



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo final de Graduación

**Morfología comparada del aparato fonador de cuatro especies de *Physalaemus* (Anura: Leiuperinae)**



Autor: Espinoza, Cristian David

Directora: Dra. Abreliano, Fernanda Natalia

Co-Director: Dr. Zaracho, Víctor Hugo

Laboratorio de Herpetología. FaCENA. UNNE

2024

## ÍNDICE

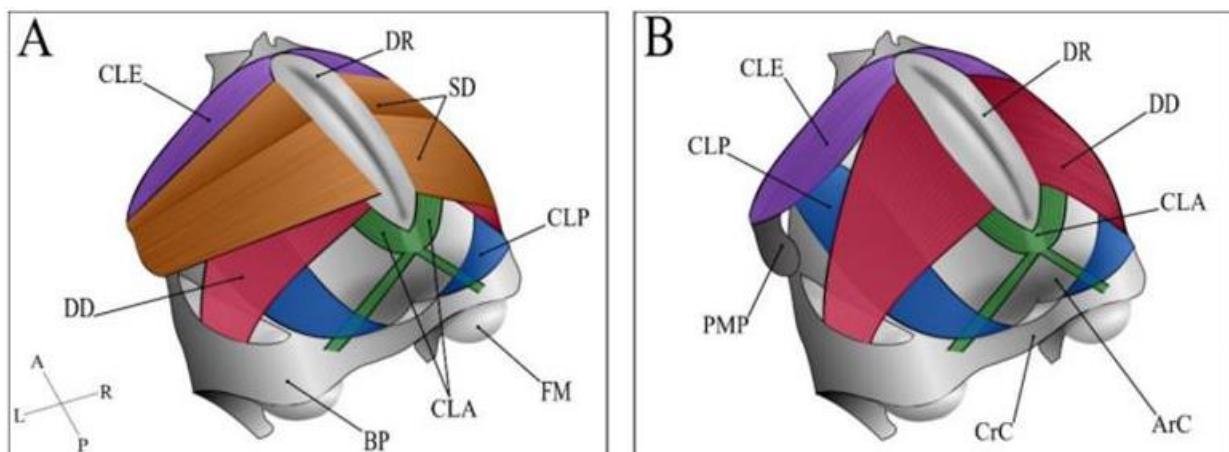
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	9
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

## RESÚMEN

El aparato fonador de los anuros está compuesto por la laringe cartilaginosa y músculos asociados que participan en la producción del sonido abriendo o cerrando la glotis. Estas estructuras son de interés evolutivo dado que influyen en la producción de las vocalizaciones y por lo tanto en el éxito reproductivo de los machos; asimismo constituyen una herramienta fundamental para la identificación de especies, principalmente de aquellas exo-morfológicamente muy similares (crípticas). En este sentido, la anatomía comparada es una herramienta fundamental para ampliar el conocimiento de la anatomía del aparato fonador y de sus variaciones morfológicas, además de aportar caracteres con potencial implicación sistemática y que pueden ser evaluados en contextos filogenéticos. El objetivo de este trabajo es abordar el estudio comparado del aparato fonador de cuatro especies de ranas neotropicales crípticas del género *Physalaemus* pertenecientes a dos grupos de especies del clado *Physalaemus cuvieri*: el grupo de *P. biligonigerus* y el grupo de *P. cuvieri*. Para esto, se describió la morfología de los cartílagos laríngeos y de la musculatura asociada utilizando técnicas convencionales para estudios anatómicos, y adicionalmente, para complementar algunas observaciones, se realizaron preparados histológicos con las técnicas convencionales de histología. La morfología de la laringe y la musculatura asociada en términos generales, es similar al de otras especies del mismo género previamente estudiadas, incluyendo un gran desarrollo del proceso cardíaco del cricoides que determina una estructura cerrada con forma de caja y la presencia del músculo *arylabialis*, recientemente revalidado. Sin embargo, se encontraron algunas características morfológicas y morfométricas que contribuyen a determinar variaciones interespecíficas respaldando la agrupación de especies en base a caracteres morfológicos compartidos. Estos resultados muestran concordancia con la hipótesis filogenética actual entre los integrantes de la subfamilia Leiuperinae, reforzando así las relaciones de parentesco filogenético entre los géneros *Physalaemus*, *Engystomops* y *Edalorhina*, y más lejanamente con los géneros *Pleurodema* y *Pseudopaludicola*. Los aportes de este trabajo amplían el conocimiento de la morfología del aparato fonador en especies crípticas de *Physalaemus* de la ecorregión del Chaco en Argentina, y contribuye a su diferenciación sobre estudios de morfología interna.

## INTRODUCCIÓN

Una de las características más conspicuas de los anfibios anuros es la producción de diferentes tipos de vocalizaciones, las cuales son utilizadas en diferentes contextos para la comunicación interespecífica e intraespecífica (Kölher *et al.* 2017). En la mayoría de las especies, estas vocalizaciones son producidas por el aparato fonador que involucra la laringe y una serie de músculos asociados, además de las membranas vocales (= cuerdas vocales) y sacos vocales. La laringe (Fig. 1), de aspecto globular, es variable en forma y tamaño de sus componentes, aunque las mismas estructuras básicas están presentes en la mayoría de las especies. Está formada por un cartílago cricoides, en forma de anillo, que cubre gran parte de la superficie ventral y que se conecta con el proceso posteromedial del cartílago hioideo manteniéndola así en el piso de la boca. Adicionalmente, sostiene dos cartílagos con forma de valvas, los aritenoides, que cubren la superficie dorsal (Trewavas, 1933; Lagorio, 2019; de La Vega, 2021). Particularmente, la laringe de los integrantes de la subfamilia Leiuperinae (Leptodactylidae) es ligeramente diferente a la de cualquier otro anuro, por su aspecto robusto, más grande y cerrada como una caja (Lagorio *et al.* 2019). Al mismo tiempo la laringe tiene un pasaje dorso lateral único (paso dorsolateral) que posiblemente esté relacionado con sonidos complejos emitidos por este grupo (Drewry *et al.* 1982; de La Vega, 2021). A estos elementos cartilaginosos se asocian cuatro pares de músculos (*m.*), en el modelo clásico (*m. constrictores anterior y posterior de la laringe, m. constrictor laríngeo externo y m. dilatador de la laringe*) que participan en la producción del sonido abriendo o cerrando la glotis (Trewavas, 1933; Schmidt, 1972). Recientemente, a partir de estudios en *Engystomops pustulosus*, se ha propuesto que los haces superficial y profundo del *m. dilatador laríngeo*, constituyen dos músculos diferentes, revalidándose el nombre de *m. arylabialis* (Gaupp, 1904) para el haz más profundo (Lagorio *et al.* 2019).



**Figura 1.** Modelo del aparato fonador (cartílagos y músculos laríngeos) en un representante de la subfamilia Leiuperinae. **(A)** Musculatura laríngea intacta. **(B)** Músculo dilatador superficial de la laringe removido para revelar al músculo dilatador profundo de la laringe. Abreviaciones direccionales: A, anterior; L, izquierda; P, posterior; R, derecha. Abreviaciones: ArC, cartílago aritenoides; BP, procesos bronquiales del cartílago cricoides; CLA, músculo constrictor anterior de la laringe; CLE, músculo constrictor externo de la laringe; CLP, músculo constrictor posterior de la laringe; CrC, cartílago cricoides; DD, músculo dilatador profundo de la laringe (*m. arylabialis*); DR, bastón denso (cubierto de tejido blando); FM, masa fibrosa; PMP, proceso posteromedial del cartílago hioideo; SD, músculo dilatador superficial de la laringe (*m. dilatator de la laringe propiamente dicho*). (*Engystomops pustulosus*, extraído de Lagorio *et al.* 2019).

Las estructuras del aparato fonador de los anuros manifiestan un interés evolutivo porque influyen en la producción del sonido y, por lo tanto, en el éxito reproductivo de los machos. Los sonidos son producidos cuando pasa un flujo de aire desde los pulmones hacia los sacos vocales que hace vibrar el par de membranas vocales que se encuentran en la laringe (Gridi-Papp, 2003). Este sonido se traduce en lo que se conoce como el canto de anuncio, una herramienta para identificar a las especies de anuros, principalmente aquellas crípticas (Hepp y Pombal, 2020).

El género *Physalaemus* (Leiuperinae, Leptodactylidae) incluye unas 50 especies de ranas neotropicales, un grupo morfológicamente muy heterogéneo con variados patrones de coloración y diseños; y cuya distribución abarca desde el norte hasta el sur de Sudamérica, al este de los Andes (Frost, 2024). Muchas de las especies que integran este género exhiben marcadas similitudes exomorfológicas, al punto que sólo pueden ser reconocidas por sus características acústicas (Hepp y Pombal, 2020). Debido a esto, diversos autores propusieron diferentes grupos de especies en base a estudios morfométricos, de morfología externa, patrones de diseño y coloración y de caracteres osteológicos (Nascimento *et al.* 2005). Estudios filogenéticos recientes incluyen caracteres moleculares, y proponen dos clados, el clado de *Physalaemus signifer* que incluye a *P. nattereri*, al grupo de *P. deimaticus* y al grupo de *P. signifer*; y el clado de *Physalaemus cuvieri*, con cinco grupos de especies, entre ellos los grupos de *P. henselii*, de *P. gracilii*, de *P. olfersii*, de *P. biligonigerus* y de *P. cuvieri*. Representantes de estos últimos dos grupos son considerados en este trabajo (Lourenco *et al.* 2015).

Entre los integrantes del grupo de *P. biligonigerus* se encuentran el par de especies crípticas *P. biligonigerus* y *P. santafecinus*, dos especies simpátricas ampliamente distribuidas en la ecorregión del Chaco. Se identifican principalmente por sus parámetros acústicos, y otras diferencias como la pigmentación de los testículos (oscuros en *P. biligonigerus*, blanquecinos en *P. santafecinus*) y el estilo esternal hendido en dos mitades bilaterales en *P. santafecinus* y no hendido en *P. biligonigerus* (Barrio, 1965; 1967). Adicionalmente, estudios biométricos entre ambas especies mencionan una diferencia de tamaño y dimorfismo sexual, señalando que en *P. santafecinus* los machos son más grandes que las hembras, una inversión a la generalidad en los anuros (Laurent, 1969).

En el grupo de *P. cuvieri* se encuentran el par de especies crípticas *P. albonotatus* y *P. cristinae*, dos especies alopátricas con características cromosómicas y posición filogenética compartida (Lourenco *et al.* 2015; Cardozo *et al.* 2023). Morfológicamente indistinguibles entre sí, se diferencian en caracteres acústicos, citogenéticos y moleculares. La distribución de *P. cristinae* abarca la ecorregión del Chaco húmedo en las provincias del nordeste argentino de Chaco, Corrientes y Santa Fe, además de las ecorregiones de la Sabana mesopotámica del cono sur, Pampa húmeda y el Espinal de Argentina, y Paraguay. Por su parte, *P. albonotatus* se distribuye en la ecorregión del Chaco seco, en el noroeste argentino (Jujuy, Salta, Chaco, Formosa y Santiago del Estero) además de las ecorregiones de Bosque Seco Chiquitano, Yungas Andinas del Sur, Cerrado y Pantanal de Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay (Lobo, 1993; Ferrari y Vaira, 2001; Pérez Iglesias y Natale, 2013; Cardozo *et al.* 2023).

La anatomía de la laringe ha sido estudiada en varias especies de la subfamilia Leiuperinae. En *Engystomops pustulosus* se encontró que la morfología de la laringe está relacionada con la variación de los cantos de anuncio y que existe un importante dimorfismo sexual en cuanto al tamaño de la laringe, en el que los machos presentan laringes más grandes (Ryan y Guerra, 2014; Guerra *et al.* 2014).

Especificamente, un estudio reciente en el género *Physalaemus* describe y compara la laringe de 10 especies del clado de *P. cuvieri* y contribuye a dilucidar aspectos sistemáticos en el grupo de *Physalaemus olfersii* y sostener la correlación entre la diversidad de señales acústicas y la morfología vocal (de La Vega *et al.* 2021). Adicionalmente, una revisión de las características acústicas de 45 especies de *Physalaemus* en las que se analizó todo el repertorio acústico revela por primera vez la capacidad de algunas especies del género de producir sonidos complejos relacionados con subarmónicos que involucran una estructura compleja en el aparato fonador (Hepp y Pombal, 2020). Con respecto a los músculos asociados, recientemente, a partir de estudios en *Engystomops pustulosus*, se ha propuesto que los haces superficial y profundo del dilatador laríngeo, constituyen dos músculos diferentes (Lagorio *et al.* 2019). Estos haces difieren en la orientación de las fibras, puntos de unión, y en la inervación. El haz superficial coincide estrechamente con la descripción típica del m. dilatador de la laringe y está bien posicionado para abrir la glotis. Como se mencionó previamente para el haz más profundo, Lagorio et al. (2019) revalida el nombre de *m. arylabialis* (Gaupp, 1904). Este músculo está unido a la masa fibrosa, una estructura laríngea interna necesaria para la producción de sonidos complejos. Particularmente, en el caso de la inervación, se observa que este músculo se halla inervado exclusivamente por el nervio laríngeo superior (corto), información que es utilizada para evaluar nuevas evidencias de homologías entre las estructuras laríngeas de anfibios y mamíferos (Lagorio *et al.* 2019).

Los diferentes estudios en especies de la subfamilia Leiuperinae demuestran que existe correlación entre la morfología de los cartílagos y la musculatura asociada del aparato fonador con las variaciones de las señales acústicas. En este sentido, es de interés ampliar el conocimiento sobre las particularidades morfológicas del aparato fonador en especies crípticas de la ecorregión chaqueña del nordeste y noroeste argentino, explorando potenciales variaciones en su diseño que contribuyan a futuros estudios sistemáticos y filogenéticos a través de un estudio comparado. Este trabajo aborda el estudio comparado del aparato fonador de dos pares de especies crípticas de ranas neotropicales del género *Physalaemus*, pertenecientes a la familia Leptodactylidae, subfamilia Leiuperinae.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- ✓ Ampliar el conocimiento de la morfología del aparato fonador de especies de *Physalaemus* pertenecientes al clado de *P. cuvieri*.

### Objetivos Particulares

- ✓ Describir la morfología de los músculos del aparato fonador de *P. biligonigerus* y *P. santafecinus* (grupo de *P. biligonigerus*) y de *P. albonotatus* y *P. cristinae* (grupo de *P. cuvieri*).
- ✓ Describir la anatomía de los cartílagos laríngeos de las especies previamente mencionadas.
- ✓ Comparar la morfología del aparato fonador entre distintas especies de *Physalaemus*.
- ✓ Interpretar el diseño morfológico de las especies estudiadas en un contexto filogenético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó el aparato fonador de 26 individuos (machos adultos) de *Physalaemus spp.* procedentes de diferentes localidades del nordeste y noroeste argentino, los cuales se encuentran depositados en la Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNEC).

Ejemplares analizados:

*Physalaemus santafecinus* (n=8): Corrientes: Ituzaingó, Isla Apipé: UNNEC 14168, 14162; Capital, Campus UNNEC: UNNEC 14171; Capital, B° Yecoha: UNNEC 14142, 14143, 14144; Ejemplares empleados para histología: Corrientes, Capital, B° Yecoha: UNNEC 14140 y 14141.

*Physalaemus biligonigerus* (n=6): Chaco: Comandante Fernández, Sáenz Peña: UNNEC 14180; General Guemes, Fuerte Esperanza: UNNEC 14177; Salta: Capital, RN N° 51 (Km 5): UNNEC 14153, 14154; Ejemplares empleados para histología: Chaco: PN El Impenetrable: UNNEC 14151 y 14152.

*Physalaemus cristinae* (n=6): Corrientes: Esquina, Paraje la Concepción: UNNEC 14157; Capital, San Cayetano: UNNEC 14158; Capital, B° Yecohá: UNNEC 14147, 14148, 14149; Ejemplares empleados para histología: Corrientes, Capital, B° Yecoha: UNNEC 14145 y 14146.

*Physalaemus albonotatus* (n=6): Jujuy: Ledesma, PN Calilegua: UNNEC 5817, 5818; Formosa: Patiño, Estancia la fidelidad: UNNEC 11424; Salta: Capital, RN N° 51 (km 5): UNNEC 14156; Ejemplares empleados para histología: Formosa: Bermejo, Fortín Soledad: UNNEC 11431. Chaco: PN El Impenetrable: UNNEC 14155.

Todas las especies estudiadas se encuentran categorizadas como especies de preocupación menor (LC) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2024) y no amenazadas (NA) de acuerdo a la Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina (Vaira et al. 2012).

Algunos ejemplares fueron capturados manualmente para este estudio. En este caso, fueron eutanizados con benzocaína al 10% aplicada sobre la superficie ventral, siguiendo las normas de “The Institutional Animal Care and Use Committee” (Silverman, 2015), fijados en formol al 10% por inyección abdominal durante 24 horas y conservados en alcohol al 70%.

El aparato fonador (cartílagos y músculos laríngeos) de cada individuo fue extraído mediante una disección minuciosa que incluyó incisiones en las comisuras bucales para ampliar dicha cavidad y en los bordes ventrolaterales de la cavidad bucofaríngea. El procedimiento y las observaciones posteriores se realizaron bajo un microscopio estereoscópico binocular EZ4 (lupa), con la muestra sumergida en agua para evitar la desecación de los tejidos.

En primer lugar se describió la musculatura considerando su forma, sitio de origen e inserción y ubicación con respecto a músculos adyacentes empleando la terminología de Trewavas (1933) y Lagorio et al. (2019). Posteriormente, para la observación y descripción de los cartílagos laríngeos se aplicó parcialmente la técnica de Wassersug (1976) de tinción diferencial de cartílagos (con azul de Alcian) y hueso (con rojo de Alizarina) y posterior diafanización de la musculatura con una solución con hidróxido de potasio. Como no se necesitó teñir huesos, se omitió el paso por rojo de Alizarina. La terminología empleada para la descripción de los cartílagos laríngeos sigue a Trewavas (1933) y de La Vega (2021).

Con fines ilustrativos y morfométricos se tomaron fotografías con una cámara Olympus SC35 montada a un microscopio estereoscópico Leica EZ4. Las imágenes fueron editadas con el programa Paint Shop Pro 6. A partir de estas fotografías y a través del programa Image J, se obtuvieron las siguientes medidas de acuerdo a de La Vega (2021): ancho de la laringe (AL, desde los bordes externos de la laringe en el punto medio de su longitud) y longitud de laringe (LL, desde el extremo anterior de la hendidura formada por los aritenoides hasta el extremo posterior de la cápsula cartilaginosa, considerando su superficie dorsal). Se calculó además la longitud relativa de la laringe (LL/LHC), ancho relativo de la laringe (AL/LHC) y la proporción entre el ancho y el largo (LL/AL) para lo cual se obtuvo también la Longitud hocico-cloaca de cada individuo (LHC) usando un calibre digital 0,01 mm de precisión.

Para complementar algunas observaciones se realizaron adicionalmente preparados histológicos siguiendo las técnicas convencionales de histología. Para esto, las muestras utilizadas se fijaron con solución de Bouin y luego se conservaron en alcohol al 70%. Para la obtención de los preparados histológicos se siguió el siguiente protocolo: A) Deshidratación en alcoholes de graduación creciente., B) Aclaración en alcohol butílico, C) Inclusión en alcohol butílico-parafina (50-50%), D) Inclusión en parafina (100%), E) Armado del taco, F) Obtención de secciones transversales y/o longitudinales de 3-5 µm de grosor con micrótomo rotatorio tipo Spencer, G) Desparafinado con xilol, H) Hidratación en concentraciones decrecientes de alcohol y agua destilada, I) Coloración de las secciones histológicas con hematoxilina-eosina, J) Deshidratación en alcohol 96% y aclaración en xilol, y K) Montaje permanente con bálsamo de Canadá. Los preparados fueron observados y analizados utilizando un microscopio óptico compuesto Leica DM 500.

## RESULTADOS

En todas las especies la longitud de la laringe (LL) es mayor que su ancho (AL). En la Tabla 1 se presentan las medidas obtenidas para cada variable, y las proporciones del aparato fonador en relación al tamaño corporal para cada una de las especies estudiadas.

**Tabla 1.** Resumen de mediciones para machos adultos de *Physalaemus spp.* Abreviaturas: AL= Ancho de la laringe, LL= Longitud de laringe, LHC= Longitud hocico-cloaca, LL/LHC= Longitud relativa de la laringe, AL/LHC= Ancho relativo de la laringe, LL/AL= Proporción de la longitud y el ancho. Valores en milímetros (mm). Se informa el promedio, desvío estándar ( $\pm$ ) y Mínimo – Máximo.

Especies	AL (mm)	LL (mm)	LHC (mm)	LL/LHC	AL/LHC	LL/AL
<i>P. santafecinus</i> (n=3)	5,3 $\pm$ 0,8 (4,7 - 6,2)	6,1 $\pm$ 0,5 (5,7 - 6,7)	32,7 $\pm$ 2,3 (31,1 - 35,3)	0,19 $\pm$ 0,00 (0,18 - 0,19)	0,16 $\pm$ 0,01 (0,15 - 0,17)	1,16 $\pm$ 0,07 (1,08 - 1,21)
<i>P. biligonigerus</i> (n=4)	5,7 $\pm$ 0,5 (5,1 - 6,1)	6,4 $\pm$ 0,9 (5,6 - 7,7)	34,2 $\pm$ 2,5 (30,5 - 35,6)	0,19 $\pm$ 0,03 (0,15 - 0,21)	0,16 $\pm$ 0,00 (0,15 - 0,17)	1,13 $\pm$ 0,23 (0,91 - 1,40)
<i>P. albonotatus</i> (n=3)	3,4 $\pm$ 0,6 (2,9 - 4,1)	4,3 $\pm$ 1,1 (3,1 - 5,3)	28 $\pm$ 2,3 (26 - 30,5)	0,15 $\pm$ 0,03 (0,11 - 0,17)	0,12 $\pm$ 0,03 (0,10 - 0,15)	1,32 $\pm$ 0,49 (0,75 - 1,65)
<i>P. cristinae</i> (n=3)	3,2 $\pm$ 0,5 (2,7 - 3,8)	4,1 $\pm$ 1,1 (2,9 - 4,8)	22,4 $\pm$ 1,7 (20,9 - 24,3)	0,18 $\pm$ 0,04 (0,13 - 0,21)	0,14 $\pm$ 0,02 (0,12 - 0,17)	1,27 $\pm$ 0,20 (1,07 - 1,46)

### Músculos laríngeos

En las especies estudiadas se identificaron cinco pares de músculos que recubren la mayor parte de los cartílagos laríngeos. A continuación, se describen cada uno de ellos y se detallan las características en común en cuanto a su morfología externa, teniendo en cuenta su forma, sitio de origen e inserción y ubicación con respecto a músculos adyacentes y cuando corresponde, se remarcán las diferencias encontradas.

*Músculo arylabialis* (Fig. 2A, Fig. 3). Es un músculo fibro tendinoso. Su porción fibrosa de forma laminar se ubica por debajo del m. dilatador de la laringe y está cubriendo parcialmente al m. constrictor anterior. La porción fibrosa se origina en la superficie externa del cartílago aritenoides próximo a la barra cartilaginosa del borde medial de dicho cartílago, se extiende a través de la articulación entre los bordes laterales de los aritenoides y el proceso cardíaco del cartílago cricoides.

*Músculo dilatador de la laringe* (Fig. 2B, Fig. 4). Es un músculo fibroso de forma laminar. Tiene una posición anterior y es el más superficial de todos los músculos laríngeos. Se encuentra cubriendo al m. *arylabialis*, m. constrictor externo y al m. constrictor anterior. Este músculo está dividido en dos haces musculares: un haz anterior y un haz posterior, paralelos y con fibras convergentes entre sí. Se originan dorsalmente en el proceso postero-medial del cartílago hioideo y difieren en el punto de inserción, el haz anterior se inserta en la porción anterior de la barra cartilaginosa extendida a lo largo del borde medial del cartílago aritenoides, mientras que el haz posterior se inserta en la porción posterior de la misma.

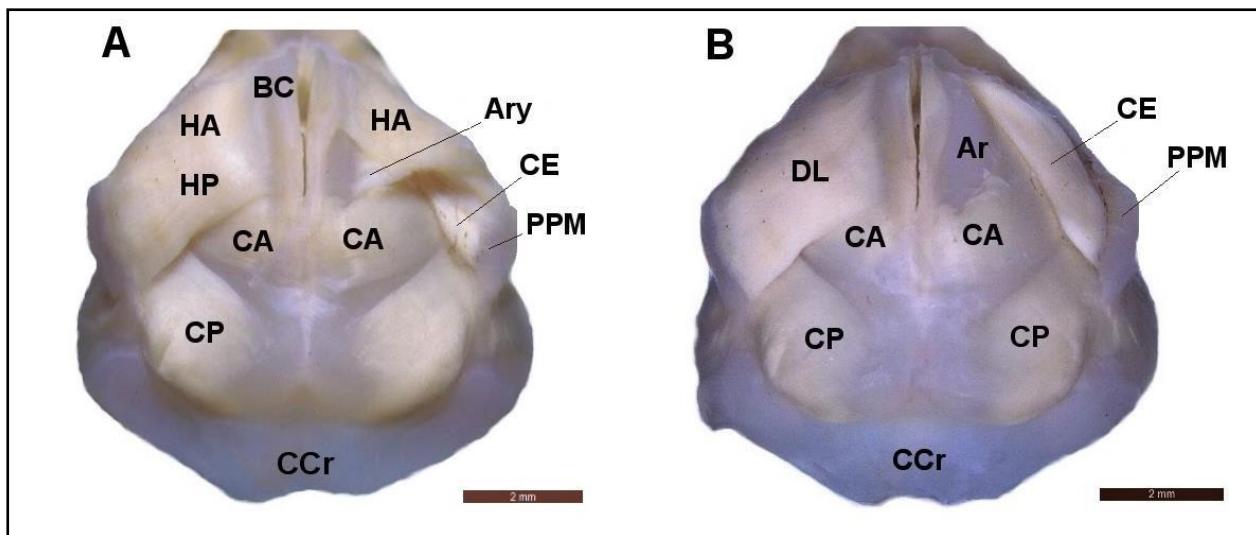
*Músculo constrictor externo* (Fig. 2B, Fig. 4). Es un músculo fibroso, fusiforme. Tiene una posición anterior con respecto al resto de los músculos. Se encuentra sobre el punto de origen del m. constrictor anterior, está cubierto por el m. dilatador de la laringe. Se origina dorsalmente en el proceso posteromedial del cartílago hioideo, inmediatamente debajo del origen del m. dilatador y se inserta próximo a su par, sobre el borde medial del cartílago aritenoides a nivel de su vértice, en posición anterior a la glotis.

*Músculo constrictor anterior* (Fig. 2, Fig. 4). Es un músculo fibroso, acintado. Tiene una posición anterior y próxima con respecto al m. constrictor posterior, está cubierto en parte por el *m. arylabialis*, el m. dilatador de la laringe y además por el m. constrictor externo que cubre su punto de origen. Se origina en el borde medial del proceso posteromedial del cartílago hioideo y se inserta próximo a su par sobre en el borde medial del cartílago aritenoides, posterior a la glotis.

*Músculo constrictor posterior* (Fig. 2, Fig. 4). Es un músculo fibro tendinoso, acintado. Tiene una posición posterior y próxima al m. constrictor anterior. Es un músculo extenso, envuelve a la estructura cartilaginosa. Se origina con su estrecho y aplanado tendón muscular en el pulvínulo vocal del cartílago aritenoides a nivel de su vértice, continuando con su porción fibrosa a través de la cual se inserta próximo a su par en el borde medial del cartílago aritenoides.

## Diferencias interespecíficas

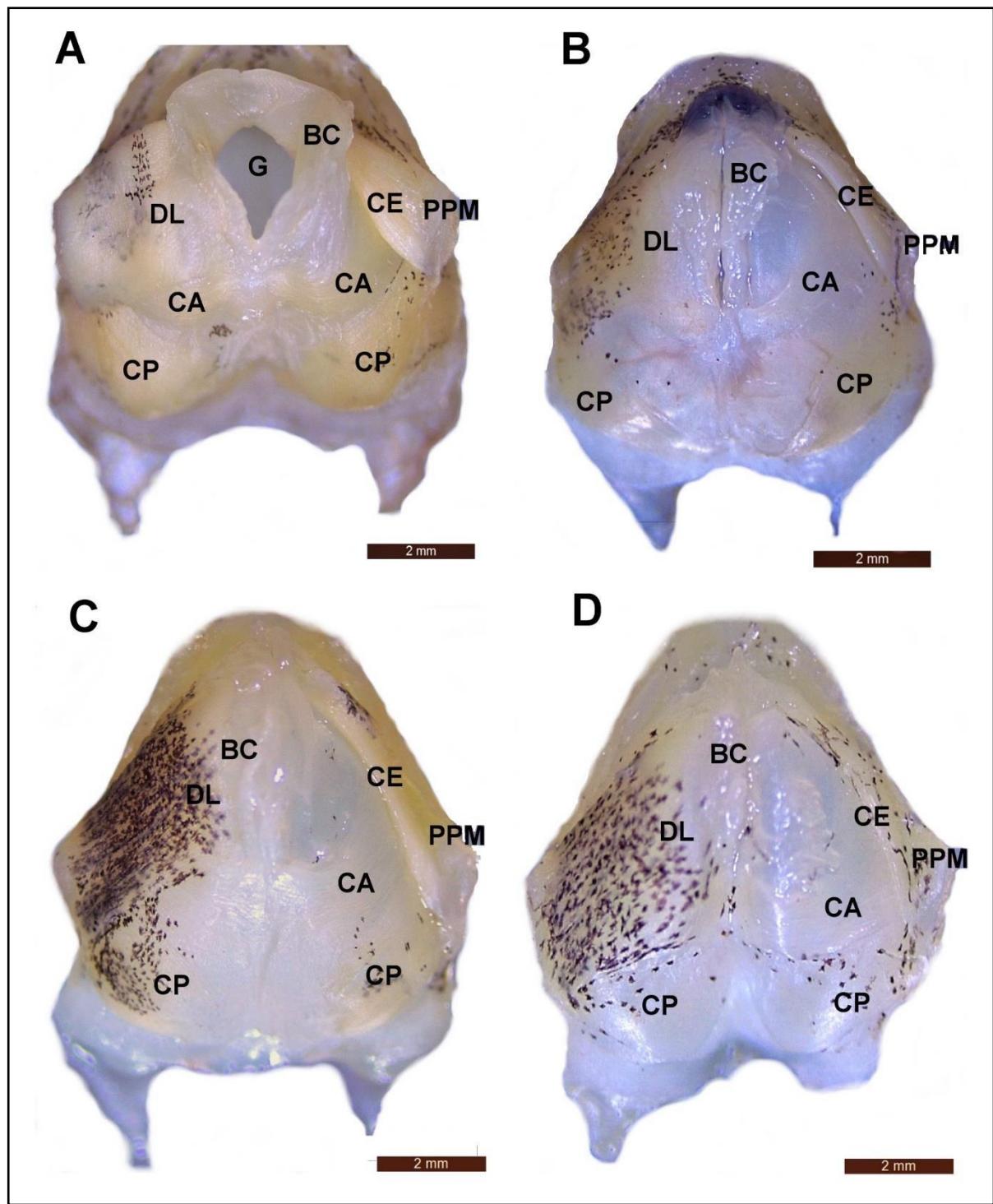
El músculo constrictor posterior presenta notables diferencias en cuanto a su desarrollo entre ambos grupos de especies. Como se muestra en la Figura 5A, las especies del grupo *P. biligonigerus* (*P. santafecinus* y *P. biligonigerus*) presentan la porción tendinosa reducida, se expande desde el pulvínulo vocal hasta un corto trayecto sobre el borde ventrolateral del proceso cardíaco del cricoideo, continuando con la porción fibrosa con desarrollo considerable sobre una parte de la superficie ventrolateral del proceso cardíaco, alcanzando así la superficie dorsal del cartílago aritenoides donde se inserta próximo a su par, a nivel del borde medial. Por el contrario, como se muestra en la Figura 5B, en las especies del grupo *P. cuvieri* (*P. albonotatus* y *P. cristinae*) la porción tendinosa está bien desarrollada, se expande desde el pulvínulo vocal, recorre toda la superficie ventrolateral del proceso cardíaco, próximo a la articulación con los aritenoides y se continúa con la porción fibrosa reducida, a la superficie dorsal de los aritenoides.



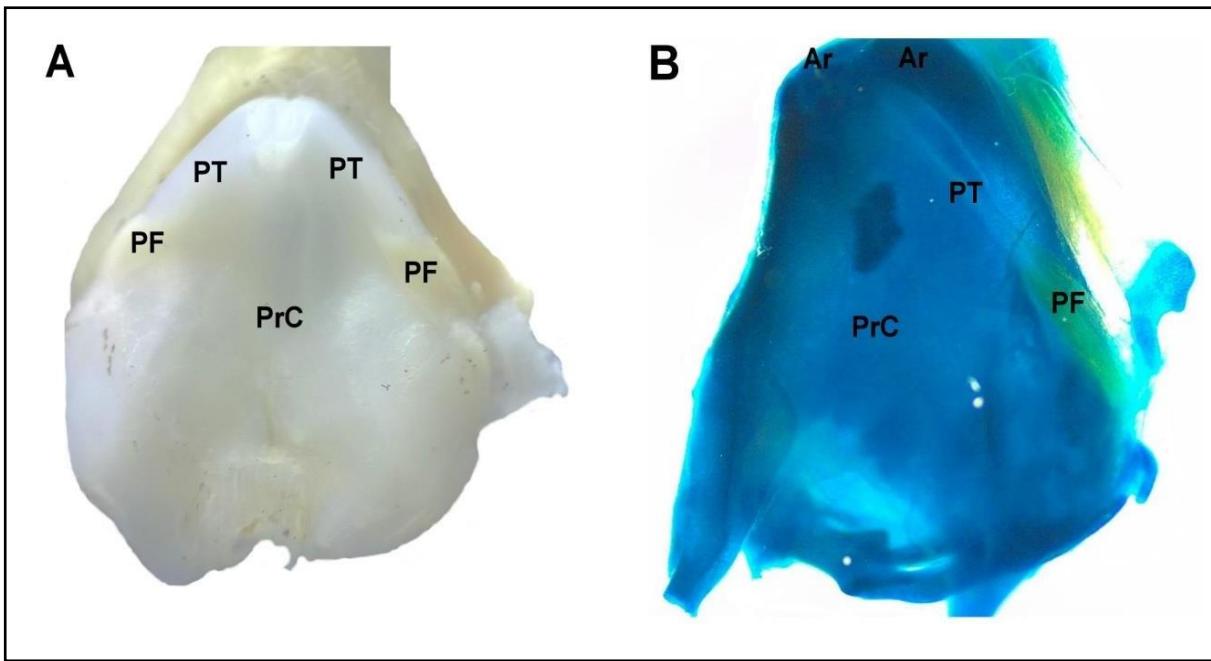
**Figura 2.** Laringe diseccionada con músculos laríngeos en un macho adulto de *Physalaemus santafecinus*. **(A)** El haz posterior del músculo dilatador de la laringe del lado derecho es removido, exponiendo al músculo *arylabialis*. **(B)** El músculo dilatador de la laringe es removido por completo del lado derecho, exponiendo los músculos profundos. Abreviaciones: DL, músculo dilatador de la laringe; HA, haz anterior del m. dilatador; HP, haz posterior del m. dilatador; Ary, músculo *arylabialis*; CE, m. constrictor externo; CA, m. constrictor anterior; CP, m. constrictor posterior; Ar, cartílago aritenoides; BC, barra cartilaginosa; CCr, cartílago cricoides; PPM, proceso posteromedial del cartílago hioideas. Escala: 2 mm.



**Figura 3.** Corte transversal del aparato fonador de **(A)** *Physalaemus santafecinus* (grupo *P. biligonigerus*); **(B)** *Physalaemus cristinae* (grupo *P. cuvieri*). Abreviaciones: T, porción tendinosa del *m. arylabialis* (?); MF, masa fibrosa; MV, membrana vocal; Ar, cartílago aritenoides; CCr, cartílago cricoides; PPM, proceso posteromedial del cartílago hioideas.



**Figura 4.** Comparación de los músculos laríngeos en machos adultos de *Physalaemus* spp. El músculo dilatador de la laringe es removido del lado derecho, exponiendo los músculos profundos. **(A)** *P. santafecinus*; **(B)** *P. biligonigerus*; **(C)** *P. albonotatus*; **(D)** *P. cristinae*. Abreviaciones: DL, músculo dilatador de la laringe; CE, m. constrictor externo; CA, m. constrictor anterior; CP, m. constrictor posterior; BC, barra cartilaginosa; G, glotis; PPM, proceso posteromedial del cartílago hioideo. Escala: 2 mm



**Figura 5.** Detalle del músculo constrictor posterior en **(A)** *Physalaemus santafecinus* (Gpo. *P. biligonigerus*), **(B)** *Physalaemus albonotatus* (Gpo. *P. cuvieri*). Abreviaciones: PF, porción fibrosa del m. constrictor posterior; PT, porción tendinosa del m. constrictor posterior; PrC, proceso cardíaco del cartílago cricoideo; Ar, cartílago aritenoides.

### Cartílagos laríngeos

En las especies estudiadas los cartílagos laríngeos conforman una estructura globular, formada dorsalmente por el par de cartílagos aritenoides, posterior y ventralmente por el cartílago cricoides, que por sus características conforman una estructura cerrada en forma de caja. Entre ambos aritenoides, en la parte anteromedial queda delimitada la glotis, una hendidura medial vertical. A continuación, se describen y se detallan las características morfológicas externas en común y cuando corresponde, se remarcán las diferencias encontradas.

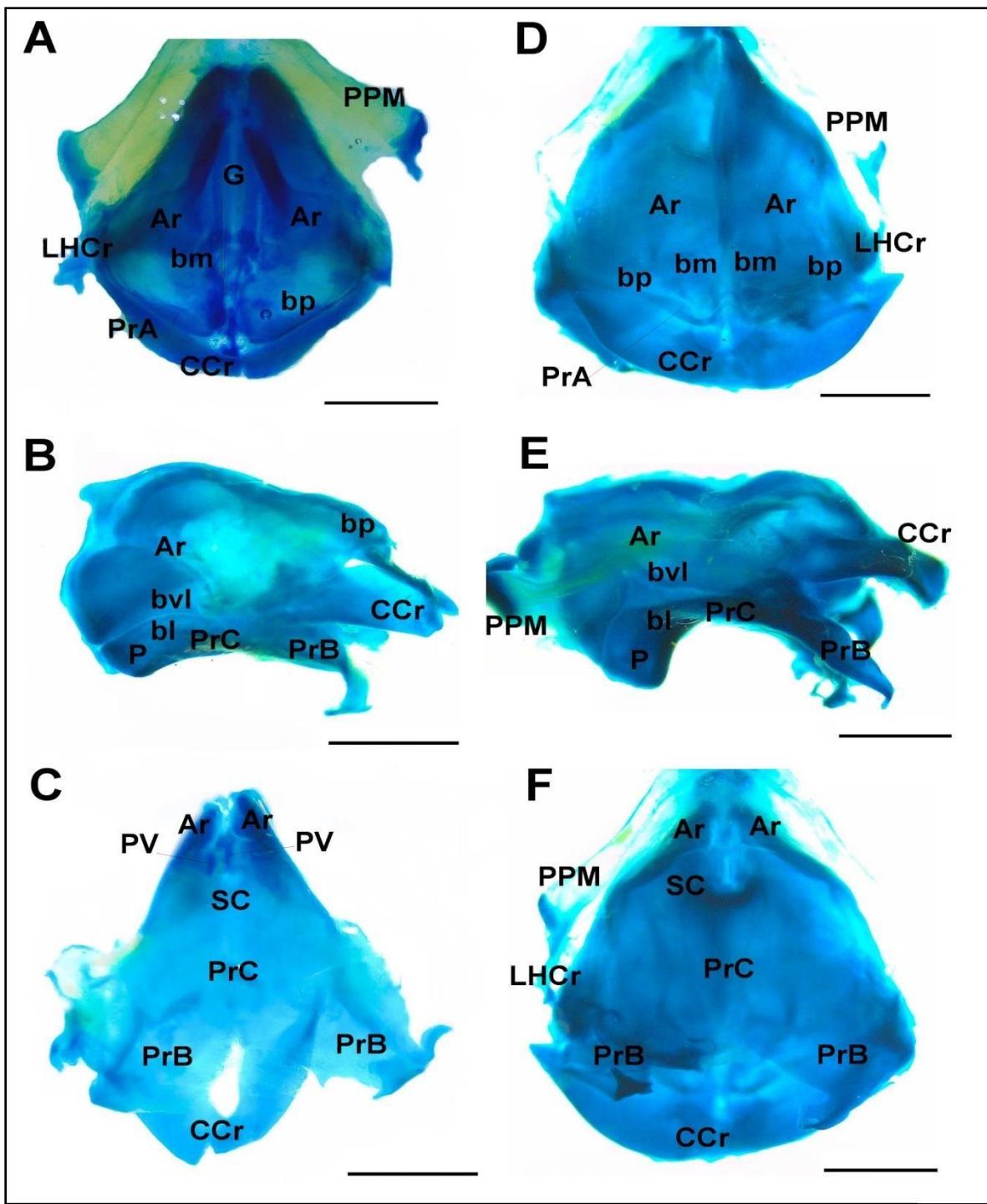
**Aritenoides.** En vista dorsal (Fig. 6 A-D, Fig. 7 A-D) cada cartílago tiene forma triangular, una base en posición posterior y un vértice en posición anterior en relación a toda la laringe. El borde posterior (base) articula con el cartílago cricoides, a través de los procesos articulares del cricoides. El borde medial articula con su par y delimita la glotis en posición anterior. En vista lateral (Fig. 6 B-E, Fig. 7 B-E) tiene forma de valvas. Dorsalmente, cada cartílago presenta una superficie externa convexa, en la cual se diferencia una región anterior con una suave depresión sobre la cual se asienta el m. *arylabialis* y dilatador de la laringe, una región posterior más elevada, donde se asientan los m. constrictores anterior y posterior. Una superficie interna cóncava, que forma el techo y las paredes de la cavidad laríngea, donde se encuentra y se desarrolla la membrana vocal, que se origina en el borde posterior de los aritenoides y se continúa en dirección oblicua en sentido postero-anterior hacia el pulvínulo vocal de los aritenoides donde se inserta. El borde ventrolateral del aritenoides articula a lo largo de toda su extensión con el borde lateral del proceso cardíaco del cartílago cricoides y tal asociación conforma una estructura cerrada en forma de caja. Ventralmente (Fig. 6 C-F, Fig. 7 C-F) se observa a los aritenoides

como una estrecha franja en la parte más anterior de la laringe, debido al gran desarrollo del proceso cardíaco del cricoideos. Además a partir del vértice se desarrolla y se extiende hacia el seno cricoideo, el pulvínulo vocal, un pequeño capuchón que presta inserción a la membrana vocal.

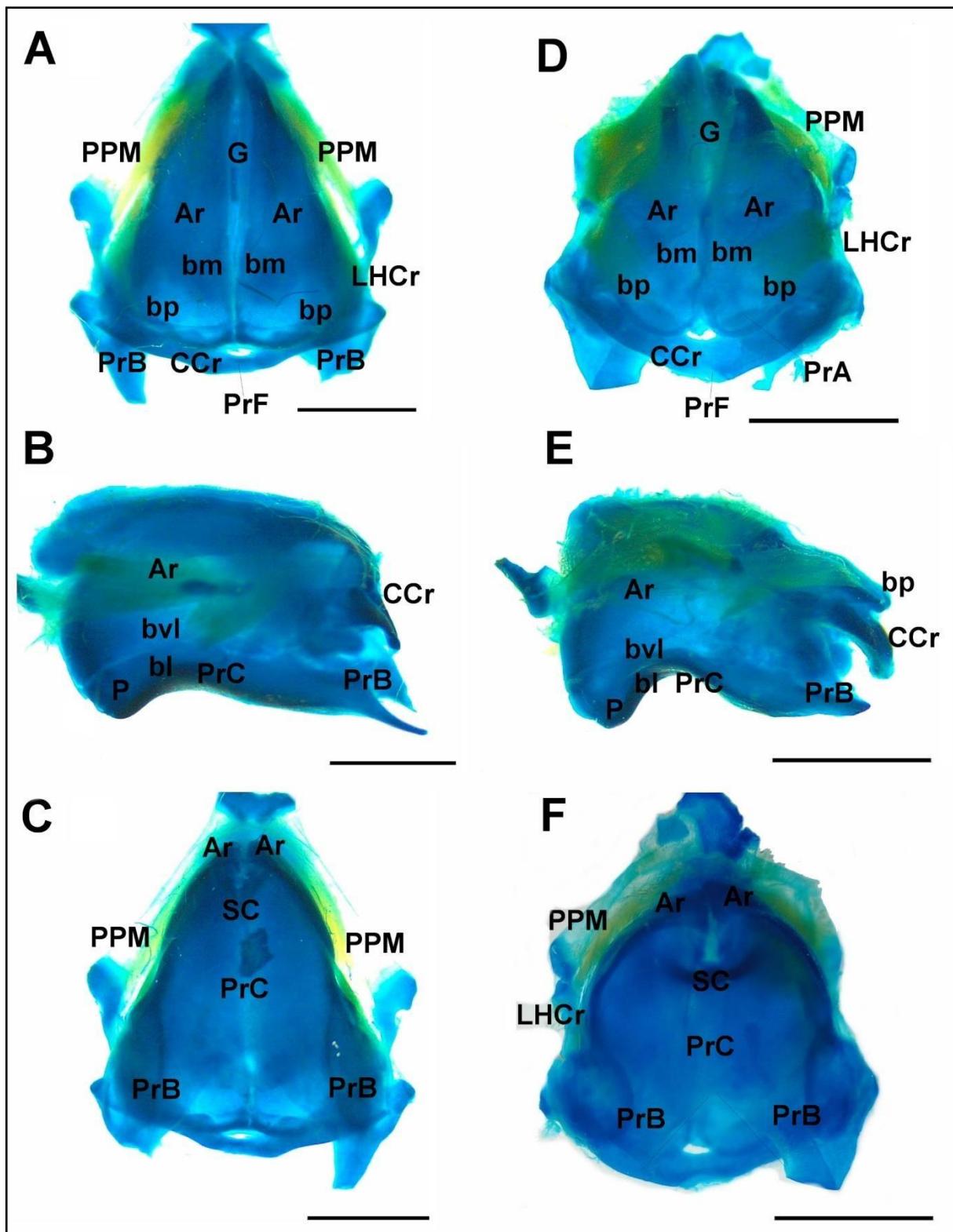
*Cricoides*. Tiene forma de anillo (Fig. 6 A-D, Fig. 7 A-D), mientras que ventralmente tiene el aspecto de una placa, debido al gran desarrollo del proceso cardíaco. Dorsalmente, a nivel de la parte media del anillo se observa el proceso faríngeo con variaciones en cuanto a su desarrollo en las distintas especies. Lateralmente están presentes los procesos articulares bien pronunciados en todas las especies, articulando con el borde posterior de los cartílagos aritenoides, a la vez que delimitan una escotadura en forma de "U". Los extremos laterales del anillo se reducen y se continúan con el ligamento hiocricoideo que se une al proceso posteromedial del cartílago hioideo para sostener la laringe en el piso de la boca. En vista lateral (Fig. 6 B-E, Fig. 7 B-E), los bordes del seno cricoides forman una proyección conocida como pico, que sobresale ventralmente y tiene una posición anterior en todas las especies aquí tratadas. Ventralmente (Fig. 6 C-F, Fig. 7 C-F), el proceso cardíaco está bien desarrollado y expandido hacia adelante en forma de placa. Este proceso en el borde anterior, presenta una escotadura medial, el seno cricoideo, con variaciones en cuanto a la forma del borde posterior, continuando con el espacio entre los vértices de los cartílagos aritenoides. Del extremo posterovernal del cricoides se extienden los procesos bronquiales simples a cada lado, bien desarrollados en todas las especies, con bases anchas, extremos aguzados y con dirección posterior, incluso se los puede visualizar desde una vista dorsal. Delimitan la escotadura bronquial con forma de "v invertida", haciendo referencia al ángulo formado por la conexión de sus ramas. Conforman también los pasajes dorsolaterales que permiten el flujo del aire desde los pulmones.

### Diferencias interespecíficas

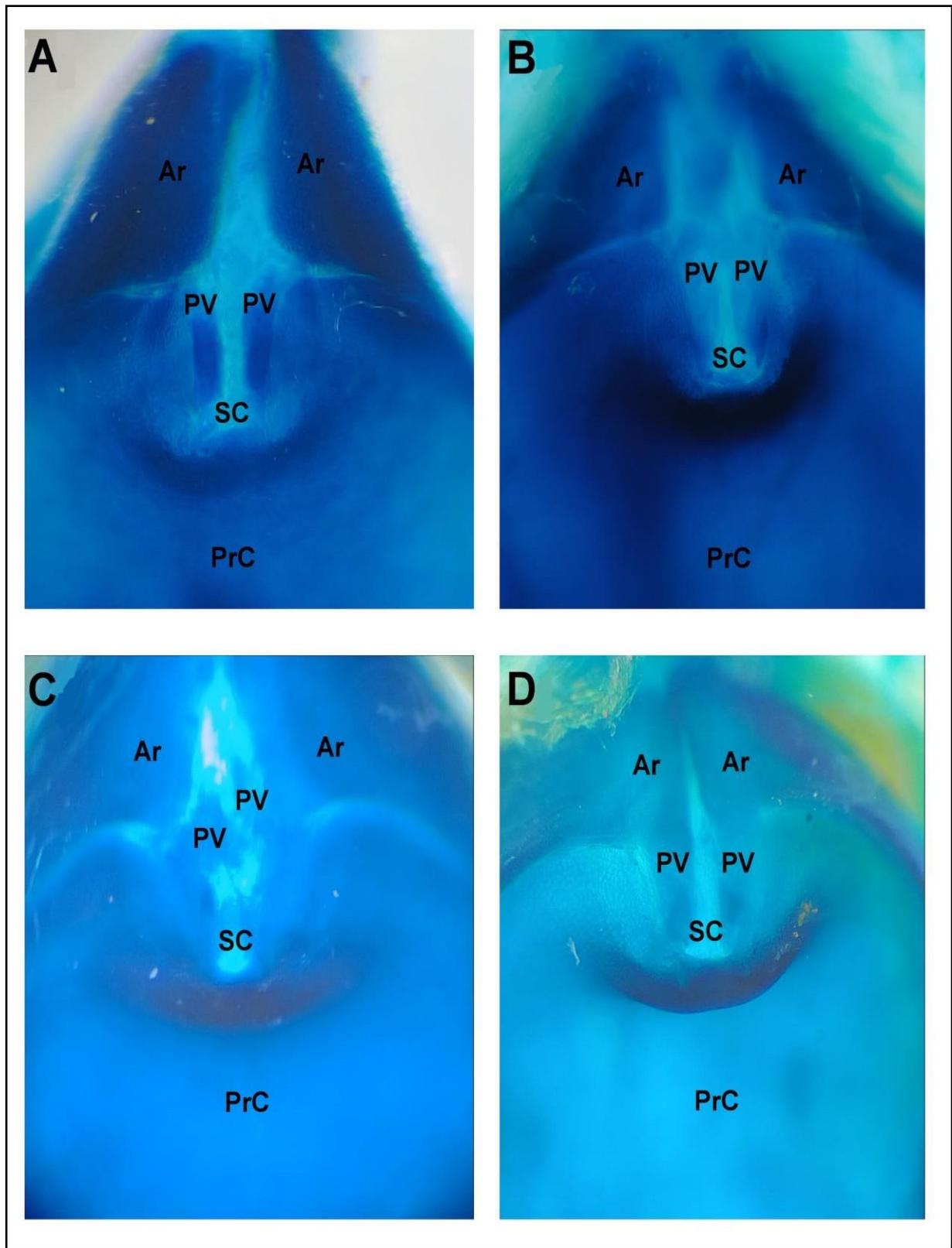
Las especies estudiadas presentan características morfológicas con diferencias entre ambos grupos de especies (Fig. 6, 7, 8). El anillo cricoideo es más amplio en las especies del grupo *P. biligonigerus*, lo cual contrasta con un anillo más estrecho en las especies del grupo *P. cuvieri*. El proceso faríngeo no se diferencia significativamente en las especies del grupo *P. biligonigerus*. Por otro lado, en las especies de *P. cuvieri* el proceso faríngeo está bien diferenciado. El borde posterior del seno cricoideo (Fig. 8 A-B) tiene forma rectangular en el grupo *P. biligonigerus*, mientras que en el grupo *P. cuvieri* adquiere forma de "U" (Fig. 8 C-D). Finalmente, los procesos bronquiales con extremos curvados, son más anchos que largos en el grupo *P. biligonigerus*, mientras que en el grupo *P. cuvieri* los extremos son rectos y más largos que anchos.



**Figura 6.** Laringe de un macho adulto de *Physalaemus santafecinus* (**A**) vista dorsal, (**B**) vista lateral, (**C**) vista ventral. *Physalaemus biligonigerus* (**D**) vista dorsal, (**E**) vista lateral, (**F**) vista ventral. Abreviaciones: Ar, cartílago aritenoides; bm, borde medial; bp, borde posterior; bvl, borde ventrolateral; CCr, cartílago cricoideo; bl, borde lateral; PrA, proceso articular; PrF, proceso faríngeo; PrC, proceso cardíaco; PrB, proceso bronquial; SC, seno cricoideo; PV, pulvínulo vocal; P, pico; PPM, proceso posteromedial del cartílago hioideo; LHCr, ligamento hioicricoideo; G, glotis. Escala: 2 mm.



**Figura 7.** Laringe de un macho adulto de *Physalaemus albonotatus* (**A**) vista dorsal; (**B**) vista lateral; (**C**) vista ventral. *Physalaemus cristinae* (**D**) vista dorsal; (**E**) vista lateral; (**F**) vista ventral. Abreviaciones: Ar, cartílago aritenoides; bm, borde medial; bp, borde posterior; bvl, borde ventrolateral; CCr, cartílago cricoides; bl, borde lateral; PrA, proceso articular; PrF, proceso faríngeo; PrC, proceso cardíaco; PrB, proceso bronquial; SC, seno cricoideo; PV, pulvínulo vocal; P, pico; PPM, proceso posteromedial del cartílago hioideo; LHCr, ligamento hioicricoideo; G, glotis. Barra de escala: 2 mm



**Figura 8.** Detalle del Seno cricoideo en (A) *P. santafecinus*; (B) *P. biligonigerus*; (C) *P. albonotatus*; (D) *P. cristinae*. Abreviaciones: Ar, cartílago aritenoides; PV, pulvínulo vocal; SC, seno cricoideo; PrC, proceso cardíaco.

## DISCUSIÓN

La subfamilia Leiuperinae incluye los géneros: *Pseudopaludicola* (*Pleurodema* ((*Engystomops* + *Edalorhina*) *Physalaemus*)) (Lourenço *et al.* 2015). Los resultados de este trabajo representan el primer aporte al conocimiento anatómico del aparato fonador de especies de *Physalaemus spp.* en Argentina, particularmente de la ecorregión del Chaco. A continuación se compara la musculatura y la morfología laríngea entre las especies estudiadas y otras afines filogenéticamente (especialmente con representantes de la subfamilia Leiuperinae), con el fin de discutir si estas estructuras tiene un correlato filogenético.

Músculos laríngeos. La morfología de la musculatura laríngea en *P. santafecinus*, *P. biligonigerus* (grupo de *P. biligonigerus*), *P. albonotatus* y *P. cristinae* (grupo de *P. cuvieri*) es conservada. El m. *arylabialis* fue revalidado recientemente en *Engystomops pustulosus* como un haz profundo, diferenciado del haz superficial del m. dilatador de la laringe; presenta una porción fibrosa y otra tendinosa, tiene una disposición y orientación de fibras distinta al m. dilatador, está inervado exclusivamente por el nervio laríngeo corto y además está unido a la masa fibrosa interna (Lagorio *et al.* 2019). En las especies aquí estudiadas la porción fibrosa del m. *arylabialis* tiene su punto de origen sobre la superficie externa del cartílago aritenoides próximo a la barra cartilaginosa de su borde medial, a diferencia de lo descrito en *Engystomops pustulosus* donde su punto de origen está en la barra cartilaginosa.

A partir de cortes histológicos, Lagorio *et al.* (2019) observaron en *Engystomops pustulosus* que la porción tendinosa del m. *arylabialis* está unido a la masa fibrosa de la membrana vocal, una estructura relacionada con la producción de cantos de anuncio de tipo complejo. Los cortes histológicos realizados para este estudio no nos permitieron confirmar esta asociación, aunque algunos indicios parecen mostrar cierta similitud (Fig. 3). Sin embargo, de confirmarse esta asociación en futuros estudios, es interesante resaltar que las especies estudiadas aquí tienen cantos de anuncio de tipo simple (Hepp y Pombal, 2020), con lo cual su relación con los cantos complejos debería ser reevaluado.

El m. *arylabialis* fue descripto por primera vez en *Pelophylax lessonae* (*P. kl. esculentus*) por Gaupp (1904) como un deslizamiento cricoaritenoideo profundo del m. dilatador de la laringe, con distintas inserciones, y separado físicamente. Además describió un tendón extendido desde el m. *arylabialis* hasta el frenillo labii vocalis dentro de la cavidad laríngea. Más tarde, Krause (1920) volvió a observar este músculo en *Pelophylax lessonae* y además en *Rana temporaria*. Trewavas (1933) identificó haces superficiales y profundos en múltiples especies en el género *Rana* aunque se lo consideró como una porción del m. dilatador laríngeo por falta de evidencia de separación funcional, de separación física completa.

En *Pseudopaludicola falcipes* se describe el m. dilatador de la laringe como la porción principal y además la presencia de dos haces profundos unidos a un tendón entre los m. constrictores anterior y posterior. Un haz se extiende en abanico sobre el m. constrictor anterior y el cartílago aritenoides y el otro haz unido con el otro extremo del m. dilatador de la laringe en la epífisis del proceso posteromedial del cartílago hioideo (Trewavas 1933). La existencia de estos haces musculares profundos sugiere la posibilidad de la presencia del m. *arylabialis* o de otra estructura muscular distinta.

La presencia de haces musculares profundos en especies de la subfamilia Leiuperinae (Leptodactylidae) como *Physalaemus spp.*, *Engystomops pustulosus* y *Pseudopaludicola falcipes*, y de la familia Ranidae, indica que no es una especialización restringida y podría estar presente en otros géneros y familias de anuros. Esto plantea un interrogante sobre la posibilidad de que estos haces musculares profundos sean homólogos al m. *arylabialis*. En este contexto, se requieren de nuevos estudios comparativos que permitan determinar la homología de estos haces profundos teniendo en cuenta la dirección de las fibras musculares, dilucidar la función específica y especialmente, analizar la inervación de los haces musculares ya que esta evidencia es clave para poder determinar músculos diferentes. En este sentido, son necesarios estudios adicionales para examinar la inervación de los músculos identificados en este trabajo y obtener así una visión más completa de las estructuras musculares en las especies aquí tratadas y en otras especies de anuros.

El músculo constrictor posterior en las especies analizadas muestra una posición posterior y próxima al m. constrictor anterior. Además de las variaciones en cuanto al desarrollo de sus porciones, las especies del grupo *P. cuvieri* (*P. albonotatus* y *P. cristinae*) se describen con una porción tendinosa bien desarrollada y una porción fibrosa menos desarrollada, diferenciándose de las especies del grupo *P. biligonigerus* (*P. biligonigerus* y *P. santafecinus*) con una porción tendinosa menos desarrollada en comparación de su porción fibrosa. El grado de desarrollo de la porción tendinosa y fibrosa, incluso la ausencia es variable en la subfamilia Leiuperinae. En *Physalaemus nanus* (grupo *P. signifer* del clado *P. signifer*) el m. constrictor posterior carece de la porción tendinosa (Trewavas, 1933), además de que ambos músculos constrictores (anterior y posterior) se encuentran muy separados entre sí. Ambas características difieren con las especies del grupo de *P. cuvieri* y del grupo de *P. biligonigerus* (ambas del clado *P. cuvieri*), por lo que estas diferencias en la porción tendinosa y la distancia entre los m. constrictores pueden contribuir a caracterizar los diferentes clados y grupos de especies y ser utilizados en la discriminación de especies.

Diferentes grados de desarrollo pueden observarse también cuando se comparan machos y hembras de la misma especie, como es el caso de *P. cuvieri* (Trewavas, 1933). En individuos machos de *P. cuvieri* (grupo *P. cuvieri*) la porción tendinosa está bien desarrollada con respecto a la porción fibrosa, cubriendo todo el borde anterior (cardíaco) del proceso cardíaco del cartílago cricoides (Trewavas, 1933, este estudio), mientras que en individuos hembras la porción tendinosa está reducida. Las variaciones entre sexo sugiere una función relacionada a la producción del sonido, característica de los machos y por lo tanto un carácter de dimorfismo sexual.

**Cartílagos laringeos.** En las especies estudiadas, la laringe es proporcionalmente más larga que ancha, en concordancia con los valores registrados previamente por de La Vega (2019). Para las especies estudiadas en este trabajo, esta proporción es mayor en las especies del grupo de *P. cuvieri* que en las del grupo de *P. biligonigerus*.

En cuanto a la morfología externa de los cartílagos laríngeos observada en *P. santafecinus*, *P. biligonigerus* (grupo de *P. biligonigerus*), *P. albonotatus* y *P. cristinae* (grupo de *P. cuvieri*) está conservada en relación a otros miembros de Leiuperinae. En particular, se caracteriza por el gran desarrollo del proceso cardíaco del cartílago cricoides que forma el piso ventral de la laringe, que

asociado a la gran extensión dorsal de los cartílagos aritenoides contribuye a la configuración cerrada de la laringe otorgándole una forma similar a una caja. No se conoce la anatomía de los cartílagos laríngeos en individuos machos de los géneros hermanos *Edalorhina* y *Pleurodema* pero en hembras de *Edalorhina perezi* y *Pleurodema bibroni* se registro un desarrollo moderado (Trewavas, 1933). Si estas especies presentaran dimorfismo sexual como lo observado en *Physalaemus cuvieri* Trewavas (1933) es probable que los machos presenten un mayor desarrollo del proceso cardíaco. Por lo tanto la expansión del proceso cardíaco podría ser una característica compartida entre la mayoría de los géneros de Leiuperinae, aunque con diferentes grados de desarrollo. En *Pseudopaludicola falcipes* la laringe presenta significativamente un menor grado de desarrollo del proceso cardíaco del cartílago cricoides y mantiene así el patrón anatómico general de los anuros (Trewavas, 1933). Esta modificación anatómica similar a una caja entre algunos géneros de la subfamilia Leiuperinae, refuerza la relación de parentesco filogenético entre los géneros y coinciden con la hipótesis filogenética actual. (Lourenco et al. 2015).

La laringe se encuentra sostenida al piso de la boca mediante uniones ligamentosas o cartilaginosas con el proceso posteromedial del cartílago hioideo (Trewavas, 1933). En este trabajo todas las especies analizadas presentaron una unión ligamentosa. Para *P. cristinae*, Lobo (1992) describió una unión ligamentosa, pero posteriormente, Lobo (1993) y Cardozo et al. (2023), describen una unión cartilaginosa tanto para *P. cristinae* como para *P. albonotatus*. Estas diferencias podrían indicar un posible polimorfismo en ambas especies, para confirmar esta hipótesis ser requieren estudios de variaciones intra e interpoblacional. La unión ligamentosa observada en *P. santafecinus* y *P. biligonigerus* coincide con lo mencionado por Lobo (1992). Este tipo de unión ha sido registrado también en *P. cuvieri* (grupo *P. cuvieri*), *P. nattereri* y *P. nanus* del clado *P. signifer* (Trewavas 1933, Lobo 1992 y 1993), *Engystomops pustulosus*, *Edalorhina perezi* y *Pleurodema bibroni* (Trewavas 1933). Otras especies donde esta unión es cartilaginosa son *P. fernandezae* (clado *P. cuvieri*), *P. maculiventris* (clado *P. signifer*) y en *Pseudopaludicola falcipes* (Lobo 1992, Trewavas 1933). A partir de estos resultados, observamos que en *Physalaemus* la información que puede brindar este carácter es limitada, dado que las uniones pueden ser ligamentosas o cartilaginosas, además de los estados polimórficos previamente mencionados. En un contexto más amplio, dentro de Leiuperinae, la unión cartilaginosa es propia sólo de algunas especies de *Physalaemus* y de *Pseudopaludicola*, un género basal dentro de Leiuperinae, con lo cual el estado cartilaginoso parece ser la condición ancestral.

Los cartílagos aritenoides aquí analizados muestran una articulación con su par y además con el cartílago cricoides en toda su extensión. Estos resultados no coinciden con lo observado en las especies estudiadas por de La Vega (2021), quien describe que los cartílagos aritenoides están fusionados dorsalmente en los dos últimos tercios de su extensión posterior.

La parte dorsal del anillo cricoideo tiene una apariencia estrecha en *P. albonotatus* y *P. cristinae* (grupo *P. cuvieri*) y es amplio en *P. santafecinus* y *P. biligonigerus* (grupo *P. biligonigerus*). Sin embargo, la mayoría de las especies presentan un anillo estrecho como lo descripto para *P. soaresi*, *P. maximus*, *P. feioi*, *P. orophilus*, *P. lateristriga* y *P. olfersii* del (grupo *P. olfersii*), *P. cuvieri* y *P. albifrons* (grupo *P. cuvieri*), *P. marmoratus* (grupo *P. biligonigerus*) y *P. gracilis* (grupo *P. gracilis*) pertenecientes al clado *P. cuvieri*. (de la Vega 2019). Además, se menciona que *P. nanus* (grupo *P. signifer*) del clado *P. signifer*, *Edalorhina perezi* y *Pseudopaludicola falcipes* presentan una característica similar de anillo estrecho

(Trewavas 1933). No obstante y por el contrario se describe que sólo *Pleurodema bibroni* muestra un anillo más ancho (Trewavas 1933). Esto indicaría que no es un carácter de relevancia para distinguir especies dentro de un grupo.

El proceso faríngeo se observa más pronunciado en las especies del grupo *P. cuvieri*, mientras que en las especies del grupo *P. biligonigerus* no se diferencia. No obstante en las descripciones para *P. cuvieri*, *P. nanus*, *Pleurodema bibroni* y en *Pseudopaludicola falcipes* es pronunciado y se lo describe como un proceso corto (Trewavas 1933). Además se establece una relación notable entre el desarrollo del proceso faríngeo y las dimensiones del anillo cricoideo. Se observa que, cuando el anillo es estrecho, el proceso faríngeo es pronunciado. En contraste si el anillo es amplio, el proceso faríngeo no se diferencia.

Los procesos bronquiales en las especies estudiadas mostraron diferencias entre los grupos. En el grupo *P. biligonigerus* son más anchos que largos con extremos curvados y esta característica coincide con lo observado en *P. santafecinus*, *P. biligonigerus* y *P. marmoratus* perteneciente al mismo grupo (de La Vega, 2019). En cambio en el grupo *P. cuvieri* los extremos son rectos y más largos que anchos. Esta forma coincide con lo observado para las especies de este trabajo del mismo grupo así como en *P. cuvieri* y *P. albifrons*, variando en estas últimas, el extremo redondeado o bifurcado respectivamente (Trewavas 1933; de La Vega 2019). En otras especies de la subfamilia, este proceso adquiere diversa morfología como en *P. gracilis* (grupo *P. gracilis*), donde presentan terminaciones bifurcadas semicirculares. En las especies del grupo *P. olfersii* varían desde procesos simples con bases anchas y extremos aguzados a procesos amplios anchos cubriendo toda la superficie ventral de la laringe como un solo cuerpo y con extremos anchos, condicionando así la amplitud de la escotadura bronquial. En *P. nanus* (grupo *P. signifer*) del clado *P. signifer* los procesos bronquiales son simples y rectos. En individuos machos de *Physalaemus spp.* y *Engystomops pustulosus* se observa una morfología simple, menos variable (Trewavas 1933; de La Vega 2019). A diferencia de *Pseudopaludicola falcipes* con una morfología diferente, variable, con procesos largos, delgados, dando tres ramas donde se curvan sobre la raíz del pulmón (Trewavas 1933). En hembras de *Pleurodema bibroni* los procesos también son variables, robustos, con el extremo trirradiado romo y ampliamente ensanchados y por el contrario en hembras de *Edalorhina perezi* son simples, delgados, uno con una rama diminuta y acompañados del par de procesos cardiacos posteriores. (Trewavas 1933).

En la superficie ventral de la laringe, el borde posterior del seno cricoideo en las especies aquí estudiadas presentan variaciones en cuanto a su forma. En el caso de las especies del grupo *P. biligonigerus* tiene forma rectangular, mientras que en las especies del grupo *P. cuvieri* tiene forma de "U". Según este estudio indicaría que existe una forma determinada para especies de un mismo grupo. Sin embargo en el trabajo de Lobo (1993), contrariamente a lo descripto aquí el borde posterior del seno cricoideo en *P. albonotatus* es trilobulado o en forma de "W", mientras que en *P. cristinae* y *P. cuvieri* coincide con forma de "U". Más recientemente Cardozo (2023) menciona que las formas de "U" o de "W" se observan tanto en *P. albonotatus* como en *P. cristinae*, lo cual no sería un carácter discriminante entre ambas especies. Estas contradicciones requieren de nuevos estudios en *P. albonotatus* y *P. cristinae* que permitan reevaluar su morfología y determinar si existen variaciones poblacionales.

Por último, en vista lateral se observa el borde posterior del seno cricoideo como un pico con una posición anterior en las especies estudiadas. Esto coincide con los resultados para las especies *P. marmoratus* (grupo *P. biligonigerus*), *P. cuvieri*, *P. albifrons* (grupo *P. cuvieri*), mientras que en *P. gracilis* (grupo *P. gracilis*) el pico tiene una posición central y en todas las especies del grupo *P. olfersii* una posición posterior (de La Vega 2019). Por lo que la posición anterior del pico en las especies de ambos grupos estudiados aquí, puede contribuir a caracterizar los grupos de especies y ser utilizados para discriminar especies.

## CONCLUSIONES

La morfología del aparato fonador de *P. santafecinus* y de *P. biligonigerus* (del grupo de *P. biligonigerus*), y de *P. albonotatus* y de *P. cristinae* (del grupo de *P. cuvieri*) es similar entre sí y al de otras especies de *Physalaemus* previamente conocidas, con lo cual puede considerarse una estructura conservada dentro del género. Distintivamente, comparten un gran desarrollo del proceso cardíaco del cartílago cricoideo que determina que la laringe tenga la forma de caja cerrada. Además, los haces superficiales y profundos del m. dilatador de la laringe son evidentes, con lo cual es probable que el haz profundo represente al músculo *arylabialis* (=haz profundo), si bien debería ser confirmado con estudios complementarios que analicen la inervación.

Algunas características como la forma, el tamaño y el desarrollo de ciertos componentes del aparato fonador pueden contribuir a caracterizar diferentes grupos de especies y clados en el género. Incluso a partir de comparaciones con otros géneros afines que conforman la subfamilia Leiuperinae, evaluar su variación en un contexto filogenético.

Al comparar géneros cercanamente emparentados se encontró una mayor similitud entre *Physalaemus*, *Engystomops*, *Edalorhina* y *Pleurodema*, y más lejanamente con *Pseudopaludicola*, en correspondencia con las hipótesis filogenéticas actuales dentro de la subfamilia Leiuperinae,

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis directores Fernanda y Victor por darme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación en el Laboratorio de Herpetología de la FaCENA de la Universidad Nacional del Nordeste. En especial a Victor por brindarme todas las herramientas necesarias para realizarlo. A todos los integrantes del Laboratorio quienes de alguna manera colaboraron con el trabajo.

Agradecer también al Consejo Interuniversitario Nacional por el otorgamiento de la beca de pregrado de Estímulo a las Vocaciones Científicas, cuyo trabajo también fue realizado en el marco de esta beca.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barrio, A. 1965. El género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis*, XXV: 421-448.
- Barrio, A. 1967. Notas complementarias sobre el género *Physalaemus* Fitzinger (Anura: Leptodactylidae). *Physis*, 27(74), 5-8.
- Cardozo, D., C. Tomatis, A. S. Duport Bru, F. Kolenc, C. Borteiro, A. Pansonato, V. Confalonieri, L.B. Lourenco, C.F.B. Haddad y D. Baldo. 2023. The Taxonomic Status of *Physalaemus cuqui* Lobo, 1993, with the Description of a New Species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina and Paraguay. *Herpetological Monographs*, 37(1), 95-128.
- de La Vega, B., J. P. Pombal Jr. y F. Hepp. 2021. Description and evolution of the larynx of the *Physalaemus olfersii* species group, with remarks on the laryngeal anatomy of the *P. cuvieri* clade (Amphibia: Anura: Leiuperinae). *Journal of anatomy*, 00, 1–26.
- Drewry, G. E., W.R. Heyer y A. S. Rand. 1982. A functional analysis of the complex call of the frog *Physalaemus pustulosus*. *Copeia*, 636–645.
- Ferrari, L. y M. Vaira. 2001. Advertisement Call and breeding activity of *Physalaemus cuqui* (Lobo, 1993). *Herpetological Bulletin*, 77, 20–22.
- Frost, D. R. 2024. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Versión 6.2 (12/03/2024). Electronic Data base accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001.
- Gaupp E. 1904. Anatomie des Frosches. 2nd ed. Braunschweig: Friedrich Vieweg und Sohn. p 961.
- Gridi-Papp M. 2003. Mechanism, Behavior and Evolution of Calling in Four North American Tree Frogs. PhD Dissertation, The University of Texas, Austin, 177.
- Guerra, M. A., M. J. Ryan y D. C. Cannatella. 2014. Ontogeny of Sexual Dimorphism in the Larynx of the Tungara Frog, *Physalaemus pustulosus*. *Copeia*, No. 1, 123–129.
- Hepp, F. y J. P. Pombal Jr. 2020. Review of bioacoustical traits in the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae). *Zootaxa* 4725 (1): 001–106.
- Krause R. 1920. Beiträge zur Kenntnis der Stimmlade des Frosches. *Arch Für Mikrosk Anat* 94:268–287.
- Kohler, J., M. Jansen., A. Rodriguez., P. J. Kok., L. F. Toledo., M. Emmrich., M. Vence. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa*, 4251, 1–124.
- IUCN 2024. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022.2. Disponible en: <<http://www.iucnredlist.org>>. Último acceso 10 de Marzo de 2024.

- Lagorio, A.D., K. Grewal., S. Djuhari., K. Le., R. Mulhim y M. Gridi-Papp. 2019. The Arylabialis Muscle of the túngara frog (*Engystomops pustulosus*). *Anatomical Record*, 303, 1966-1976
- Laurent, R.F. 1969. "Diferencias morfológicas entre especies crípticas de los géneros *Pleurodema* y *Physalaemus*." *Acta Zoológica Lilloana*, 25, 81-96.
- Lobo, F., 1992. Descripción osteológica de *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leptodactylidae) y comparación con otras especies del género. *Acta Zoologica Lilloana*, Tucumán, 42(1):51-56.
- Lobo, F. 1993. Descripción de una nueva especie del género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) del noroeste de la Argentina. *Revista Española de Herpetología* 7: 13-20.
- Lourenco, L. B., C. P. Targueta., D. Baldo., J. Nascimento., P. C. A. García., G. V. Andrade., C. F. B.Haddad y S. M. Recco Pimentel. 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 92, 2004-2016.
- Nascimento, R.L., U. Caramaschi y C. Goncalves Cruz. 2005. Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of the genera *Engystomops* Jiménez-de-la-Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner 1863 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, v.63, n.2, p.297-320, abr./jun.2005 ISSN 0365-4508
- Pérez Iglesias, J.M. y G.S. Natale. 2013. *Physalaemus cuqui* Lobo, 1993. Ampliación de la distribución y primer registro para la provincia de Santiago del Estero, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 27 (2), 173–176.
- Ryan M. J. y M. A. Guerra. 2014. The mechanism of sound production in túngara frogs and its role in sexual selection and speciation. *Current Opinion in Neurobiology*, 28:54–59.
- Schmidt R .S. 1972. Release calling and inflating movements in anurans. *Copeia* 1972: 240-245.
- Silverman J. 2015. The institutional animal care and use committee. In *Research Regulatory Compliance*. Academic Press. (pp. 41-78).
- Trewavas E. 1933. The hyoid and larynx of the Anura. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 222:401-527.
- Vaira, M., M. Akmentins., M. Attademo., D. Baldo., D. Barrasso., S. Barrionuevo., ... y V. Zaracho. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de herpetología*, 26, 131-159.
- Wassersug, R.J. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain technology*, 51(2), 131-134.