Gonzáles, M., Duré, y E., Schaefer. 2009. Parasite and reproductive features of *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae) from *South American Subtropical area*. *Interciencia* 34(3):214-218.
- Herkovits, J. y Perez-Coll, C. S. 2003. Amphitox: un conjunto personalizado de pruebas de toxicidad que emplean embriones de anfibios. En Múltiples efectos estresantes en relación con la disminución de las poblaciones de anfibios. ASTM International.
- Hikim, A.P.S., Lue, Y., Diaz-Romero, M., Yen, P.H., Wang, C. y Swerdloff, R.S. 2003. Descifrando las vías de la apoptosis de células germinales en los testículos. *La Revista de bioquímica de esteroides y biología molecular*, 85 (2-5), 175-182.
- Izzo, G., Ferrara, D., Napolitano, F., Crispo, A. A., d'Istria, M., Aniello, F. y Minucci, S. 2011. Identificación de un cDNA que codifica para Ghrelin en el testículo de la rana *Pelophylax esculentus* y su

implicación en espermatogénesis. *Bioquímica y Fisiología Comparadas Parte A: Fisiología Molecular e Integrativa*, 158(4), 367-373.

- Jin, X., Cai, L., Wang, C., Deng, X., Yi, S., Lei, Z., y Dom, J. 2018. CASC2/miR-24/miR-221 modula la resistencia TRAIL de la célula hepatocelular del carcinoma con caspase-8/caspase-3. *Muerte celular y enfermedad*, 9(3), 1-12.
- Jørgensen, C. B. 1992. Crecimiento y reproducción. En M.E. Feder y W.W. Burggren (eds.). *Fisiología ambiental de los anfibios*. Universidad de Chicago, Chicago, EEUU.
- Kessel, R. G., y Decker, R. S. 1972. Cytodifferentiation in the *Rana pipiens* oocyte. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 126(1), 1-16.
- Korfmeier, K. H. 2002. PCNA in the ovary of zebrafish (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *Acta histochemica*, 104(1), 73-76.
- Maragno, F. P., y S. Z., Cechin. 2009. Reproductive biology of *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae) in the subtropical climate, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*, 99(3): 237-241.
- Martori, R., L., Aun, A., Birri, C., Rozzi Giménez y E., Heredia. 2010. Reproducción comparada de tres especies de anuros sintópicos de una localidad del sudeste de Córdoba. *Cuadernos de Herpetología*, 18: 12-15.
- Melchioris, J., M., Di-Bernardo, G. M. F., Pontes, R. B., de Oliveira, M., Solé. y A., Kwet. 2004. Reproduction of *Pseudis minuta* (Anura, Hylidae) in southern Brazil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 3(1): 61-68.
- Moncada, M. y C., Úbeda. 2020. Patrón de reproducción y ovipostura de *Pleurodema thaul* (Schneider, 1799) en poblaciones de la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes. *Boletín Chileno de Herpetología*, 7:12-19.
- Montero, R., y Autino, A. G. 2004. Sistemática y filogenia de los vertebrados, con énfasis en la fauna argentina. *Universidad Nacional de Tucumán, Argentina*.
- Montezol, M., Cassel, M., Silva, D., Ferreira, A. y Mehanna, M. 2018. Gametogénesis y dinámica reproductiva de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae): Influencia de factores ambientales y antropogénicos. *Acta Zoologica*, 99 (1), 93-104.
- Ogielska, M. y Bartmanska, J. 2009. Ovogénesis y aparato reproductor femenino en Amphibia-Anura. *Reproducción de anfibios. Enfield, New Hampshire: Science Publisher*, 153-272.
- Olea, G., Cheij, E., Curi, L. M., Boccioni, A.P.C., Céspedes, J.A. y Lombardo, D.M. 2019. Caracterización histológica e inmunohistoquímica del tegumento y glándulas paratoides *Rhinella bergi* (Anura: Bufonidae): Desarrollo y diferenciación. *Acta histochemica* , 121 (3), 277-283.
- Olea, G., Cheij, E., Boccioni, A.P.C., Rodríguez, F., Céspedes, J., y Lombardo, D. 2021. Gametogenesis and reproductive dynamics of *Scinax acuminatus* (Anura: Hylidae): morphological, histological and immunohistochemical analysis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93 (2): 3-11.
- Pancharatna, K. y Saidapur, S. K. 1992. Un estudio de la cinética folicular del ovario, el oviducto, el cuerpo graso y los ciclos de masa hepática en *Rana cyanophlyctis* mantenida en laboratorio en comparación con ranas capturadas en la naturaleza. *Revista de morfología*, 214 (2), 123-129.
- Pereira, L. 2004. Biología reproductiva de *Scinax fuscomarginatus* em um fragmento de cerrado no sudeste do Brasil (Doctoral dissertation, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho).

- Pereira, G., y R., Maneyro. 2012. Relaciones tamaño-fecundidad e inversión reproductiva en hembras de *Physalaemus riograndensis* Milstead, 1960 (Anura, Leiuperidae) en Uruguay. *El Diario Herpetológico*, 22(3):145-150.
- Perotti, M. G. 1997. Modos reproductivos y variables reproductivas cuantitativas de un ensamble de anuros del Chaco semiárido, Salta, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 70: 277-288.
- Perry, J. S., Heap, R. B., Burton, R. D., y Gadsby, J. E. 1976. Endocrinology of the blastocyst and its role in the establishment of pregnancy. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (25), 85-104.
- Piprek, R. P., Kloc, M., Tassan, J. P., y Kubiak, J. Z. 2017. Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. *Developmental biology*, 432(2), 298-310.
- Pombal Jr, J. P. 2007. Notas sobre predação em uma taxocenose de anfíbios anuros no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(3), 841-843.
- Pombal Jr, J. P., y Haddad, C. F. B. 2007. Estratégias e modos reprodutivos em anuros. *Herpetologia no Brasil II*, 101-116.
- Ponssa, M. L., y Candiotti, M. F. V. 2012. Patterns of skull development in anurans: size and shape relationship during postmetamorphic cranial ontogeny in five species of the *Leptodactylus fuscus* Group (Anura: Leptodactylidae). *Zoomorphology*, 131(4), 349-362.
- Pozzi, A. G., y Ceballos, N. R. 2000. Human chorionic gonadotropin-induced spermiation in *Bufo arenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 119(2), 164-171.
- Prado, C., Abdalla, F. C., Silva, A. P. Z. y Zina, J. 2017. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. *Journal of Morphological Sciences*, 21(4), 0-0.
- Pucci Alcaide, A., Ponssa, M. L., Pucci Alcaide, F. J., y Alcaide, M. F. 2012. Histología de ovario en hembras vitelogénicas de *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae). *Acta zoológica lilloana*, 56, 44-53.
- Pudney, J. 1995. Espermatogénesis en vertebrados nonmammalian. *Investigación y técnica de microscopía*, 32(6), 459-497.
- Rodrigues, D. J. M., Uetanabaro y F. S., Lopes. 2007. Breeding biology of *Phyllomedusa azurea* Cope, 1862 and *P. sauvagii* Boulenger, 1882 (Anura) from the Cerrado, Central Brazil. *Journal of Natural History*, 41(29-32):1841-1851.
- Salthe, S. N., y Duellman, W. E. 1973. Quantitative constraints associated with reproductive mode in anurans. *Evolutionary biology of the anurans*, 229-249.
- Santos, L. R. D. S., y C. D., Oliveira. 2007. Morfometría testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1): 64-70.
- Sasso-Cerri, E., De Faria, F. P., Freymüller, E., y Miraglia, S. M. 2004 changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(3), 249-260.
- Sasso- Cerri, E., Cerri., P. S., Freymüller, E., y Miraglia, S.M. 2006. Apoptosis durante el ciclo espermatogénico estacional de *Rana catesbeiana*. *Diario de la anatomía*, 209(1), 21-29.

- Scaia, M. F. 2015. Rol de los estrógenos en la fisiología testicular del sapo *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura) (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Scaia, M. F., Czuchlej, S. C., Cervino, N., y Ceballos, N. R. 2016. Apoptosis, proliferation and presence of estradiol receptors in the testes and Bidder's organ of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura). *Journal of morphology*, 277(4), 412-423.
- Scaia, M. F., Volonteri, M. C., Czuchlej, S. C., y Ceballos, N. R. 2019. Estradiol and reproduction in the South American toad *Rhinella arenarum* (Amphibian, Anura). *General and comparative endocrinology*, 273, 20-31.
- Sette, C., Dolci, S., Geremia, R. y Rossi, P. 2004. El papel del factor de células madre y de los productos génicos alternativos de c-kit en el establecimiento, mantenimiento y función de las células germinales. *Revista Internacional de Biología del Desarrollo*, 44 (6), 599-608.
- Schaefer, E. F., M. I., Hamman, A. I., Kehr, C. E., Gonzáles y M. I., Duré, 2006. Tropic, reproductive and parasitological aspects of the ecology of *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *Herpetological Journal* 16:387-394.
- Schaefer, E. F., y Kehr, A. I. 2006. *Bufo bergi* (Anura: Bufonidae): Reproducción. Natural History Notes; Society for the Study of Amphibians and Reptiles; *Herpetological Review* 37(3): 334-334.
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S., Fischman, D. L. y Waller, R. W. 2004. Estado y tendencias de la disminución y extinción de anfibios en todo el mundo. *Science*, 306 (5702), 1783-1786.
- Szydłowski, P., Chmielewska, M., Rozenblut- Kościsty, B. y Ogielska, M. 2017. La frecuencia de degeneración de las células germinales en los ovarios de las ranas acuáticas (complejo *Pelophylax esculentus*). *Zoomorfología*, 136 (1), 75-83.
- Thomé, R. G., Domingos, F. F. T., Santos, H. B., Martinelli, P. M., Sato, Y., Rizzo, E., y Bazzoli, N. 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue and Cell*, 44(1), 54-62.
- Toledo, L. F. y C. F. B., Haddad. 2005. Reproductive biology of *Scinax fuscomarginatus* (Anura, Hylidae) in south- eastern Brazil. *Journal of Natural History*, 39(32): 3029-3037.
- UICN 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2021-1. <https://www.iucnredlist.org>.
- Underwood, W., Anthony, R., Gwaltney-Brant, S., Poison, A. S. P. C. A. y Meyer, R. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.
- Uribe, M. C. A. 2009. Oogenesis and female reproductive system in Amphibia--- Urodela. *Reproduction of amphibians. Enfield, New Hampshire: Science Publishers*, 273-304.
- Vaira, M., Akmentins, M. S., Attademo, A. M., Baldo, J. D., Barrasso, D. A., Barrionuevo, J. S., y Zaracho, V. H. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. 26(Sup. 1), 131–159.
- Valdez Toledo, C. L., y Pisanó, A. 1980. Fases ovogenéticas en *Bufo arenarum*. Studies of oogenesis in *Bufo arenarum*. *Reproducción*, 4, 315-330.

- Vincent, S., Segretain, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Sage, J., Cuzin, F., y Rassoulzadegan, M. 1998. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development*, 125(22), 4585-4593.
- Villagra, A. L. I., Cisint, S.B., Crespo, C. A., Medina, M. F., Ramos, I., y Fernández, S. N. 2014. Espermatogénesis en *chaquensis* de *Leptodactylus*. Estudio histológico. *Zygote*, 22(3), 291-299.
- Villecco, E. I., Genta, S. B., Riera, A. N. S., y Sánchez, S. S. 2002. Ultrastructural characteristics of the follicle cell-oocyte interface in the oogenesis of *Ceratophrys cranwelli*. *Zygote*, 10(2), 163-173.
- Yuwen, L., Oral, O., Abe, K., Eto, K., y Abé, S. I. 2008. The roles of pericyclic cells and Sertoli cells in spermatogonial proliferation stimulated by some growth factors in organ culture of newt (*Cynops pyrrhogaster*) testis. *General and comparative endocrinology*, 159(1), 80-87.
- Zaracho, V. H., J. A., Céspedes, y B. B., Álvarez. 2005. Aspectos Reproductivos de Anfibios de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. *Miscelanea*, 14: 418.
- Zaracho, V. H., Céspedes, J. A., Álvarez, B. B., y Lavilla, E. O. 2012. Guía de campo para la identificación de los anfibios de la Provincia de Corrientes. *Argentina. Primera Edición, Tucumán: Fundación Miguel Lillo*.