



Universidad Nacional de Córdoba – Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Histomorfología del tegumento de individuos de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leptodactylidae) provenientes de dos ambientes con diferente grado de perturbación antrópica



Tesinista: Hebe Marianne Ibañez

Firma:

Director: Fernando José Carezzano

Firma:

Lugar de Trabajo: Cátedra de Morfología Animal; Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; Universidad Nacional de Córdoba.

Febrero 2021
Córdoba, Argentina

El presente trabajo se redactó siguiendo las normas de publicación de la revista **Iheringia**, **Série Zoologia**, editada por el “Museu de Ciências Naturais” de la “Fundação Zoobotânico Rio Grande do Sul”.

Agradecimientos

Primeramente, mi profundo agradecimiento es para mi Dios, papá y creador, quien derramó una gracia inmensa para que pudiera llegar a esta meta.

A mi mamá, Hebe, valiente, decidida y esforzada, que siempre me impulsó a volver a intentar y enfrentar los temores. A mi papá, quien dejó en mi corazón mucho amor, paciencia y consejos sabios. A mi hermana Andre, uno de mis regalos más lindos y de quien aprendo muchas cosas valiosas.

A mis amigas, en especial a Ceci Romero, que me permitió conocer su corazón hermoso durante este tiempo de facultad. Siempre tan compañera, fiel, honesta, dispuesta a ayudar y escuchar. ¡Tantos momentos pasamos que no se pueden resumir en algunas líneas! A Mar Lorenzati, siempre con una sonrisa y con mucha garra para ir en pos de los desafíos nuevos, paciente y compañera, que me ayudó a permanecer y a mirar siempre lo bueno. Realmente no podría haber llegado hasta acá sin el empuje de ellas dos en diferentes situaciones. A Mica Sanchez y Vicky Prelato, que también fueron súper importantes en este proceso. A mi amiga Ange Julio, que me dio una mano enorme con la presentación de este trabajo, y a Caro Bustamante, que junto con Ange me impulsaron a ir por más en diferentes aspectos y celebraron conmigo cada victoria. ¡¡¡Gracias chicas!!!

Pastores y edificadores que me guiaron con un corazón puro por este camino precioso de libertad, y muchas personas más que fueron un regalo para diferentes tiempos. ¡Gracias y más gracias!

También quiero expresar mi agradecimiento a la Cátedra de Anatomía Comparada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la UNC, y al Laboratorio de Ecotoxicología de la UNL por el préstamo de los ejemplares analizados, a los miembros del tribunal por los comentarios y sugerencias en cuanto al manuscrito, y finalmente, a Fernando Carezzano, quien abrió muchas puertas para que pudiera finalizar esta etapa de tesina, y estuvo presente y atento para ayudarme hasta en los detalles más mínimos de este trabajo. ¡Gracias por la buena predisposición y cada corrección de cada uno!

*You provide (Psalm 23.5)
Aleph and Tav, who is, who was (Ap.1:8)*

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Materiales y métodos	8
3.1 Material biológico	8
3.2 Histología	8
3.3 Análisis morfométrico	9
3.4 Análisis estadístico	9
4. Resultados	10
4.1 Características histomorfológicas	10
4.2 Características morfométricas	11
5. Discusión	12
5.1 Análisis histomorfológico	12
5.2 Análisis morfométrico	15
6. Conclusiones	18
7. Referencias bibliográficas	20
8. Tabla	28
9. Figuras	30

Histomorfología del tegumento de individuos de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leptodactylidae) provenientes de dos ambientes con diferente grado de perturbación antrópica

1. RESUMEN

Se analizó el tegumento de individuos adultos de *Physalaemus biligonigerus* provenientes de dos ambientes con diferente grado de perturbación antrópica, con el fin de evaluar la presencia de variaciones histomorfológicas. Diez anuros fueron examinados, cinco de ellos provenientes de un agroecosistema del sur de la Provincia de Córdoba, caracterizado por presentar alto grado de perturbación antrópica, mientras que los cinco restantes fueron extraídos de un bosque ripario de la provincia de Santa Fe, con bajo grado de perturbación antrópica. Se tomaron muestras de las regiones medio dorsal (MD), medio ventral (MV) e inguinal (I) de cada anfibio, que fueron procesadas siguiendo técnicas histológicas de rutina, para luego realizar cortes seriados de 5µm de espesor y proceder a teñirlos con Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Casson y Azul de Toluidina. En base a los resultados, se concluye que el tegumento de *P. biligonigerus* presenta la estructura básica descrita para el subphylum Vertebrata constituida por dos capas, la epidermis y la dermis, junto con sus respectivos estratos, los cuales poseen las características específicas del orden Anura, a partir de las cuales se hallaron diferencias entre los grupos analizados. En los anfibios del agroecosistema se encontró una mayor proporción de estrato córneo queratinizado en las regiones MD e I, mientras que en la región MV fueron más frecuentes las células vivas. Además, el estrato granuloso alcanzó el máximo número de capas celulares en las tres regiones corporales en este mismo grupo, y tanto en este estrato como en el germinativo se observaron escasas células de Merkel. En los anuros de Santa Fe, las células queratinizadas del estrato córneo estuvieron mayormente presentes en las regiones MD y MV, mientras que en la región I sobreabundaron las células vivas. Tanto en el estrato granuloso como en el germinativo de este último grupo, se hallaron muchas células de Merkel. Las células en forma de matraz estuvieron raramente presentes en los estratos granuloso y germinativo de todos los especímenes. Otro atributo distintivo fue la alta vascularización del estrato esponjoso de la región I de los ejemplares provenientes del bosque. No se encontraron diferencias en la estructura del estrato compacto de la dermis,

presentando en todos los casos fibras colágenas ascendente separando a las fibras de tejido conectivo denso paralelas a la superficie corporal. A partir del análisis morfométrico se encontraron diferencias significativas en el grosor del tegumento, siendo mayor en los individuos del agroecosistema. Con respecto a las capas, la epidermis de la región I fue la única que presentó el mismo espesor promedio para ambos grupos. Los estratos fueron de mayor grosor en los anuros de Córdoba, excepto por el córneo de la región MD, el esponjoso de la región MV, y ambos estratos de la región I de los individuos de Santa Fe. Finalmente, se halló la capa de Eberth-Katschenko en todos los ejemplares, ubicada entre la dermis esponjosa y la compacta de forma discontinua, sin células asociadas. Las diferencias halladas pueden deberse a una multiplicidad de factores, pero podrían estar respondiendo al grado de perturbación antrópica de cada localidades, teniendo en cuenta la intensa actividad agropecuaria que se lleva a cabo en los humedales del sur de Córdoba, para la cual se utilizan, entre otros químicos, fármacos, antibióticos y agroquímicos, siendo estos últimos aplicados entre los meses de octubre y marzo, coincidente con la época de mayor actividad biológica de los anfibios.

Palabras claves: Anfibios, alteraciones somáticas, agroecosistema, bosque ripario.

2. INTRODUCCIÓN

La clase Amphibia posee 8175 especies, de las cuales 7207 corresponden al orden Anura (FROST, 2020). En Argentina se han identificado 175 especies (VAIRA *et al.*, 2012), citándose 31 para la Provincia de Córdoba (DI TADA *et al.*, 1996), 14 de las cuales habitan los extensos agroecosistemas del sur, donde hace décadas se lleva a cabo una intensa actividad agropecuaria (CAREZZANO & CABRERA, 2010a; 2010b; 2011; CAREZZANO *et al.*, 2013a; 2013b; CAREZZANO *et al.*, 2014) que conlleva el uso de millones de litros de agroquímicos (RAMÍREZ, 2006) aplicados entre los meses de octubre y marzo, coincidente con la época de mayor actividad biológica de los anfibios (BARDONE URQUIZA & COSTA CAREZZANO, 2013). Estas sustancias han sido clasificadas como agentes estresores (SIMON *et al.*, 2011) o contaminantes químicos (VAIRA *et al.*, 2012) de las poblaciones de anuros, las cuales, por su complejo ciclo de vida pueden verse afectadas durante los estadios larvales en el agua o en sus fases posteriores en la tierra (COTHRAN *et al.*, 2013), de forma directa e indirecta (SPARLING *et al.*, 2010). Entre los efectos subletales que pueden provocar se encuentran cambios en el comportamiento y la fisiología o endocrinología (ROHR & PALMER, 2005; HAYES *et al.*, 2010). Algunos grupos parecen haber adquirido mayor resistencia que otros (HAMMOND *et al.*, 2012; COTHRAN *et al.*, 2013). Por otro lado, hay casos en los cuales no han podido sobreponerse a las condiciones ambientales sobreviniendo la muerte (HAYES *et al.*, 2010).

La presencia de los anuros en diferentes ecosistemas es fundamental ya que llevan a cabo controles biológicos de plagas y de enfermedades agrícolas, mejoran el reciclado de nutrientes, son altamente eficientes en la conversión de biomasa y constituyen la mayor fuente de energía de otros vertebrados (STEBBINS & COHEN, 1995; LIPS *et al.*, 1999). Además, dada su sensibilidad con los cambios estructurales en el hábitat, son considerados excelentes bioindicadores de la calidad ambiental de ecosistemas tanto acuáticos como terrestres (SIMON *et al.*, 2011; SILVA RODRIGUES *et al.*, 2017). Dicha sensibilidad es atribuida, en parte, al hecho de que poseen un tegumento altamente permeable (DUELLMAN & TRUEB, 1994; HAYES *et al.*, 2010; VITT & CALDWELL, 2014).

El tegumento es uno de los órganos más importantes en la biología de los anuros ya que cumple funciones tales como defensa contra posibles predadores y protección ante la desecación, participa en la termorregulación, permite la percepción sensorial y el

intercambio gaseoso (DUELLMAN & TRUEB, 1994; GREVEN *et al.*, 1995; VITT & CALDWELL, 2014). Estructuralmente consta de dos capas, la epidermis y la dermis. La primera está compuesta por tres estratos, el córneo, el granuloso y el germinativo, mientras que la dermis posee dos, el estrato esponjoso o laxo y el compacto (DUELLMAN & TRUEB, 1994; FELSEMBURGH *et al.*, 2007; MANGIONE *et al.*, 2011; VITT & CALDWELL, 2014). El estrato córneo puede presentar elevaciones dérmicas como verrugas, tubérculos cónicos cornificados, espinas o papilas (ELÍAS & SHAPIRO, 1957; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH & DE BRITO-GITIRANA, 2008), y sus células pueden ser anucleadas o pueden poseer núcleos picnóticos (DUELLMAN & TRUEB, 1994; LILLYWHITE *et al.*, 1997). El granuloso está constituido por queratinocitos, y en algunos casos, células en forma de matraz (*flask cells*), relacionadas con el transporte iónico, y células de Merkel, que llevarían a cabo la función de mecanorrecepción (DUELLMAN & TRUEB, 1994; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; VALENTE-TEIXEIRA, 2014; OLEA *et al.*, 2019). El estrato germinativo está conformado por la capa de células que apoya en la lámina basal, entre las cuales también pueden estar presentes células en forma de matraz y células de Merkel (DUELLMAN & TRUEB, 1994). La dermis esponjosa está compuesta por tejido conectivo laxo con fibras elásticas y colágenas, glándulas ectodérmicas multicelulares de tipo mucosa y serosa, vasos sanguíneos y cromatóforos (QUAY, 1972; DUELLMAN & TRUEB, 1994; DELFINO *et al.*, 1998; BRIZZI *et al.*, 2002). Finalmente, la dermis compacta presenta tejido conectivo denso con fibras colágenas posicionadas en paquetes paralelos a la superficie corporal, que pueden estar separadas por agrupaciones de fibras colágenas verticales llamadas tejido conectivo ascendente, que recorren toda la dermis partiendo de la base de este estrato (GREVEN *et al.*, 1995; SCHWINGER *et al.*, 2001).

En algunos anfibios se observa la capa de Eberth-Katschenko (E-K) (PORTO, 1936; ELKAN, 1968; SCHWINGER *et al.*, 2001; LENZI-MATTOS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; JARED *et al.*, 2009; VALENTE-TEIXEIRA, 2014; REGUEIRA *et al.*, 2016) cuya localización varía, pudiendo estar inmersa en la dermis esponjosa (MANGIONE & LAVILLA, 2004), dispuesta entre el estrato esponjoso y el compacto (AZEVEDO *et al.*, 2006; MANGIONE *et al.*, 2011), o entre este último y la hipodermis (GARCÍA *et al.*, 2011). La capa E-K consiste en una sustancia fundamental amorfa con fibras elásticas y colágenas, entre las cuales se depositan sales de calcio y fósforo. Glicosaminoglicanos

unidos covalentemente a proteínas, radicales sulfato y carboxilo, junto a minerales como el potasio, zinc y sodio son también componentes de la sustancia amorfa de esta capa (TOLEDO & JARED, 1993). Su morfología varía pudiendo ser simple (TOLEDO & JARED, 1993; MANGIONE & LAVILLA, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007; MANGIONE *et al.*, 2011), doble (KALTENBACH *et al.*, 2004; GARCÍA *et al.*, 2011), acelular o con presencia de células asociadas (ELKAN, 1968; AZEVEDO *et al.*, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; GARCÍA *et al.*, 2011; MANGIONE *et al.*, 2011; VALENTE-TEIXEIRA, 2014). Se cree que participa en la protección mecánica y en la regulación hídrica evitando la desecación, pero también se ha propuesto como parte del proceso de osmorregulación por medio de su intervención en la homeostasis mineral (ELKAN, 1968; 1976; TOLEDO & JARED, 1993; GARCÍA *et al.*, 2011; VALENTE-TEIXEIRA, 2014). Wells (2007) y Valente-Teixeira (2014) plantean que podría actuar como reservorio de minerales importantes para llevar a cabo la osmorregulación. Por otro lado, se ha sugerido que podría ser una barrera para el intercambio entre el interior de los anuros y su medio ambiente (TOLEDO & JARED, 1993; AZEVEDO *et al.*, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2009) disminuyendo la capacidad de absorción de agua del tegumento, y que además incrementaría la dificultad del transporte de agua a través de dicho órgano (DUELLMAN & TRUEB, 1994). No obstante, podría tratarse de una estructura vestigial del esqueleto dérmico de anfibios ancestrales (KATCHBURIAN *et al.*, 2001; MANGIONE *et al.*, 2011).

Las variaciones encontradas en el tegumento de los anuros han sido consideradas parámetros para diferenciar especies (FELSEMBURGH *et al.*, 2009), pero también se han observado variaciones dentro de un mismo taxón dependiendo de la edad, el sexo, la ecología o el modo de vida (AZEVEDO *et al.*, 2005; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; LENZI-MATTOS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; GONÇALVES & DE BRITO-GITIRANA, 2008; REGUEIRA *et al.*, 2016). A su vez, las regiones corporales divergen (SCHWINGER *et al.*, 2001; GONÇALVES & DE BRITO-GITIRANA, 2008; VALENTE-TEIXEIRA, 2014), probablemente a causa de variaciones en las propiedades fisiológicas del órgano (GREVEN *et al.*, 1995). Algunas de las características donde se han encontrado desigualdades son el espesor del tegumento (GREVEN *et al.*, 1995; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; JARED *et al.*, 2009), la densidad y el tipo de glándulas (PRATES *et al.*, 2012; OLEA *et al.*, 2019) o los diferentes tipos de secreción independientemente de la similitud

morfológica de las mismas (REGUEIRA *et al.*, 2016), la proporción de vasos sanguíneos (DUELLMAN & TRUEB, 1994; WELLS, 2007), la abundancia de células de Merkel (VALENTE-TEIXEIRA, 2014) y de células en forma de matraz (FELSEMBURGH *et al.*, 2009), de cromatóforos, osteodermos y otros anexos tegumentarios (ELÍAS & SHAPIRO, 1957; DUELLMAN & TRUEB, 1994; TOLEDO & JARED, 1995; DELFINO *et al.*, 1999; 2002; FELSEMBURGH *et al.*, 2007; GARCÍA *et al.*, 2011; REGUEIRA *et al.*, 2016; SILVA RODRIGUES *et al.*, 2017). Sin embargo, no se ha encontrado bibliografía que haga referencia a los efectos de los químicos provenientes de la actividad antrópica en la histomorfología del tegumento de los anuros.

Physalaemus biligonigerus (Cope 1861) (n.v.: ranita llorona) pertenece a la familia Leptodactylidae, la cual tiene tres subfamilias: Leiuperinae, Leptodactylinae y Paratelmatoibiinae, entre las cuales se reparten 218 especies. Esta rana se encuentra dentro de la primera subfamilia, la cual cuenta con 5 géneros, dentro de los cuales, *Physalaemus* consta de 49 especies (FROST, 2020). Es un anuro de pequeño tamaño y distribución neotropical, presente en la región norte y centro de nuestro país, desde las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca y La Rioja, atravesando Córdoba y Santa Fe, para llegar a las provincias de Misiones, Corrientes, Entre Ríos, y norte de Buenos Aires y de La Pampa (CEI, 1980).

Objetivo general

Develar modificaciones estructurales del tegumento de individuos adultos de *P. biligonigerus*, relacionadas al grado de perturbación ambiental, mediante un análisis comparado de las características cualitativas y cuantitativas del mismo.

Objetivos específicos

- Caracterizar los diferentes estratos del tegumento de *P. biligonigerus* mediante estudios histomorfológicos.
- Determinar variaciones histológicas y morfológicas del tegumento de distintas regiones corporales.

Hipótesis

Individuos adultos de *P. biligonigerus* provenientes de un ambiente con mayor alteración antrópica presentarían modificaciones tegumentarias con respecto a los de un ambiente con menor grado de perturbación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *Material biológico*

Se eligieron cinco individuos adultos de *P. biligonigerus* (Fig. 1) por muestra, por considerarse un número manejable y útil a los fines del presente trabajo. El primer grupo fue extraído de la Colección Herpetológica de la Cátedra de Anatomía Comparada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, de la Universidad Nacional de Córdoba (AC-778, AC-783, AC-787, AC-789 y AC-790). Los mismos provienen de un agroecosistema del sur de la Provincia de Córdoba (33°01'32"S; 63°33'07"W) (Fig. 2A), que es una extensa región compuesta por humedales, donde se distribuyen lagunas de diferentes orígenes, profundidades y extensiones (AIMAR *et al.*, 2010). Dichos espejos de agua se forman en campos donde se llevan a cabo actividades agrícolas y ganaderas, en las cuales se hace un uso intensivo de agroquímicos tales como fertilizantes, herbicidas y plaguicidas, además de antibióticos y otros fármacos, que determinan que la zona presente alta perturbación antrópica (BARDONE URQUIZA & COSTA CAREZZANO, 2013; CAREZZANO *et al.*, 2013a; 2013b).

El segundo grupo estuvo compuesto por cinco individuos de la misma especie procedentes de la Colección Herpetológica del Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad Nacional del Litoral (FCBC-UNL 3824-3828), recolectados en un bosque ripario de la Provincia de Santa Fe (30°32'32''S; 59°54'56''W) (Fig. 2B), que se encuentra enmarcado dentro de la región del valle de inundación del río Paraná (LAJMANOVICH, 1991) y presenta baja perturbación antrópica (PELTZER *et al.*, 2010).

Todos los ejemplares se encontraron fijados en formalina al 10% y conservados en etanol al 70%.

3.2 *Histología*

Se tomaron muestras del tegumento de las regiones medio dorsal (MD), medio ventral (MV) e inguinal (I) de cada individuo. Las mismas fueron deshidratadas en soluciones de graduación creciente de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en parafina. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 5µm de espesor que fueron montados y coloreados con Hematoxilina-Eosina, Tricrómico de Casson y Azul de Toluidina.

3.3 *Análisis morfológico*

Por cada región corporal se seleccionaron 10 cortes que fueron fotografiados empleando una cámara digital AxioCam ERc 5s Carl Zeiss, adosada a un microscopio Primo Star Carl Zeiss. Además, se realizaron 10 mediciones por corte del espesor de cada estrato con el programa Fiji (SCHINDELIN *et al.*, 2012), para finalmente obtener el grosor del tegumento completo.

3.4 *Análisis Estadístico*

Los datos obtenidos se analizaron a través de estadísticos descriptivos empleando el software R versión 3.2.2 (2015). Se aplicaron los test de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965) y el de Levene (LEVENE, 1960) a los fines de determinar si los errores presentaban distribución normal y si sus varianzas eran homogéneas. Aquellas variables que no cumplieron con los supuestos mencionados se sometieron al análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los valores p fueron $< 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 *Características histomorfológicas*

Se distinguieron las dos capas características del tegumento de vertebrados en general, la epidermis y la dermis, junto con sus estratos, los cuales presentaron características específicas del orden Anura.

En el estrato córneo de la epidermis se observaron células con diferente morfología. En primer lugar, las tres regiones corporales de los especímenes de Ucache presentaron una capa de células planas anucleadas, predominantemente en las regiones MD e I (Fig. 3 y 7), mientras que los ejemplares de Santa Fe la tuvieron en las regiones MD y MV (Fig. 4 y 5), en la mayoría de los casos. En segundo lugar, células un poco más altas y con núcleos picnóticos fueron vistas en todas las regiones corporales del grupo del agroecosistema (Fig. 3 y 7), sobre todo en la región MV. Dichas células con núcleos picnóticos también se hallaron en las regiones MV (Fig. 6) e I (Fig. 8) de los anuros del bosque, sobre todo en la región I, donde a su vez, se las encontró dispuestas en dos capas en ciertos sectores. Por su parte, las elevaciones dérmicas estuvieron ausentes en todos los casos.

El estrato granuloso estuvo compuesto por células en diferenciación (queratinocitos) cúbicas o cúbicas altas, dispuestas en capas que variaron en número de acuerdo con la región corporal y el ambiente. Los anfibios del agroecosistema presentaron de 1 a 4 capas celulares en la región MD, 1 a 6 en la región MV, y de 1 a 3 en la región I (Fig. 3 y 7). Los anuros del bosque presentaron de 1 a 2 capas en la región MD, 1 a 4 en la región MV, y de 1 a 3 en la región I (Fig. 4, 5, 6 y 8). En cuanto a las células en forma de matraz, fueron escasas en todos los ejemplares (Fig. 4 y 6). Con respecto a las células de Merkel, estuvieron poco presentes en el grupo de Ucache (Fig. 7), diferente a lo observado en los anuros de Santa Fe (Fig. 4, 5, 6 y 8).

El estrato germinativo, constituido principalmente por una capa de células cúbicas, contó con una pequeña cantidad de células en forma de matraz en los diez ejemplares. Pocas células de Merkel fueron encontradas en el grupo del agroecosistema, mientras que lo opuesto ocurrió en el del bosque, sobre todo en las regiones MD y MV (Fig. 5, 6 y 8).

En el estrato esponjoso de la dermis de todos los ejemplares se encontró tejido conectivo laxo con fibras elásticas y colágenas distribuidas de manera laxa, glándulas exocrinas multicelulares de tipo mucosa y serosa, y vasos sanguíneos. Los cromatóforos

estuvieron presentes en la región MD de todos los anfibios analizados (Fig. 3 y 4), y muchos vasos sanguíneos fueron vistos en la región I del grupo de Santa Fe (Fig.8).

En el estrato compacto se halló tejido conectivo denso con fibras colágenas posicionadas en paquetes paralelos a la superficie corporal, separadas por paquetes de fibras colágenas verticales (Fig. 3 y 4). También fue posible observar vasos sanguíneos transitando de un estrato a otro por medio del tejido conectivo ascendente (Fig. 7).

La capa E-K fue hallada en las tres regiones corporales de ambos grupos, siendo su morfología simple, es decir que una sola capa fue vista entre los estratos dérmicos, dispuesta de forma discontinua y desprovista de células asociadas. Presentó mayor opacidad y grosor en los individuos de Ucacha, en comparación con los individuos de Santa Fe (Fig. 3 y 4). A su vez, en estos últimos, tuvo menor espesor y fue escasamente vista en la I.

4.2 Características morfométricas

Los espesores medios junto con sus desvíos estándar se encuentran en la Tabla 1. A partir del análisis estadístico se pudo comprobar que el tegumento de mayor grosor fue el de los anfibios del agroecosistema. A su vez, en este grupo se encontró que la región de mayor espesor fue la MD, seguida por la MV y finalmente la I, que fue la región más fina de todas. En los anuros del bosque, la región MD también presentó el mayor grosor, seguida por la región I y finalmente la MV.

En todos los casos la epidermis fue más fina que la dermis, y a su vez, la primera capa presentó mayor espesor en la región MV, seguida por la I y finalmente la MD, mientras que la dermis fue más gruesa en la región MD, seguida por la I y luego la MV, donde fue más fina. Por otro lado, se encontraron diferencias entre los grupos al comparar las capas de cada región corporal entre sí, siendo ambas de mayor grosor en los anfibios del agroecosistema, excepto por la epidermis de la región I, que presentó el mismo espesor promedio en ambas localidades.

La mayoría de los estratos fueron de mayor dimensión en los anuros de Ucacha, excepto por el córneo de la región MD, el esponjoso de la región MV, y tanto el estrato córneo como el esponjoso de la región I, los cuales fueron de mayor espesor en Santa Fe.

5. DISCUSIÓN

5.1 *Análisis histomorfológico*

En el presente trabajo se encontró la misma estructura básica descrita para el tegumento de los vertebrados en general, la cual consta de dos capas, epidermis y dermis, cada una con sus respectivos estratos (TOLEDO & JARED, 1993; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2006; MANGIONE *et al.*, 2011; VITT & CALDWELL, 2014). Cada estrato presentó características comunes al orden Anura (DUELLMAN & TRUEB, 1994), en las cuales se sabe que existe un rango de variación de tipo especie-específico (FELSEMBURGH *et al.*, 2009). Además, se ha encontrado un alto grado de plasticidad dentro de cada taxón dependiendo de la edad o el sexo (AZEVEDO *et al.*, 2005; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; LENZI-MATTOS *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; GONÇALVES & DE BRITO-GITIRANA, 2008; REGUEIRA *et al.*, 2016), pero también dependiendo de la región corporal analizada (SCHWINGER *et al.*, 2001; GONÇALVES & DE BRITO-GITIRANA, 2008; VALENTE-TEIXEIRA, 2014) debido a que ciertas variaciones podrían estar asociadas a cambios en las propiedades fisiológicas del tegumento (GREVEN *et al.*, 1995). El modo de vida de estos vertebrados también se ha planteado como inductor de cambios, ya que se considera a la estructura como un reflejo del comportamiento, el microhábitat y las adaptaciones a éste (DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; VALENTE-TEIXEIRA, 2014). Sin embargo, los efectos de los químicos provenientes de la actividad antrópica en la histomorfoloía del tegumento de los anuros no han sido estudiados.

Se ha postulado que las características de las células del estrato córneo desempeña un papel importante en el control del ingreso de sustancias (WANCZINSKI *et al.*, 2007), debido a que la queratina de las células planas anucleadas presenta una de las estructuras más resistentes a los químicos (LILLYWHITE *et al.*, 1997). Aun así, se ha descubierto que los agentes deformantes son capaces de disociar su estructura (PEYREFITTE *et al.*, 1998). Las variaciones en las características de este estrato fueron examinadas junto con los aspectos morfométricos, por lo cual la interpretación de las mismas están mencionadas más adelante.

Los estratos granuloso y germinativo de la epidermis presentaron muy pocas células en forma de matraz en todos los casos analizados. A pesar de que se ha asociado a

estas células con el transporte iónico (VALENTE-TEIXEIRA, 2014), no se han encontrado referencias bibliográficas que hablen sobre las causas o los efectos de la ocurrencia de este hecho en el tegumento. Por su parte, escasas células de Merkel fueron vistas en los ejemplares de Uacha, mientras que lo contrario ocurrió en los de Santa Fe. Si bien la prevalencia de este último tipo de células se ha vinculado con un compromiso mayor del sistema tegumentario con la mecanorrecepción (VALENTE-TEIXEIRA, 2014), tampoco se han propuesto motivos o consecuencias de su abundancia. A su vez, en los anuros del bosque se ha visto una menor presencia de queratinocitos en comparación con los anuros del agroecosistema. Siendo estas células las que participan en el proceso de recambio del tegumento (GRAAFF, 2003), se podría deducir que los individuos de Santa Fe estarían presentando una menor tasa de desprendimiento de mudas de la piel, lo cual es una estrategia para deshacerse de capas afectadas (WANCZINSKI *et al.*, 2007). Podría resultar de interés analizar qué consecuencias tiene para los anfibios de Uacha una baja proporción de células mecanorreceptoras; si los agroquímicos predisponen al aumento de la tasa de recambio celular del tegumento; o si los anuros del bosque requieren una mayor capacidad percepción del ambiente por las características estructurales más complejas de su hábitat, en comparación a las del agroecosistema (VIGLIZZO *et al.*, 2005; ORDUNA *et al.*, 2013).

En la dermis esponjosa se han encontrado cromatóforos en la región MD de todos los especímenes, siendo estos una barrera de protección térmica que refleja la radiación solar, controlando la deshidratación y la temperatura de estos animales (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Fueron vistos escasos vasos sanguíneos en la región I de los anuros de Uacha, a diferencia de lo encontrado en los de Santa Fe. Una mayor irrigación sanguínea se ha relacionado con un alto compromiso de la región en la distribución del agua y absorción de iones (DUELLMAN & TRUEB, 1994; AZEVEDO *et al.*, 2005; WELLS, 2007; VALENTE-TEIXEIRA, 2014), y se ha descrito como un carácter frecuente en la región inguinal (LILLYWHITE *et al.*, 1997), por lo que se deduce que la presencia de agroquímicos podría haber provocado la reducción observada en el grupo de Córdoba. En este estrato no fue posible analizar la proporción de glándulas debido a que poseen una amplia variación y no sería preciso diferenciarlas en serosas y mucosas en base a su apariencia, sino que debe incluirse el análisis de la naturaleza química de la secreción que producen (REGUEIRA *et al.*, 2016).

En el estrato compacto de todos los anuros se encuentran fibras colágenas ascendentes, al igual que en otras especies (GREVEN *et al.*, 1995; SCHWINGER *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2005; 2006), a las cuales se les ha asignado un papel importante en la propiedad de tensión de la piel debido a que por su disposición, estarían ayudando a mantener la integridad estructural del tegumento (AZEVEDO *et al.*, 2006). También se ha sugerido que podrían ser vías de migración celular (DENEFFLE *et al.*, 1993) o conductos para que los vasos sanguíneos puedan alcanzar la capa esponjosa (GONÇALVES & DE BRITO-GITIRANA, 2008). Esto último se pudo observar en *P. biligonigerus* (Fig. 7).

La capa E-K fue hallada en todos los individuos, siendo más fácil de reconocer en los anuros del agroecosistema. Teniendo presente que los anfibios sucumben ante infecciones fúngicas o microbianas solo si su tegumento está dañado, la protección mecánica podría ser el rol de esta capa (ELKAN, 1968; TOLEDO & JARED, 1993; AZEVEDO *et al.*, 2005; WELLS, 2007; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; GARCÍA *et al.*, 2011; VALENTE-TEIXEIRA, 2014) en ambos grupos. Por su parte, los anuros de Córdoba podrían requerir un tegumento fortalecido por los minerales que la componen (ELKAN, 1968; AZEVEDO *et al.*, 2005; GARCÍA *et al.*, 2011; MANGIONE *et al.*, 2011) para evitar la entrada de agroquímicos, antibióticos y otros fármacos utilizados en las actividades agropecuarias de la zona (CAREZZANO & CABRERA, 2010b; BARDONE URQUIZA & COSTA CAREZZANO, 2013; CAREZZANO *et al.* 2013a; 2013b). Además, teniendo en cuenta que el tegumento de los anfibios es altamente permeable, aún en mayor medida que el de otros tetrápodos vertebrados (DUELLMAN & TRUEB, 1994; HAYES *et al.*, 2010; MANGIONE *et al.*, 2011; VITT & CALDWELL, 2014), podría estar cumpliendo la función de barrera (ELKAN, 1968; TOLEDO & JARED, 1993; AZEVEDO *et al.*, 2005; WELLS, 2007; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; GARCÍA *et al.*, 2011; VALENTE-TEIXEIRA, 2014) ante el ingreso de dichas sustancias. Cualquiera de las funciones mencionadas justificaría la presencia de una capa E-K con mayor opacidad y grosor en los anuros de esta localidad. El grupo del bosque se destacó por su menor espesor y rara presencia en la región I, lo cual puede ser analizado junto con la ocurrencia de una capa esponjosa de mayor dimensión y mayor irrigación, en comparación con los anfibios de Ucha. En primer lugar, se ha expresado que la capa E-K puede estar ausente cuando hay una dermis esponjosa que actúa como reservorio de agua (DE BRITO-GITIRANA, 2008; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; VALENTE-TEIXEIRA, 2014) -

evidenciado por la presencia de una gran cantidad de sustancia amorfa fundamental en este estrato (AZEVEDO *et al.*, 2006)-, y en segundo lugar, se cree que la presencia de la capa E-K disminuiría la capacidad de absorción y transporte de agua del tegumento (DUELLMAN & TRUEB, 1994). A partir de lo planteado, se infiere que al ser más ligera en los anuros del bosque, estaría permitiendo la ocurrencia de los procesos que mantienen el equilibrio hídrico manteniendo el beneficio del fortalecimiento del tegumento, mientras que el grupo del agroecosistema, sumado a lo antes mencionado, podría estar reduciendo la capacidad de transporte del agua en esta región corporal altamente expuesta al rose con el sustrato. Así mismo, la diferencia en cuanto a la irrigación sanguínea iría de la mano con la protección de tegumento ante la absorción de sustancias tóxicas. Al margen de estas deducciones, en función de la amplia variedad de conjeturas planteadas en torno a su presencia y las características de la capa E-K, y el hecho de que se desconoce su origen (GARCÍA *et al.*, 2011), parece acertada la propuesta de MANGIONE *et al.* (2011) de analizar los aspectos funcionales luego de considerar asuntos relacionados al inicio de su aparición y presencia en muchos taxones. Se la ha encontrado en otras especies dentro de la familia Leptodactylidae (MANGIONE & LAVILLA 2004; GARCÍA *et al.*, 2011), y también en otras familias como Bufonidae (PORTO, 1936; SCHWINGER *et al.*, 2001; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; FELSEMBURGH *et al.*, 2009; JARED *et al.*, 2009; REGUEIRA *et al.*, 2016), Hylidae (ELKAN, 1968; VALENTE-TEIXEIRA, 2014), Ranidae (ELKAN, 1968; KALTENBACH *et al.*, 2004), Ceratophryidae (MANGIONE *et al.*, 2011) y Odontophrynidae (ELKAN, 1968).

5.2 Análisis morfométrico

Los anfibios del agroecosistema presentaron un sistema tegumentario de mayor grosor en las tres regiones corporales, lo cual parece estar relacionado a la alta exposición a sustancias químicas, en base a la sensibilidad y alta permeabilidad (DUELLMAN & TRUEB, 1994; HAYES *et al.*, 2010; MANGIONE *et al.*, 2011; SIMON *et al.*, 2011; VITT & CALDWELL, 2014; SILVA RODRIGUES *et al.*, 2017) ya mencionadas, y al hecho de que mientras mayor distancia haya entre las sustancias del exterior y el torrente sanguíneo, menor es la probabilidad de que lleguen a éste (PRUNIERAS, 1994). Dentro de cada grupo, el tegumento de la región MD presentó mayor grosor que el de la región MV, en concordancia con lo

hallado en *Xenopus leavis* (GREVEN *et al.*, 1995), *Bufo marinus* (SCHWINGER *et al.*, 2001), *Rhinella jimi* (JARED *et al.*, 2009) y *R. ornata* (FELSEMBURGH *et al.*, 2009), para lo cual no se han propuestos causas.

En cuanto a las características de la epidermis, se observó que fue más fina en la región MD, y que presentó un estrato córneo constituido mayormente por células queratinizadas en todos los individuos. A la vez, en el grupo de Ucacha contó con un grosor mayor pero un estrato córneo más fino. Por su parte, la epidermis de la región MV fue la de mayor espesor en ambas localidades -para lo cual se ha sugerido un papel protector contra la fricción del abdomen con el sustrato (VALENTE-TEIXEIRA, 2014)-, y en este caso también fue más gruesa en los anuros de Córdoba, siendo su estrato córneo más grueso y con una mayor proporción de células vivas que en los de Santa Fe. En cuanto a la región I, si bien la epidermis presentó el mismo grosor en ambas localidades, el estrato córneo del grupo del agroecosistema fue más fino y estuvo constituido principalmente por células queratinizadas, mientras que en el grupo de Santa Fe se observaron más células vivas. Otra característica distintiva del sistema tegumentario del grupo de Ucacha fue su estrato granuloso de mayor grosor en las tres regiones corporales. Todos los atributos encontrados en los anfibios de Córdoba podrían deberse a las condiciones ambientales que enfrentan y a las características de su sistema tegumentario (DUELLMAN & TRUEB, 1994; PEYREFITTE *et al.*, 1998; HAYES *et al.*, 2010; MANGIONE *et al.*, 2011; VITT & CALDWELL, 2014; SILVA RODRIGUES *et al.*, 2017) ya que los agentes deformantes podrían haber provocado la reducción de la queratina, lo que a su vez podría haber gatillado el engrosamiento del estrato granuloso para seguir cumpliendo con el rol protector del órgano. Desde otra perspectiva, que puede no ser excluyente de la primera, la mayor tasa de desprendimiento de la piel evidenciada por la gran producción de queratinocitos (WOODHAMS *et al.*, 2007), podría ser la causa de haber encontrado un estrato córneo más fino o con una mayor presencia de células vivas.

La dermis fue más gruesa en la región MD de todos los individuos. Al igual que los estratos anteriores, tanto el estrato esponjoso como el compacto presentaron mayor grosor en el grupo de Ucacha. Siendo que el estrato esponjoso ha sido vinculado con la función de reservorio de agua, esta región corporal podría haber modificado sus propiedades fisiológicas (GREVEN *et al.*, 1995; AZEVEDO *et al.*, 2006) para participar más activamente

en los procesos de regulación hídrica en los anuros de Córdoba, teniendo en cuenta que ha sido más fino en las regiones MV e I, más expuestas al contacto con los cuerpos de agua y el sustrato. El estrato compacto parece estar comprometido con el soporte y la resistencia ante la tensión (AZEVEDO *et al.*, 2006), por lo cual los anuros del agroecosistema parecen estar requiriendo una mayor protección ante el daño mecánico que se sumaría a la función protectora de la capa E-K.

A partir de este análisis se concluye que las diferencias halladas pueden estar determinadas por el grado de perturbación ambiental. Aun así, la presencia de agroquímicos no es el único factor capaz de producir modificaciones en el tegumento de los anuros (SPARLING *et al.*, 2010; HAMMOND *et al.*, 2012). Como se ha mencionado, entran en juego características estructurales del microhábitat y la fisiología de cada región corporal (DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2009), siendo este último aspecto poco comprendido aún (OLEA *et al.*, 2019), lo cual impide arribar a conclusiones más sólidas. Otro factor que no fue tenido en cuenta, y que también promueve la diferenciación entre grupos, es el distanciamiento geográfico entre las poblaciones (SILVA RODRIGUES *et al.*, 2017). Resulta importante tener en cuenta que se ha propuesto a *P. biligonigerus* como un complejo de más de una especie (SCHALK, 2012) y que en este trabajo se han encontrado diferencias -en cuanto al grosor del tegumento y la proporción de vasos sanguíneos-, considerados parámetro para diferenciar especies (FELSEMBURGH *et al.*, 2009; VALENTE-TEIXEIRA, 2014). Finalmente, se ha planteado que el estudio del impacto de los químicos desde una perspectiva evolutiva es el que permitiría dilucidar el verdadero efecto de estas sustancias en los anfibios (COTHRAN *et al.*, 2013), lo cual no fue posible llevar a cabo debido a la ausencia de trabajos previos que describan las características del tegumento de *P. biligonigerus* muestreados en las áreas escogidas y en diferentes estadios de su ciclo vital.

6. CONCLUSIONES

El tegumento de *P. biligonigerus* presenta la estructura básica descrita para el subphylum Vertebrata constituida por dos capas, la epidermis y la dermis, junto con sus respectivos estratos, los cuales presentan características específicas del orden Anura. En cuanto a la epidermis de ambos grupos se pueden mencionar las siguientes características halladas en las tres regiones corporales: en el estrato córneo fueron vistas células anucleadas o con núcleos picnóticos, en el estrato granuloso un número variable de capas de queratinocitos junto con escasas células en forma de matraz, y en el estrato germinativo se observaron células apoyadas sobre la lámina basal, entre las cuales hubo muy pocas células en forma de matraz. En cuanto a la dermis, el estrato esponjoso presentó tejido conectivo laxo con fibras elásticas y colágenas distribuidas de manera laxa, glándulas exocrinas multicelulares de tipo mucosa y serosa, y vasos sanguíneos; mientras que en el estrato compacto se encontró tejido conectivo denso con fibras colágenas dispuestas en paquetes paralelos a la superficie corporal, separados por paquetes de fibras colágenas verticales, cuya extensión fue desde la base de este estrato hasta el esponjoso. La capa E-K fue otro atributo presente en todas regiones corporales analizadas, siendo una sola capa dispuesta entre los estratos dérmicos de forma discontinua y sin células asociadas.

En cuanto a las diferencias histomorfológicas, el estrato córneo de las tres regiones corporales de los especímenes de Uchacha exhibió una capa de células planas anucleadas, mayormente en las regiones MD e I, mientras que en el grupo de Santa Fe solo se las observó en las regiones MD y MV, siendo predominante en ambas. Células un poco más altas y con núcleos picnóticos fueron vistas en las tres regiones corporales de los individuos del agroecosistema, sobre todo en la región MV, mientras que en el otro grupo fueron halladas en las regiones MV e I, sobre todo en esta última región, formando una capa doble en ciertos sectores. En el estrato granuloso de los individuos del agroecosistema, las capas de queratinocitos variaron de 1 a 4 en la región MD, de 1 a 6 en la MV y de 1 a 3 en la I, mientras que en el grupo del bosque ripario se hallaron de 1 a 2 capas en la región MD, de 1 a 4 en la MV y de 1 a 3 en la I. En este último estrato, las células de Merkel se encontraron en menor cantidad en los anuros de Córdoba. Por su parte, el estrato germinativo contó con más células de Merkel en el grupo de Santa fe, más que nada en las regiones MD y MV. En el estrato esponjoso de la región MD de todos los

anfibios se observaron cromatóforos, y solo en la región I de los especímenes de Santa fe, abundantes vasos sanguíneos. La capa E-K fue más notoria en el grupo del agroecosistema por su mayor opacidad y grosor, y su vez, dentro del grupo del bosque tuvo menor espesor y fue escasamente vista en la región I.

A partir del análisis morfométrico se halló que el tegumento de los anfibios del agroecosistema presentaba mayor grosor en todas las regiones corporales. A su vez, en este mismo grupo, la región MD presentó un grosor superior, seguida por la MV y finalmente la I. La región MD de los anuros del otro grupo también contó con un sistema tegumentario de mayor espesor, seguida por la región I y finalmente la MV. Para todos los casos, la epidermis fue más fina que la dermis, y además esta primera capa presentó mayor grosor en la región MV, seguida por la región I y finalmente la MD, mientras que la dermis fue más gruesa en la región MD, seguida I y luego la MV. Finalmente, los estratos presentaron mayor altura en los especímenes de Ucacha, excepto por el córneo de la región MD, el esponjoso de la MV, y tanto el córneo como el esponjoso de la región I de los anuros de Santa Fe.

Las variaciones halladas pueden deberse a una multiplicidad de factores, entre ellos el diferente grado de perturbación antrópica de las localidades estudiadas, teniendo en cuenta la intensa actividad agropecuaria que se lleva a cabo en los humedales del sur de Córdoba, para la cual se utilizan, entre otros químicos, fármacos, antibióticos y agroquímicos, siendo estos últimos aplicados entre los meses de octubre y marzo, coincidente con la época de mayor actividad biológica de los anfibios. Las características estructurales del microhábitat, la fisiología poco comprendida de cada región corporal y el distanciamiento geográfico entre las poblaciones, son otros posibles inductores de las diferencias mencionadas. También resulta interesante mencionar que se han encontrado diferencias en parámetros considerados especie-específicos como es el grosor del tegumento y la proporción de vasos sanguíneos, junto con el hecho de que ha propuesto a *P. biligonigerus* como un complejo de especies.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMAR, L.; BUSTAMANTE, A.; MOLINA, C.; GIOVANOLA, C. & MENGHI, M. 2010. Relación entre la limnología de lagunas pampeanas (SE Córdoba) y la cobertura y uso del suelo. **RASADEP: Revista de la Asociación Argentina de Ecología de Paisajes 1** - Número Especial: Cambios de uso de la tierra. Causas, consecuencias y mitigación. Pp. 3-14.
- ALMEIDA, P. G.; FELSEMBURGH, F. A.; AZEVEDO, R. A. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2007. Morphological re-evaluation of the parotoid glands of *Bufo ictericus* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Contributions to Zoology** **76**(3): 145-152.
- AZEVEDO, R.; PELLI, A.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SANTANA, A.; FELSEMBURGH, F. A. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2005. Structural aspects of the Eberth-Katschenko layer of *Bufo ictericus* integument: histochemical characterization and biochemical analysis of cutaneous calcium (Amphibia: Bufonidae). **Micron** **36**: 61-65.
- AZEVEDO, R.; SANTANA, A. S. J. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2006. Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. **Micron** **37**: 223-228.
- BARDONE URQUIZA, S. P. & COSTA CAREZZANO, J. F. 2013. Anfibios de agroecosistemas de la pampa del centro de Argentina. **Biocenosis** **27**:1-2.
- BRIZZI, R.; DELFINO, G. & PELLEGRINI, R. 2002. Specialized mucous glands and their possible adaptive role in the males of some species of *Rana* (Amphibia, Anura). **Journal of Morphology** **254**: 328-341.
- CAREZZANO, F. & CABRERA, M. 2010a. Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax nasicus* (Cope, 1862): Distribution extensión. **Check List** **6**(3): 390-391.
- CAREZZANO, F. J. & CABRERA, M. 2010b. Morfohistología del testículo de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leiuperidae) en un ecosistema agrícola. **Boletín de la Asociación Herpetológica Española** **21**: 39-42.
- CAREZZANO, F. J. & CABRERA, M. 2011. Variación en la fórmula dentaria larval de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leptodactylidae) de humedales en agroecosistemas del sur de Córdoba, Argentina. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay** **20**:28-33.

- CAREZZANO, F.J.; LUDUEÑA, F. A.; DORFLINGER, K. & URQUIZA, S. P. 2014. Ampliación de la distribución de *Elachistocleis bicolor* (Anura: Microhylidae) en Córdoba, Argentina. **The Biologist (Lima)** **12**(2): 395-398.
- CAREZZANO, F. J.; URQUIZA, S.; DORFLINGER, K. & ALONSO, M. 2013a. Morfohistología testicular de *Odontophrynus americanus* (Duméril and Bribón, 1841) (Anura, Odontophrynidae) de Argentina. **The Biologist (Lima)** **11**(1): 119-129.
- CAREZZANO, F. J.; URQUIZA, S.; DORFLINGER, K. & ALONSO, M. 2013b. Morfohistología testicular de *Ceratophrysornata* (Bell) (Amphibia, Anura, Ceratophryidae). **Iheringia, Série Zoologia** **103**(2): 90-194.
- CEI, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. **Italian Journal of Zoology** **2**. Pp. 389-394.
- COTHRAN, R. D.; BROWN, J. M. & RELYEA, R. A. 2013. Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. **Evolutionary Applications** **6**: 832-841.
- DE BRITO-GITIRANA, L. & AZEVEDO, R. A. 2005. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). **Micron** **36**: 532-538.
- DELFINO, G.; BRIZZI, R.; ALVAREZ, B. B. & GENTILI, M. 1999. Granular cutaneous glands in the frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): comparison between ordinary serous and 'inguinal' glands. **Tissue and Cell** **31**(6): 576-586.
- DELFINO, G.; BRIZZI, R.; KRACKE-BERNDORFF, R., & ALVAREZ, B. 1998. Serous gland dimorphism in the skin of *Melanophryniscus stelzneri* (Anura: Bufonidae). **Journal of Morphology** **237**(1): 19-32.
- DELFINO, G.; NOSI, D.; BRIZZI, R. & ALVAREZ, B. B. 2002. Serous cutaneous glands in the paludicoline frog *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae): patterns of cytodifferentiation and secretory activity in premetamorphic specimens. **Acta Zoologica** **82**(2): 149-158.
- DENEFFLE, J. P.; ZHU, Q. L. & LECHAIRE, J. P. 1993. Localization of fibronectin in the frog skin. **Tissue and Cell** **25**(1): 87-102.
- DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. & ROBLEDO, C. W. 2014. InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- DI TADA, I. E.; ZAVATTIERI, M. V.; BRIDAROLLI, M. E.; SALAS, N.E. & MARTINO, A.L. 1996. Anfibios anuros de la provincia de Córdoba. **Biodiversidad de la Provincia de Córdoba. Fauna 1**: 191-213.
- DUELLMAN, W. R. & TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibians**. London and Baltimore, The Johns Hopkins University Press. p. 367-379.
- ELIAS, H. & SHAPIRO, J. 1957. Histology of the skin of some toads and frogs. **American Museum Novitates 1819**: 1-27.
- ELKAN, E. 1968. Mucopolysaccharides in anurans defense against desiccation. **Journal of Zoology 155**: 19-53.
- ELKAN, E. 1976. Ground substance: an anuran defense against desiccation. **Physiology of the Amphibia 3**: 101-111.
- FELSEMBURGH, F. A.; ALMEIDA, P. G.; CARVALHO-E-SILVA, S. P. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2009. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornate*. **Micron 40**: 198-205.
- FELSEMBURGH, F. A.; CARVALHO-E-SILVA, S. P. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2007. Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Micron 38(5)**: 439-445.
- FELSEMBURGH, F. A. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2008. Avaliação morfológica do tegumento de fêmeas de *Proceratophrys boiei*. **Espaço e Geografia 11(1)**: 59-72.
- FROST, D. R. 2020. Amphibian Species of the World: An Online Reference. V 6.0. **American Museum of Natural History**, New York, USA. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- GARCÍA, F. G.; CRUZ, P. I. & MANGIONE, S. 2011. Caracterización histomorfológica del tegumento de especies de *Leptodactylus* del grupo *fuscus* (Anura. Leptodactylidae), destacando la capa Eberth-Katschenko. **Acta Zoológica Lilloana 55 (1)**: 33-43.
- GREVEN, H.; ZANGER, K. & SCHWINGER, G. 1995. Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). **Journal of Morphology 166**: 325-335.
- GONÇALVES, V. F. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2008. Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **Micron 39**: 32-39.

- GRUBE, A.; DONALDSON, D. & KIELY, T. 2011. **Pesticides Industry Sales and Usage 2006 and 2007 Market Estimates**. Biological and Economic Analysis Division Office of Pesticide Programs Office of Chemical Safety and Pollution Prevention U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; JORDÃO, A. E.; SILVA, J. R. M.; GREVEN, H. & RODRIGUES, M.T. 2009. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defense. **Toxicon** **54**(3): 197-207.
- HAMMOND, J. I.; JONES, D. K.; STEPHENS, P. R. & RELYEA, R. A. 2012. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. **Evolutionary Applications** **5**: 593-606.
- HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S. & STICE, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **The Journal of Experimental Biology** **213**: 921-933.
- KALTENBACH, J. C.; FASZEWSKI, E. E.; NYTCH, K. E.; POTTER, C. H.; SHANTHAKUMAR, N. & FAKIN, A. 2004. Glycoconjugate localization in larval and adult skin of the Bullfrog, *Rana catesbeiana*: a lectin histochemical study. **Journal of Morphology** **261**: 184-195.
- KATCHBURIAN, E.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C.; FARIA, F. P.; SOUZA SANTOS, H. & FREYMÜLLER, E. 2001. Mineralized Dermal Layer of the Brazilian treefrog *Corythomantis greeningi*. **Journal of Morphology** **248**: 56-63.
- KRUSKAL, W. & WALLIS, A. W. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American Statistical Association** **47**(260): 583-621.
- LAJMANOVICH, R. C. 1991. Batracofauna del valle de inundación del Paraná. **Revista de Ciencias Naturales del Litoral** **22**(2): 69-78.
- LENZI-MATTOS, R.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; TAMBOURGI, D. V.; RODRIGUES, M. T., & JARED, C. 2005. The inguinal macroglands of the frog *Physalaemus nattereri* (Leptodactylidae): structure, toxic secretion, and relationship with deimatic behaviour. **Journal of Zoology** **266**(4): 385-394.
- LEVENE, H. 1960. Robust tests for equality of variances. *En*: OLKIN, I.; GHURYE, S. G.; Hoeffding, W.; MADOW, W. G. & MANN, H. B. (Eds.). **Contributions to**

- Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling.** Stanford University Press. p. 278-292.
- LILLYWHITE, H. B.; MITTAL, A. K.; GARH, T. K. & AGRAWAL, N. 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. **Journal of Zoology, London** **243**: 675-687.
- LIPS, K.; REASER, J. K. & YOUNG, B. E. 1999. **El monitoreo de Anfibios en América Latina. Un manual para coordinar esfuerzos.** The Nature Conservancy. 42 p.
- MANGIONE, S.; GARCÍA, G. & CARDOZO, O. M. 2011. The Eberth–Katschenko layer in three species of ceratophryine anurans (Anura: Ceratophryidae). **Acta Zoologica (Stockholm)** **92**(1): 21-26.
- MANGIONE, S. & LAVILLA, E. O. 2004. Histología del tegumento de la región lumbar de las especies sin glándula lumbar del género *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae). **Acta Zoologica Lilloana** **48**: 37-56.
- OLEA, B. G.; CHEJ, O. E.; CURI, M. L.; BOCCIONI-CUZZIOL, A. P.; CÉSPEDez, A. J. & LOMBARDO, M. D. 2019. Histological and immunohistochemical characterization of the integument and parotoids glands *Rhinella bergi* (Anura: Bufonidae): Development and differentiation. **Acta Histochemical** **121**: 277-283.
- ORDUNA, L. A.; BERNAD, L.; BERNARDOS, J.; BONINO, N.; BRODEUR, J.; CALAMARI, N.; CANAVELLI, S.; DAMONTE, J.; DARDANELLI, S.; DECARRE, J.; DEMARÍA, M.; GAVIER, G.; GOIJMAN, A.; MACEIRA, N.; POLISERPI, B.; SOLARI, L.; STAMATTI, G.; SUÁREZ, R.; VON THUNGEN, J. 2013. **Manejo de biodiversidad en agroecosistemas.** INTA. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina. 204p.
- PELTZER, P. M.; ATTADAMO, A. M.; LAJMANOVICH, R. C.; JUNGES, C. M.; BELTZER, A. H. & SÁNCHEZ, L. C. 2010. Trophic dynamics of three sympatric anuran species in a soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. **Herpetological Journal** **20**: 261-269.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C. & CHIVOT, M. 1998. **Cosmetologia biologia general: biologia da pele.** Organização Andrei. São Paulo. 507p.
- PORTO, J. 1936. Contribución al estudio de la histofisiología del tegumento de los batracios. **La Prensa Médica Argentina** **34**: 5-53.

- PRATES, I.; ANTONIAZZI, M. M.; SCIANI, J. M.; PIMENTA, D. C.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B. & JARED, C. 2012. Skin glands, poison and mimicry in dendrobatid and leptodactylid amphibians. **Journal of Morphology** **273**(3): 279-290.
- PRUNIERAS, M. 1994. **Manual de Cosmetologia**. Organização Andrei. São Paulo.400p.
- QUAY, W. B. 1972. Integument and the environment: Glandular composition, function, and evolution. **American Zoologist** **12**: 5-18.
- RAMÍREZ, O. J. 2006. Reflexiones sobre el monocultivo de soya transgénica en Argentina: una aproximación desde la geografía del azar tecnológico. **Gestión y Ambiente** **9**(3): 81-90.
- REGUEIRA, E.; DÁVIDA, C. & HERMINDA, G.N. 2016. Morphological changes in skin glands during development in *Rhinella Arenarum* (Anura: Bufonidae). **The Anatomical Record** **299**(1): 141-156.
- ROHR, J. R. & PALMER, B. D. 2005. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. **Environmental Toxicology and Chemistry** **24**(5): 1253-1258.
- SCHALK, C. M. 2012. *Physalaemus biligonigerus* predation. **Herpetological Review** **43**: 124.
- SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I. & FRISE, E.2012.Fiji an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods** **9**(7): 676-682.
- SCHWINGER, G.; ZANGER, K. & GREVEN, H. 2001. Aspectos estructurales y mecánicos del tegumento de *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). **Tissue Cell** **33**(5): 541-547.
- SHAPIRO, S. S. & WILK, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika** **52**(3-4): 591-611.
- SILVA RODRIGUES, S. M.; EWBANK, A. C.; STREFEZZI, R. DE F.; ALVARADO, G.; SACRISTÁN, C.; DE PAULA, C. D. & CATÃO-DIAS, J. L.2017. Comparative leukocyte morphometric analysis between endemic anurans from Brazil and the invasive species *Lithobates catesbeianus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** **54**(2): 159-167.
- SIMON, E.; PUKY, M.; BRAUN, M. & TÓTH PÉREZ, B.2011. **Frogs and toads as biological indicators 192 in environmental assessment**. En: MURRAY, J. L. (ed.), **Frogs: Biology, Ecology and Uses**, Nueva York: Nova Science Publishers Inc. Pp.141-150.

- SPARLING, D. W.; LINDER, G.; BISHOP, C. A.; KREST, S. K. 2010. **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. SETAC Press. Pensacola. Pp. 168-191.
- STEBBINS, R. C. & COHEN N. W. 1995. **A Natural History of Amphibians**. Princeton University Press, New Jersey. 336 p.
- TOLEDO, R. C & JARED, C. 1993. The calcified dermal layer in anurans. Mini review- **Comparative Biochemistry and Physiology 104A**: 443-448.
- TOLEDO, R. C. & JARED, C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology 111A**: 1-29.
- VAIRA, M.; AKMENTINS, M. S.; ATTADAMO, M.; BALDO, D.; BARRASSO, D.; BARRIONUEVO, S.; BASSO, N.; BLOTTO, B.; CAIRO, S.; CAJADE, R.; CÉSPEDez, J.; CORBALÁN, V.; CHILOTE, P.; DURÉ, M.; FALCIONE, C.; FERRARO, D.; GUTIÉRREZ, F. R.; INGARAMO, M.; JUNGES, C.; LAJMANOVICH, R.; LESCANO, J. N.; MARANGONI, F.; MARTINAZZO, L.; MARTI, R.; MORENO, L.; NATALE, G. S.; PÉREZ IGLESIAS, J. M.; PELTZER, P.; QUIROGA, L.; ROSSET, S.; SANABRIA, E.; SANCHEZ, L.; SCHAEFER, E.; ÚBEDA, C. & ZARACHO, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. **Cuadernos de Herpetología 26**: 131-159.
- VIGLIZZO, E. F.; FRANK, F. C. & CARREÑO L. 2005. **La situación ambiental Argentina**. Fundación Vida Silvestre Argentina. Pp. 263-278.
- VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. 2014. **Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, London. Pp. 48-54.
- VALENTE-TEIXEIRA S. M. A. 2014. **Morfologia do tegumento de anfíbios anuros da mata atlântica e sua aplicação em estudos comportamentais**. Tesis de Magíster (iné dita). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil. 112 p.
- VAN DER GRAAFF, K. M. 2003. **Anatomía humana**. Brasil. 866 p.
- WANCZINSKI, B. J.; ROCHA BARROS, C. A. D. & FERRACIOLI, D. L. 2007. Hidratação do tegumento cutâneo. **Revista Uningá 12(1)**: 171-183.
- WELLS, K. D. 2007. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. Chicago y London, The University of Chicago Press. 1162 p.
- WOODHAMS, D. C.; ARDIPRADJA, K.; ALFORD, R. A.; MARANTELLI, G.; REINERT, L. K. & ROLLINS-SMITH, L. A. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among

amphibian species and is correlated with skin peptide defense. **Animal Conservation 10(4): 409-417.**

Tabla 1. Valores medios (μm) y sus respectivos desvíos estándar, de cada estrato de cada región corporal del tegumento de *P. biligonigerus*, en el agroecosistema y el bosque. MD, medio dorsal; MV, medio ventral; I, inguinal.

Región corporal	Estrato	Tipo de ambiente	
		Agroecosistema N=5	Bosque N=5
MD	Córneo	1,93 \pm 0,87	2,68 \pm 1,65
	Granuloso	15,14 \pm 7,18	10,26 \pm 6,48
	Germinativo	2,15 \pm 0,83	1,76 \pm 0,58
	Epidermis	19,22 \pm 7,47	14,52 \pm 6,30
	Esponjoso	30,45 \pm 10,23	29,16 \pm 15,64
	Compacto	48,55 \pm 10,25	30,32 \pm 8,80
	Dermis	79,00 \pm 16,31	59,48 \pm 18,52
	Total	98,22 \pm 19,14	73,99 \pm 21,81
MV	Córneo	4,3 \pm 2,00	3,71 \pm 1,60
	Granuloso	23,68 \pm 8,19	17,23 \pm 9,13
	Germinativo	2,23 \pm 0,69	1,50 \pm 0,43
	Epidermis	30,21 \pm 8,72	22,45 \pm 9,59
	Esponjoso	18,18 \pm 7,15	21,65 \pm 10,64
	Compacto	36,99 \pm 8,72	21,78 \pm 7,31
	Dermis	55,17 \pm 12,35	43,43 \pm 12,19
	Total	85,38 \pm 15,91	65,88 \pm 18,50
I	Córneo	2,69 \pm 1,41	5,59 \pm 5,71
	Granuloso	16,13 \pm 6,92	16,34 \pm 14,93
	Germinativo	2,12 \pm 0,77	1,91 \pm 0,52
	Epidermis	20,94 \pm 7,40	23,82 \pm 17,01
	Esponjoso	18,11 \pm 8,02	25,20 \pm 16,65
	Compacto	40,71 \pm 15,41	24,56 \pm 8,73
	Dermis	58,86 \pm 18,80	49,76 \pm 18,74
	Total	79,80 \pm 21,03	72,33 \pm 26,29

Tabla 2. Valores χ^2 y sus respectivos valores P, obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis, para cada uno de los estratos de cada región corporal del tegumento de *P. biligonigerus*. MD, medio dorsal; MV, medio ventral; I, inguinal.

Región corporal	Estrato	Chi ²	Valor P
MD	Córneo	84,48	<0,01*
	Granuloso	184,00	<0,01*
	Germinativo	69,83	<0,01*
	Epidermis	145,28	<0,01*
	Esponjoso	13,48	<0,01*
	Compacto	504,69	<0,01*
	Dermis	288,64	<0,01*
	Total	318,55	<0,01*
MV	Córneo	12,87	<0,01*
	Granuloso	101,20	<0,01*
	Germinativo	235,60	<0,01*
	Epidermis	117,01	<0,01*
	Esponjoso	15,60	<0,01*
	Compacto	382,86	<0,01*
	Dermis	142,78	<0,01*
	Total	182,24	<0,01*
I	Córneo	399,08	<0,01*
	Granuloso	22,78	<0,01*
	Germinativo	12,09	<0,01*
	Epidermis	0,71	0,4
	Esponjoso	34,86	<0,01*
	Compacto	422,96	<0,01*
	Dermis	85,05	<0,01*
	Total	57,19	<0,01*

*diferencia estadísticamente significativa.

Fig.1: Individuos adultos de *P. biligonigerus*. Foto: Fernando Carezzano.



Fig.2: Sitios de muestreo de *P. biligonigerus*. A- Agroecosistema con alta perturbación antrópica, B- Bosque ripario con baja perturbación antrópica. Imágenes obtenidas de Google Earth.

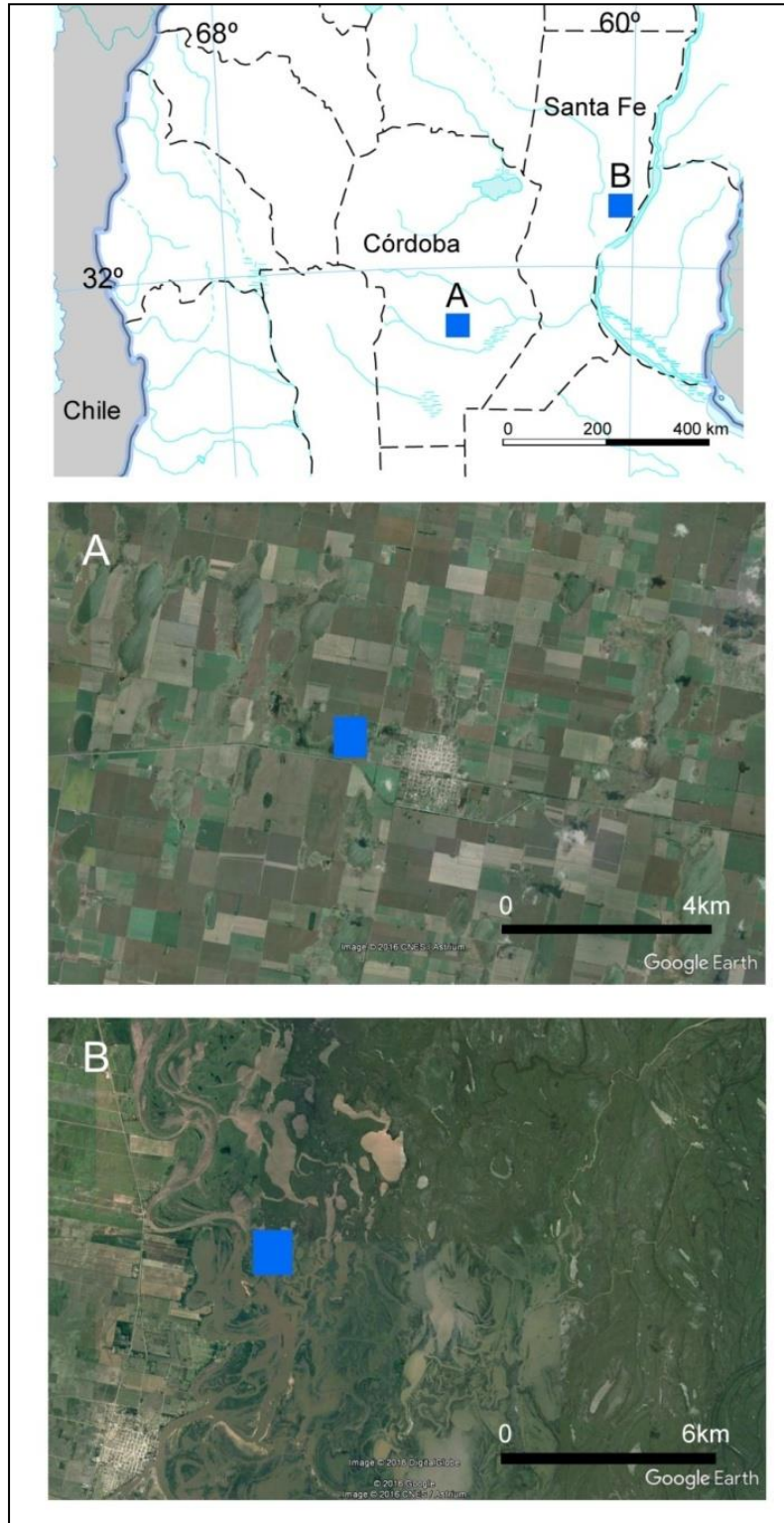


Fig.3: Tegumento de la región medio dorsal de *P. biligonigerus*. Agroecosistema. 1-estrato córneo, 2-estrato granuloso, 3-estrato germinativo, 4-glándula serosa, 5-glándula mucosa, 6-cromatóforos, * capa E-K, TCA-tejido conectivo ascendente (10x HE).

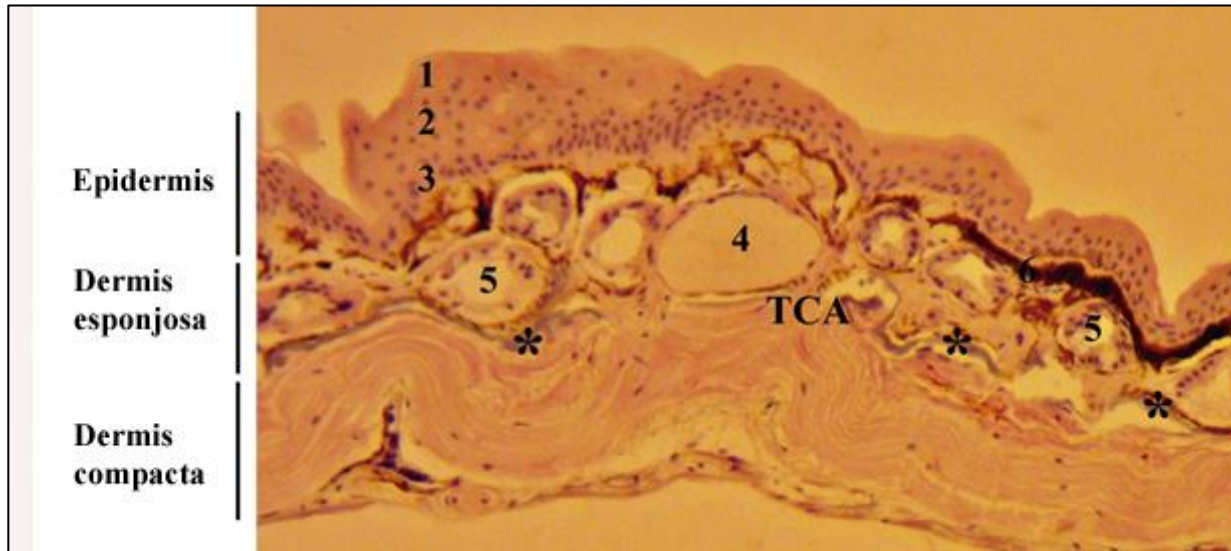


Fig.4: Tegumento de la región medio dorsal de *P. biligonigerus*. Bosque ripario. 1-estrato córneo, 2-estrato granuloso, 3-estrato germinativo, 4-glándula serosa, 5-glándula mucosa, 6-cromatóforos,* capa E-K, TCA-tejido conectivo ascendente, →célula de Merkel, ► célula en forma de matraz (40x HE).



Fig.5: Tegumento de la región medio ventral de *P. biligonigerus*. Bosque ripario. 1-estrato córneo, 2-estrato granuloso, 3-estrato germinativo, 4-glándula serosa, 5-glándula mucosa, → célula de Merkel (x40 tricrómico de Casson).

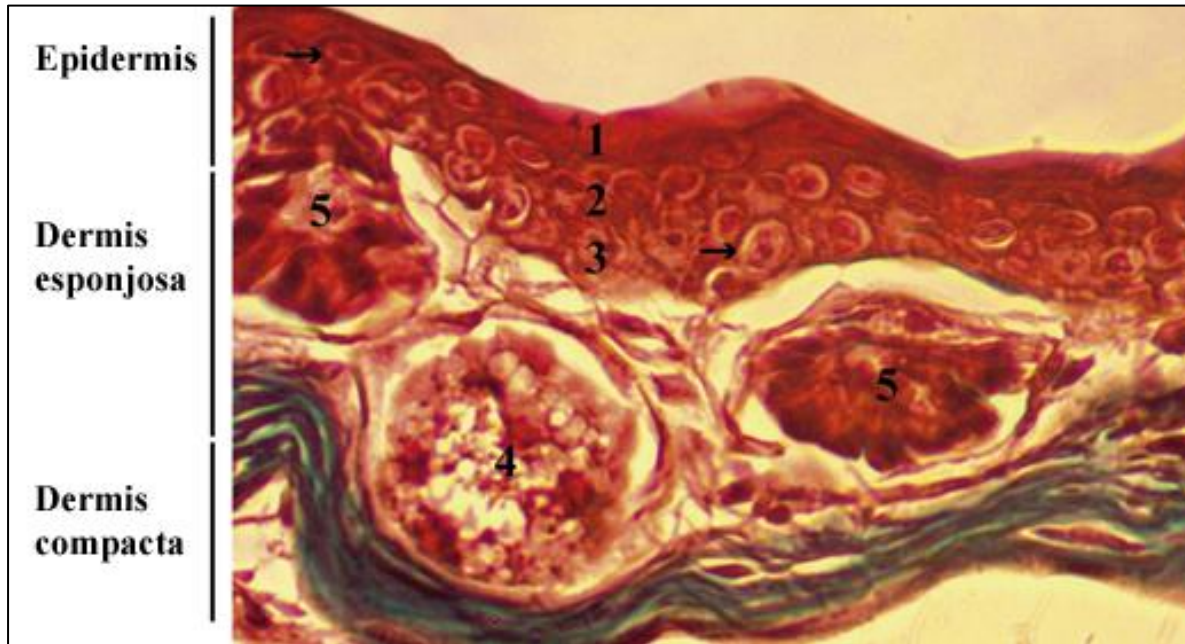


Fig.6: Tegumento de la región medio ventral de *P. biligonigerus*. Bosque ripario. 1-estrato córneo, 2-estrato granuloso, 3-estrato germinativo, 4-Glándula serosa, 5-glándula mucosa, →célula de Merkel, ► célula en forma de matraz (x40 azul de Toluidina).

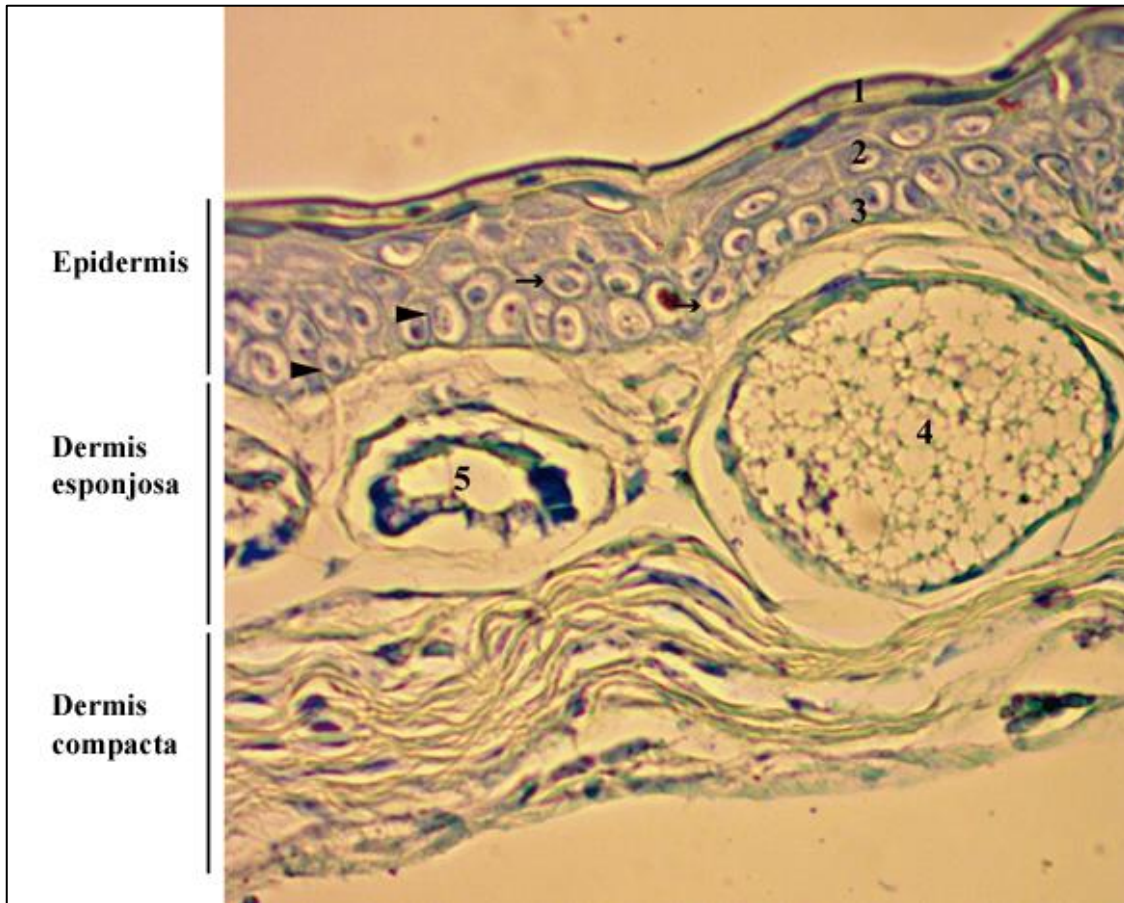


Fig.7: Tegumento de la región inguinal de *P. biligonigerus*. Agroecosistema. 1-estrato córneo, 2-estrato granuloso, 3-estrato germinativo, TCA-tejido conectivo ascendente, VS-vaso sanguíneo, +VS-vaso sanguíneo atravesando el tejido conectivo ascendente, → célula de Merkel (10x HE).

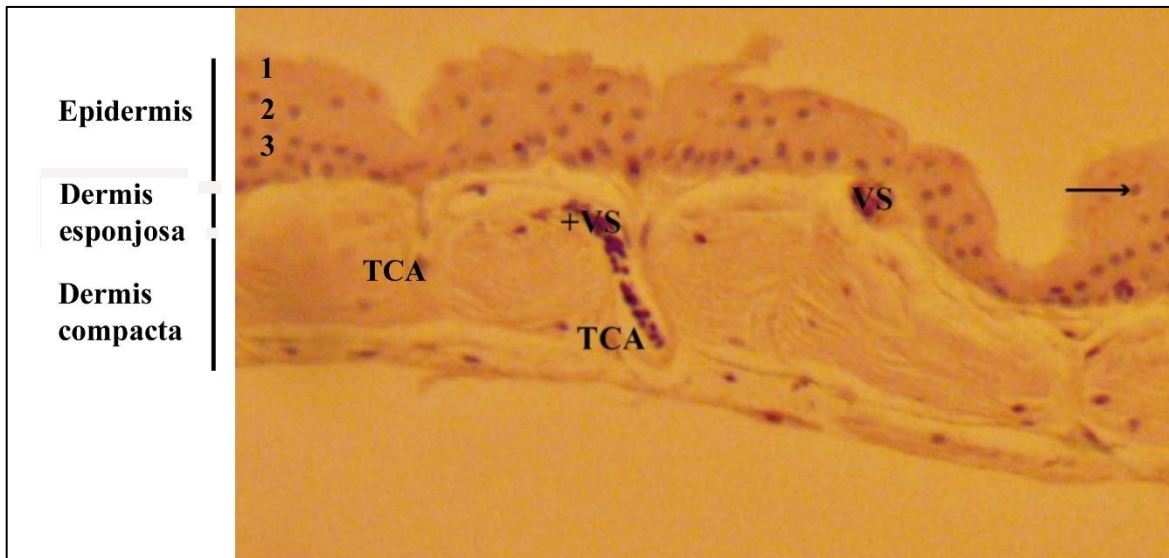


Fig.8: Tegumento de la región inguinal de *P. biligonigerus*. Bosque ripario. 1-estrato córneo, 2-estrato granuloso, 3-estrato germinativo, 4-glándula serosa, 5-glándula mucosa, → célula de Merkel, VS-vaso sanguíneo (10x HE).

