

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Características morfohistológicas y cuantitativas del tegumento de *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Odontophrynidae). Análisis comparado en dos ambientes con diferentes niveles de perturbación**

Tesinista: Andrea Kambic

Director: Biól. Fernando Carezzano

Codirector: Dra. Mirian Bulfon

Cátedras de Anatomía Comparada y Morfología Animal

Departamento de Diversidad Biológica y Ecología

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Universidad Nacional de Córdoba

Vélez Sarsfield 299, 5000 Córdoba, Argentina

2016

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 Zoobotânica do Rio Grande do Sul”.

**Características morfohistológicas y cuantitativas del tegumento de *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Odontophrynidae). Análisis comparado en dos ambientes con diferentes niveles de perturbación.**

**Tribunal examinador:**

**Nombre y Apellido:.....Firma:.....**

**Nombre y Apellido:.....Firma:.....**

**Nombre y Apellido:.....Firma:.....**

**Calificación: .....**

**Fecha: .....**

## **Agradecimientos**

A mis padres, por haberme apoyado y haber confiado en mí, que sin su apoyo incondicional no hubiese conseguido mi meta.

A mi hija Ana y mis sobrinos, que son mi razón de ser.

A mi hermana, hermano y cuñada, ejemplos de personas, por la paciencia y el amor incondicional que me dieron a lo largo de mi vida.

A mis amigas, en particular a Mariel y Marisa, por su apoyo incondicional.

A David Elías por su asesoramiento en la interpretación de los resultados de los diseños experimentales.

A la Dra Paola Peltzer y el Dr Andres M. Attademo del Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por facilitarme material de estudio y su asesoramiento.

A la profesora Lycia de Brito Gitirana, del Laboratorio de Histología Animal y Comparada del Departamento de Histología y Embriología de la Universidad Federal de Río de Janeiro, por su colaboración desinteresada.

A las Dra Susana Mangione del Instituto de Morfología Animal de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina y a la Dra. Gladys F. García, de la Cátedra de Anatomía Comparada, de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Salta, por sus aportes desinteresados y colaboración.

Al técnico Leandro Oliveros del laboratorio de histotecnología del Área de Biología Odontológica (ABO) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, por la paciencia y el apoyo en la realización de mi tesina.

A la Dra Mirian Bulfon de la cátedra de Anatomía Comparada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, de la Universidad Nacional de Córdoba, que me apoyó en la realización de mi tesina y que siempre dispuso de su tiempo para brindarme su ayuda.

Al Biólogo Fernando Carezzano por haberme orientado, apoyado y acompañado con su solvencia profesional y calidad personal en cada una de las etapas de mi tesina.

**Características morfohistológicas y cuantitativas del tegumento de *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Odontophrynidae). Análisis comparado en dos ambientes con diferentes niveles de perturbación.**

**RESUMEN**

Se analizó el tegumento de individuos adultos de *Odontophrynus americanus*, provenientes de dos ambientes con diferentes niveles de perturbación antrópica con el fin de evaluar la presencia de variaciones morfohistológicas. Se utilizaron diez individuos adultos agrupados en dos lotes, uno proveniente de un agroecosistema del sur de la Provincia de Córdoba, caracterizado por presentar alta perturbación antrópica y el otro de un bosque fluvial de la Provincia de Santa Fe en donde no existen fuentes notables de contaminación. De cada ejemplar se tomaron muestras del tegumento de las regiones medio dorsal, medio ventral e inguinal. Las mismas se procesaron según técnicas histológicas de rutina para luego realizar cortes seriados de 5 µm de espesor los que se colorearon, a los fines de determinar la morfohistología, con hematoxilina-eosina, Tricómico de Casson y técnica de Von Kossa. Para conocer la naturaleza de las secreciones glandulares se utilizaron las siguientes técnicas histoquímicas: Periodic Acid Schiff, Alcian Blue pH 2,5 y azul de toluidina. En base a los resultados se concluye que el sistema tegumentario de *Odontophrynus americanus* sigue el diseño básico descrito para anuros. En ningún ejemplar se observó la capa Eberth-Katschenko. Los individuos procedentes del agroecosistema presentan un mayor espesor tegumentario en la región inguinal, seguido por la región medio ventral y finalmente la medio dorsal. En los ejemplares del bosque fluvial se observó la situación inversa. Los tipos glandulares que se identifican en todos los ejemplares analizados son las glándulas mucosas y serosas, siendo las primeras más numerosas en todas las regiones corporales analizadas. Solo se observaron diferencias significativas en relación a la histomorfometría entre los ejemplares procedentes del agroecosistema y del bosque fluvial en la mayoría de las regiones corporales y entre los estratos de las mismas. Los resultados indican que, posiblemente, la utilización de agroquímicos entre los meses de

mayor actividad de estos anfibios, serían los responsables de las alteraciones detectadas.

**Palabras clave:** *Odontophrynus americanus*, tegumento, agroecosistema, bosque fluvial, perturbación antrópica

## INTRODUCCIÓN

Entre los anfibios, el orden Anura es el grupo más diverso y cuenta con más de 6400 especies (FROST, 2014). De las 176 que se citan para Argentina (LAVILLA & HEATWOLE, 2010), 31 se observan en la Provincia de Córdoba (DITADA *et al.*, 1996). Estos vertebrados se localizan en entornos muy diversos y entre ellos figuran los extensos agroecosistemas del sur de la mencionada provincia, donde habitan 14 especies (CAREZZANO & CABRERA, 2010a; 2010b; 2011; URQUIZA & CAREZZANO, 2013; CAREZZANO *et al.*, 2013a; 2013b; 2014). Estos ambientes presentan alteraciones significativas a causa de la intensa actividad agropecuaria que en ellos se realiza desde hace décadas; anualmente se utilizan millones de litros de agroquímicos, como insecticidas, herbicidas y fungicidas los cuales son aplicados entre los meses de octubre y marzo, período durante el cual los anfibios son biológicamente más activos (CAREZZANO & CABRERA, 2010a; URQUIZA & CAREZZANO, 2013). Representantes de este grupo de vertebrados también son localizados en otros ecosistemas como los bosques fluviales del litoral argentino. Estos ambientes exhiben una baja alteración antrópica, aunque se encuentran rodeados de áreas dedicadas a la actividad agropecuaria (PELTZER *et al.*, 2006).

Es importante señalar que los anfibios son excelentes bioindicadores ambientales ya sea en ecosistemas acuáticos como terrestres (LIPS *et al.*, 1999; MANZANILLA & PÉFAUR, 2000). Esto se debe, entre otros aspectos, a la gran permeabilidad que ofrece su tegumento. Este constituye un sistema complejo formado por dos capas, la epidermis de origen ectodérmico y la dermis originada a partir del mesodermo (DUELLMAN & TRUEB, 1994). La epidermis muestra diferencias según la edad del animal, la región corporal que cubre y la época del año y está compuesta por tres estratos, que desde la superficie son el córneo, el granuloso y el germinativo. Además puede presentar ornamentaciones como tubérculos, crestas y papilas o espinas (ELIAS & SHAPIRO, 1957; MCDIARMID, 1971; DUELLMAN & TRUEB, 1994; SCHWINGER *et al.*, 2001; MANGIONE *et al.*, 2011; VITT & CALDWELL, 2014). La dermis, a su vez, está constituida por una capa esponjosa y otra compacta. En la primera se sitúan glándulas exocrinas multicelulares cuyas secreciones se esparcen por la superficie tegumentaria. La segunda capa está compuesta principalmente por



fibras de colágeno regularmente dispuestas (DUELLMAN & TRUEB, 1994; GARCIA *et al.*, 2011; MANGIONE *et al.*, 2011).

En los anfibios, las glándulas se pueden agrupar en mucosas y serosas, estas últimas también se denominan granulares o venenosas (DUELLMAN & TRUEB, 1994; VITT & CALDWELL, 2014). Las mucosas se relacionan con la respiración y el balance hídrico, mientras que las serosas participan en mecanismos de defensa. Ambos tipos glandulares pueden asociarse y formar unidades mayores como por ejemplo las glándulas parótidas, hedónicas y lumbares (QUAY, 1972; TOLEDO & JARED, 1995).

Elkan (1968) cita en el tegumento de *Odontophrynus americanus* y en otras 111 especies de anuros, un tercer estrato denominado capa Eberth-Katschenko (E-K), la cual varía en morfología y localización según la especie. La misma se ubica entre ambos estratos de la dermis y está compuesta por una sustancia amorfa en la cual son depositadas sales de calcio y fósforo (TOLEDO & JARED, 1993; KATCHBURIAN *et al.*, 2001; SCHWINGER *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2005; LILLYWHITE, 2006; GARCIA *et al.*, 2011). La capa E-K ha sido descrita como acelular por ELKAN (1968) y AZEVEDO *et al.* (2005), mientras que GARCIA *et al.* (2011) en *Leptodactylus* del grupo *fuscus* y MANGIONE *et al.* (2011) en *Ceratophrys cranwelli*, *Lepidobatrachus llanensis* y *Chacophrys pierotti* mencionan la ocurrencia de núcleos en la misma. Esta capa está asociada a funciones como la regulación hídrica evitando la desecación y la retención de agua (TOLEDO & JARED, 1993; GARCIA *et al.*, 2011).

Estudios experimentales realizados en peces como *Piaractus brachipomus* (Cachama Blanca) indican que, la exposición a diferentes dosis de agroquímicos provocan alteraciones tegumentarias como hiperplasia e hipertrofia de células planas de la epidermis y alteraciones en las células mucosas, como así también infiltración leucocitaria epidermal y acumulación subepidermal de pigmentos (RAMÍREZ *et al.*, 2009). No obstante tras la extensa revisión bibliográfica realizada sobre esta temática, en los anfibios no se hallaron resultados de investigaciones similares como así tampoco de los análisis estructurales con microscopía óptica.

En base a los antecedentes mencionados, en este trabajo se analizó el tegumento de individuos adultos de *O. americanus*, provenientes de dos

ambientes con diferentes niveles de perturbación antrópica, con el fin de evaluar la presencia de variaciones morfohistológicas en el tegumento.

*O. americanus* es un anuro fosorial que permanece enterrado la mayor parte del año, exceptuando los meses de primavera y verano en los cuales se reproduce en charcos temporarios y lagunas y deposita sus huevos en el fondo barroso (CEI, 1980).

Es de tamaño pequeño a mediano, con cuerpo globoso y hocico corto. Dorsalmente presenta una coloración parda o marrón claro con manchas oscuras y una línea vertebral clara. En Argentina se distribuye en las provincias del norte y del centro y desde Misiones hasta el sur de Buenos Aires. Habita ambientes muy diversos como pastizales inundables, llanuras, arbustales y bosques fluviales. Su dieta consiste básicamente de pequeños mamíferos, anfibios y artrópodos (GALLARDO, 1963; LEYNAUD *et al.*, 2006).

Se planteó como hipótesis de trabajo que el tegumento de los ejemplares de *O. americanus* provenientes del agroecosistema, exhibirán variaciones en relación con aquellos que habitan el bosque fluvial.

### **Objetivo general**

Realizar un análisis comparado de las variaciones estructurales, cuantitativas e histoquímicas del sistema tegumentario de ejemplares de *O. americanus* procedentes de un agroecosistema y de un bosque fluvial, a los fines de revelar modificaciones relacionadas con el grado de perturbación de los mismos.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar las características morfohistológicas de muestras de tegumento de tres regiones corporales, medio dorsal (MD), medio ventral (MV) e inguinal (I).
2. Revelar con técnicas histoquímicas la naturaleza de las secreciones glandulares en las distintas regiones corporales.
3. Analizar comparativamente las características tegumentarias entre los representantes de los dos ambientes estudiados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

En el presente trabajo se utilizaron diez individuos adultos de *O. americanus* (Fig. 1). Cinco de los cuales proceden de la Colección Herpetológica del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba (AC 685-689). Los mismos fueron colectados en un agroecosistema del sur de la Provincia de Córdoba (33° 01´S; 63° 30´W), correspondiente a la ecorregión Pampa (BROWN *et al.*, 2006). Esta región presenta un clima estacionario, con una temperatura media anual de 16,5°C, variando de 9,5°C en julio a 23,5°C en enero. La precipitación media anual es de 800 mm y se concentra entre los meses de octubre y marzo; el estrés hídrico ocurre principalmente entre agosto y setiembre y entre diciembre y enero debido a la escasa precipitación o a la elevada evapotranspiración (AIMAR *et al.*, 2010). Este sitio se caracteriza por presentar alta perturbación antrópica (CAREZZANO *et al.*, 2013a; 2013b) (Fig. 2A).

El otro lote, proviene de la Colección Herpetológica del Laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FCBC-UNL 3818-3822). Los mismos fueron capturados en un muestreo realizado en un bosque fluvial de la Provincia de Santa Fe (30° 32´ S; 59° 54´ W), perteneciente a la ecorregión del Espinal (BROWN *et al.*, 2006). Dicha región, presenta una precipitación media anual de 800 mm y la temperatura media anual es de 18°C, el clima es extremadamente variable debido a la extensión de la región, cálido y húmedo en el norte, templado y seco con marcado déficit hídrico, hacia el oeste y sur (BURKART *et al.*, 1999). En este sitio no existen fuentes notables de contaminación (ARTURI, 2006; PELTZER *et al.*, 2010) (Fig. 2B).

Todos los ejemplares fueron fijados en formalina al 10% y conservados en alcohol al 70%.

### Morfohistología

De cada ejemplar, se tomaron muestras del tegumento de las regiones medio dorsal (MD), medio ventral (MV) e inguinal (I). Las mismas se

deshidrataron en soluciones alcohólicas de gradación creciente, se aclararon en xilol e incluyeron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espesor los que se colorearon con hematoxilina-eosina (HE), para evaluar la arquitectura tegumentaria y la afinidad ácido-básica de sus componentes. La tinción con Tricrómico de Casson se utilizó para diferenciar el tejido epitelial del conectivo y la técnica de Von Kossa, para identificar sales minerales (fosfatos, oxalatos y carbonatos) de calcio, hierro y otros iones (PROPHET *et al.*, 1994; TOLOSA *et al.*, 2003).

### **Análisis morfométrico**

De cada uno de los ejemplares se tomaron 10 cortes de cada región corporal y se fotografiaron empleando una cámara digital AxioCam Erc 5s Carl Zeiss adosada a un microscopio Primo Star Carl Zeiss. En un área de 600  $\mu\text{m}^2$  se midió el espesor de la epidermis y de la dermis, como así también el de cada uno de sus estratos utilizando el programa AxioVision 4.8. Se realizaron 5 lecturas de cada estrato por área.

### **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 presentan distribución normal y si son homogéneas las varianzas. Aquellas variables que no cumplieran 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  $< 0,05$ .

### **Técnicas histoquímicas**

Para conocer la naturaleza de los carbohidratos complejos presentes en las secreciones glandulares se utilizaron las siguientes técnicas histoquímicas: Periodic Acid Schiff (PAS) (MC MANUS, 1946), para identificar polisacáridos neutros y glicoproteínas (BANCROFT & COOK, 1994), Alcian Blue (AB) pH 2,5 (SPICER, 1960), para marcar polisacáridos ácidos en las formas carboxiladas y sulfatadas (PEARSE, 1968) y azul de toluidina (ATO) (PROPHET *et al.*, 1994) para

poner de manifiesto la presencia de células metacromáticas y glicoproteínas (TOLOSA *et al.*, 2003). Los resultados se expresaron de acuerdo a la intensidad de las reacciones como: 0 (ausente), 1 (débil), 2 (moderado) y 3 (intenso).

Se estimó el porcentaje de cada tipo glandular, en un área corporal de  $600 \pm 28 \mu\text{m}^2$ .

## RESULTADOS

### Morfohistología

Las características morfohistológicas del sistema tegumentario de *O. americanus* de las tres regiones corporales analizadas con HE y Tricrómico de Casson, tanto de las muestras de los ejemplares procedentes del agroecosistema como las del bosque fluvial, revelan que está constituida por dos capas, la epidermis y la dermis (Figs. 3, 4 y 6). La primera de ellas está constituida por tres estratos. El más externo ó corneo, formado por una o dos capas celulares, planas y anucleadas. El intermedio ó granuloso, contiene células en diferenciación y, a su vez, puede estar formado por 1, 2 ó 3 capas celulares, cuyas formas varían de cúbicas bajas a cilíndricas y con núcleo ovalado y central. Además de los queratinocitos, tipo celular predominante, es posible observar células en forma de matraz (flask cells) las cuales son alargadas y con núcleo basal. El estrato más profundo o germinativo, consiste de una capa de células cilíndricas o cúbicas altas, que contactan con la lámina basal (Figs. 3, 4 y 6).

La dermis se subdivide en dos estratos, el esponjoso y el compacto. En la capa esponjosa se observó tejido conectivo laxo de apariencia esponjosa, con fibras colágenas y elásticas distribuidas de manera laxa. También se vieron glándulas exocrinas multicelulares (mucosas y serosas), abundantes cromatóforos, nervios y vasos sanguíneos. La dermis compacta está formada por tejido conectivo denso en el cual, las fibras colágenas yacen en paquetes paralelos a la superficie corporal del animal, además, a intervalos, fibras colágenas verticales se extienden desde la porción más profunda de la dermis compacta hasta la esponjosa (Figs. 3, 4 y 6).

La capa Eberth-Katschenko no se visualizó en ninguno de los ejemplares analizados con ninguna de las técnicas empleadas.

### **Morfometría**

En la Tabla 1 se presentan los valores medios, del espesor de los diferentes estratos tegumentarios, con sus respectivos desvíos estándar. Se evidencian diferencias en la mayoría de las regiones corporales y entre los estratos de cada una de ellas, entre los ejemplares procedentes del agroecosistema y del bosque fluvial. Se observó que en todos los especímenes analizados la epidermis es más delgada que la dermis.

Los individuos procedentes del agroecosistema presentan un mayor espesor tegumentario en la región I, seguido por la región MV y finalmente la MD. En los ejemplares del bosque fluvial se observó la situación inversa.

El estrato germinativo de las tres regiones corporales analizadas, el granuloso, la epidermis, el estrato compacto y la dermis de las regiones MV e I son más gruesos en los especímenes del agroecosistema en comparación con los individuos procedentes del bosque fluvial.

El test no paramétrico de Kruskal Wallis permitió observar diferencias estadísticamente significativas entre los ejemplares procedentes del agroecosistema y del bosque fluvial en la mayoría de las regiones corporales bajo estudio, entre los estratos de cada una de ellas y en relación al grosor total de las regiones MD e I (Tabla 2).

### **Glándulas exocrinas asociadas**

En las tres regiones corporales analizadas del tegumento de todos los individuos estudiados se identificaron glándulas mucosas y serosas. Las glándulas cutáneas están formadas por un ducto y el adenómero, situándose este último en la dermis esponjosa y el ducto atraviesa la epidermis permitiendo que la secreción sea liberada en la superficie tegumentaria.

La Tabla 3 muestra el grado de intensidad de las distintas reacciones histoquímicas, PAS, AB y ATO, en los diferentes tipos glandulares, por región corporal y ambiente analizado.

Las glándulas mucosas son activas y generalmente más pequeñas y numerosas que las serosas y no se distribuyen equitativamente. El adenómero

está constituido por células cúbicas con núcleo basal y oval. Muestran dos variedades de células siendo algunas AB positivas y otras negativas (Fig. 5) como así PAS positivas (Figs. 6 y 9) y ATO positivas (Fig. 7).

Las glándulas serosas poseen un adenómero formado por una capa sincitial interna, con núcleos basales alargados, con pequeñas granulaciones esféricas ATO negativas y metacromáticas (Fig. 8), PAS positivas (Fig. 9) y metacromáticas con AB (Fig. 10).

La Fig. 11 muestra los porcentajes de los diferentes tipos glandulares. El tipo que predominó en las tres regiones corporales analizadas de todos los ejemplares estudiados es el mucoso. La región MV de los individuos del agroecosistema y la región I de los ejemplares procedentes del bosque fluvial son las zonas con mayor porcentaje de glándulas mucosas. Con respecto a las glándulas serosas se observó que estas estaban en menor proporción en las regiones MD y MV de los animales provenientes del agroecosistema.

## DISCUSIÓN

### Morfohistología

El análisis morfohistológico del sistema tegumentario de *O. americanus* pone de manifiesto que presenta la arquitectura básica descrita para anuros (PORTO, 1936; TOLEDO & JARED, 1993; DUELLMAN & TRUEB, 1994; GREVEN *et al.*, 1995; SCHWINGER *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2005; FELSEMBURGH *et al.*, 2007).

En el estrato granuloso de las regiones medio ventral e inguinal de los ejemplares procedentes del bosque fluvial fue posible observar células en forma de matraz (flask cells). Según DUELLMAN & TRUEB (1994), se encuentran en el estrato germinativo, a diferencia de lo observado en el presente estudio. Se las relaciona con el transporte iónico, desempeñando una función trascendental en la osmoregulación (DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008), lo cual sugiere que la región ventral lleva a cabo un papel fundamental en la osmoregulación, FELSEMBURGH *et al.* (2007) en el estudio que realizó en *O. americanus* cita que las células en forma de matraz raramente fueron observadas, por tal motivo es un interesante tema para analizar a futuro la presencia de tales células en las regiones medio ventral e

inguinal de las muestras obtenidas en los ejemplares procedentes del bosque fluvial. Por encima del granuloso se ubica el estrato córneo compuesto por una o dos capas de células planas anucleadas. En el tegumento de *O. americanus* de los ejemplares analizados fue posible observar en la dermis compacta que a intervalos es atravesada por haces verticales de fibras colágenas, que conectan la región profunda de la dermis compacta con la esponjosa (FELSEMBURGH *et al.*, 2007). Esto también se ha verificado en *Xenopus laevis* (GREVEN *et al.*, 1995), *Bufo marinus* (SCHWINGER *et al.*, 2001), *Bufo ictericus* (AZEVEDO *et al.*, 2005), *Proceratophrys boie*, *P. laticeps* y en *P. apendiculata* (FELSEMBURGH *et al.*, 2007), DENÈFLE *et al.* (1993) consideran que estos haces son una vía de migración celular. Según GONÇALVES & DE BRITO-GITIRANA (2008), a través de ellos, los vasos sanguíneos transitan desde la dermis compacta alcanzando la capa esponjosa.

En el sistema tegumentario de los ejemplares estudiados la capa E-K no fue detectada en ninguno de los individuos analizados. ELKAN (1968), cita la capa E-K para *O. americanus* y la describe como depósitos que rellenan los espacios de la matriz de tejido conectivo laxo de la dermis esponjosa. La existencia de la misma, puede estar influenciada por el período estacional de la recolección, factores ambientales, la oferta de alimento, o incluso, se vea suprimida por cromatóforos altamente complejos o por una dermis esponjosa que actúe como reservorio de agua (FELSEMBURG & DE BRITO-GITIRANA, 2008), por lo tanto, sería necesario profundizar en el tema a los fines de dilucidar esta controversia.

### **Morfometría**

Los individuos procedentes del agroecosistema presentan un mayor espesor tegumentario en la región inguinal, seguido por la región medio ventral y finalmente la medio dorsal. En los ejemplares del bosque fluvial se observó la situación inversa. El espesor del tegumento en anuros varía según la región corporal analizada (PORTO, 1936; TOLEDO & JARED, 1993). En *Bufo marinus* se ha descrito una región dorsal más gruesa que la ventral, adjudicándose que tales variaciones se deberían al tamaño corporal y al sexo (SCHWINGER *et al.*, 2001). GARCIA *et al.* (2011) observaron diferencias intraespecíficas en especies



de *Leptodactylus* del grupo *fuscus*, señalando que las mismas serían causadas por la diversificación en el volumen de las células epidérmicas.

Las diferencias observadas entre el tegumento de los individuos de los dos ambientes analizados, estarían relacionadas con el nivel de perturbación antrópica de los mismos. Los ejemplares del agroecosistema exhiben un adelgazamiento notable a nivel de la capa córnea tanto en la región medio dorsal como inguinal así como de la dermis. Es bien conocido que los agroquímicos producen alteraciones en diversos tejidos y órganos (PELTZER *et al.*, 2001; HAYES *et al.*, 2006), entre las que se pueden citar, inducción al hermafroditismo y demasculinización (HAYES *et al.*, 2002), perturbación endócrina en anfibios causado por el pesticida atrazina (HAYES *et al.*, 2010), el glifosato (herbicida) produjo malformaciones externas (craneofaciales, bucales) de renacuajos (LAJMANOVICH *et al.*, 2012). En este sentido, estudios sobre los efectos de las actividades agrícolas en las poblaciones de anfibios de agroecosistemas indican que están afectadas en diferente grado (PELTZER *et al.*, 2005; AGOSTINI *et al.*, 2010; CAREZZANO & CABRERA, 2010b; URQUIZA & CAREZZANO, 2013) lo que induce a pensar que este sería el posible factor que provoque tales diferencias.

### **Glándulas exocrinas asociadas**

En el presente trabajo se evidencia, mediante las técnicas histoquímicas utilizadas que la naturaleza de las secreciones de las glándulas mucosas observadas en *O. americanus*, coincide con lo indicado por TOLEDO & JARED (1995) ya que el contenido glandular presenta glicosaminoglicanos en las formas carboxiladas y sulfatadas y mucoproteínas tales como mucinas, entre otros. Desde el punto de vista funcional, la secreción mucosa, contribuye a controlar el pH de la piel y participa en la termorregulación. Algunos autores consideran que favorece la muda del estrato córneo durante el período de muda, en determinadas especies de anfibios, el moco es viscoso y contiene compuestos nocivos o tóxicos (TOLEDO & JARED, 1995). TOLEDO & JARED (1995) y CLARKE (1997) sugirieron que las secreciones mucosas contribuyen a mantener la superficie de la piel húmeda, resbaladiza y prevenir el daño mecánico de ésta. También protegen de los efectos nocivos del contacto

prolongado con el agua, retarda la pérdida de agua por evaporación y presenta un efecto bacteriostático (CLARKE, 1997).

Las técnicas histoquímicas empleadas en el presente estudio, pusieron de manifiesto que en *O. americanus*, las granulaciones de las glándulas serosas están compuestas por polisacáridos simples, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, glucoproteínas y glucolípidos. Secretan sustancias tóxicas o nocivas proveyendo de protección contra infecciones bacterianas y fúngicas así como para numerosas especies de vertebrados (TOLEDO & JARED, 1995; CLARKE, 1997). Las secreciones producidas por estas glándulas (alcaloides, péptidos, aminos y esteroides), contienen componentes cardiotóxicos, anestésicos, neurotóxicos, hemotóxicos, miotóxicos, alucinógenos, hipo e hipertensivos.

Los resultados obtenidos para los individuos de *O. americanus*, recolectados en ambos ambientes ponen de manifiesto que las glándulas mucosas están presentes en todas las regiones corporales y son las más abundantes lo que se relacionaría con el papel protector de sus secreciones en relación a la pérdida de agua.

En el sistema tegumentario de *O. americanus* de todos los ejemplares analizados, se observó la mayor concentración de glándulas mucosas en la región medio ventral ya que funciona como reservorio de agua, principalmente en la región pélvica debido al mecanismo de atracción de moléculas de agua, y sus productos de secreción (glicoproteínas, polisacáridos ácidos y neutros), son altamente hidrofílicos y contribuyen con la acumulación, entrada y almacenamiento de agua, disminuyendo el roce y evitando la desecación (DUELLMAN & TRUEB, 1994; DE BRITO-GITIRANA & AZEVEDO, 2005; WELLS, 2007).

El tegumento de la región medio ventral de los ejemplares de *O. americanus* provenientes del agroecosistema y de la región inguinal de los individuos recolectados en el bosque fluvial son las zonas con mayor porcentaje de glándulas mucosas a diferencia de lo observado por VITT & CALDWELL (2014), que indicaron que las glándulas mucosas se encuentran en mayor proporción en la región dorsal del cuerpo de los anfibios, situación que no se observó en este análisis, lo que amerita la profundización de estudios específicos acerca de los porcentajes de los diferentes tipos glandulares presentes en la especie bajo estudio.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el sistema tegumentario de *Odontophrynus americanus* sigue el diseño básico descrito para anuros.

Se observaron diferencias significativas entre los ejemplares procedentes del agroecosistema y del bosque fluvial en la mayoría de las regiones corporales y entre los estratos.

Los individuos procedentes del agroecosistema presentan un mayor espesor tegumentario en la región I, seguido por la región MV y finalmente la MD. En los ejemplares del bosque fluvial se observó la situación inversa.

No se observó la capa Eberth-Katschenko situación que se contrapone a lo observado por Elkan en la especie bajo estudio.

Los tipos glandulares que se identifican en todos los ejemplares muestreados son las glándulas mucosas y serosas. Las primeras se encuentran en mayor porcentaje que las serosas en las tres regiones corporales analizadas de los ejemplares de ambos ambientes. El análisis histoquímico no evidenció diferencias entre las poblaciones estudiadas.

Estos resultados indicarían que, posiblemente, la utilización de agroquímicos entre los meses de mayor actividad de los anfibios, produciría alteraciones a nivel tegumentario, como por ejemplo el engrosamiento de las regiones MV e I. Estudios sobre este aspecto son necesarios a los fines de dilucidar esta problemática.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, M. G.; NATALE, G. S. & RONCO, A. E. 2010. Lethal and sublethal effects of cyperethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. **Ecotoxicology** **19**: 1545-1550.
- 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 1**- Número Especial. Cambios de uso de la tierra. Causas, consecuencias y mitigación. p. 3-14.
- ARTURI, M. F. 2006. Situación ambiental de la Ecorregión Espinal. *En*: BROWN, A.; MARTINEZ ORTIZ, U.; ACERBI, M. & CORCUERA, J. (Eds.). **La Situación Ambiental Argentina 2005**. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires. p. 240-246.
- 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.
- BANCROFT, J. D. & COOK, H. C. 1994. **Manual of Histological techniques and their diagnostic application**. New York, Churchill Livingstone. 457 p.
- BROWN, A.; MARTINEZ ORTIZ, U.; ACERBI, M. & CORCUERA, J. (Eds.). 2006. **La Situación Ambiental Argentina 2005**. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires. p. 240-278.
- BURKART, R.; BÁRBARO, N.; SÁNCHEZ, R. O. & GÓMEZ, D. A. 1999. **Ecorregiones de la Argentina**. Buenos Aires: Administración de Parques Nacionales. p. 28-29.
- CAREZZANO, F. & CABRERA, M. 2010a. Morfohistología del testículo de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leiuperidae) en un ecosistema agrícola. **Boletín de la Asociación Herpetológica Española** **21**: 39-42.
- CAREZZANO, F. & CABRERA, M. 2010b. Amphibia, Anura, Hylidae, *Scinax nasicus* (Cope, 1862): Distribution extensión. **Check List** **6** (3): 390-391.
- CAREZZANO, F. & 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 de Zoología del Uruguay 20**: 28-33.
- CAREZZANO, F.; URQUIZA, S.; DORFLINGER, K. & ALONSO, M. 2013a. Morfohistología testicular de *Odontophrynus americanus* (Dumeril & Bibrón, 1841) (Anura, Odontophrynidae) de Argentina. **The Biologist (Lima) 11**(1): 119-129.
- CAREZZANO, F.; URQUIZA, S.; DORFLINGER, K. & ALONSO, M. 2013b. Morfohistología testicular de *Ceratophrys ornata* (Bell 1843) (Ceratophryidae: Anura: Amphibia). **Iheringia, Série Zoologia 103** (2): 190-194.
- CAREZZANO, F.; 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.
- CEI, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. **Italian Journal of Zoology 2**. p. 301-304.
- CLARKE, B. T. 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews 72**: 365-379.
- DE BRITO-GITIRANA, L. & AZEVEDO, R. A. 2005. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). **Micron 36**: 532-538.
- DENÈFLE, J. P.; ZHU, Q. L. & LECHAIRE, J. P. 1993. Localisation of fibronectin in the frog skin. **Tissue and Cell 25** (1): 87-102.
- DI TADA, I. E.; ZAVATTIERI, M. V.; BRIDAROLLI, M. E.; SALAS, N. E. & MARTINO, A. L. 1996. **Anfibios anuros de la provincia de Córdoba**. En: DI TADA, I. E. & BUCHER, E. H. (Eds.). **Biodiversidad de la Provincia de Córdoba. Fauna**. Río Cuarto, Editorial Universidad Nacional de Río Cuarto. p. 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. **Novitates American Museum 1819**: 1-27.
- ELKAN, E. 1968. Mucopolysaccharides in anurans defence against desiccation. **Journal of Zoology 155**: 19-53.

- 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. 2014. Amphibian Species of the World: an Online Reference. V 6.0. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. **American Museum of Natural History**, New York, USA.
- GALLARDO, J. M. 1963. Observaciones biológicas sobre *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron, 1841). **Ciencia e Investigación** **3** (19): 177-186.
- GARCIA, G. F.; CRUZ, P. I. & MANGIONE, S. 2011. Caracterización histomorfológica de la piel de *Leptodactylus* del grupo *fuscus* (Anura: Leptodactylidae), destacando la capa de Eberth-Katschenko. **Acta Zoológica Lilloana** **55** (1): 33-43.
- GONÇALVES; V. F. & DE BRITO-GITIRANA, L. 2008. Structure of the sexually dimorphic gland of *Cycloramphus fuliginosus* (Amphibia, Anura, Cycloramphidae). **Micron** **39**: 32-39.
- GREVEN, H.; ZANGER, K. & SCHWINGER, G. 1995. Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). **Journal of Morphology** **166**: 325-335.
- HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. A. & VONK, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **99** (8): 5476-5480.
- HAYES, T. B.; CASE, P.; CHUI, S.; CHUNG, D.; HAEFFELE, C.; HASTON, K.; LEE, M.; MAI, V.; MARJUA, Y.; PARKER, J. & TSUI, M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? **Environmental Health Perspectives** **114**: 40-50.

- 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.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. 2008. **Histologia Básica: texto y atlas**. São Paulo, Guanabara Koogan. 533 p.
- 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.; PELTZER, P. M.; ATTADEMO, A. M.; CABAGNA-ZENKLUSEN, M. C. & JUNGES, C. M. 2012. Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. **Revista Química Viva** **3**: 184-198.
- LAVILLA, E. O. & HEATWOLE, H. 2010. **Status of amphibian conservation and decline in Argentina**. En: HEATWOLE, H. (Ed.). **Amphibian Biology. Status of decline of Amphibians: western hemisphere**. v. 9. Chipping Norton, Surrey Beatty & Sons. p. 30-49.
- 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.
- LEYNAUD, G. C.; PELEGRIN, N. & LESCANO, J. N. 2006. **Anfibios y Reptiles**. En: BUCHER, E. H. (Ed.). **Bañados del río Dulce y Laguna Mar Chiquita** (Córdoba, Argentina). Academia Nacional de Ciencias (Córdoba, Argentina). p. 219-235.
- LILLYWHITE, H. B. 2006. Water relations of tetrapod integument. **Journal of Experimental Zoology** **209**: 202-226.
- 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.; GARCIA, G. & CARDOZO, O. M. 2011. The Eberth–Katschenko layer in three species of ceratophryines anurans (Anura: Ceratophryidae). **Acta Zoologica** (Stockholm) **92**: 21-26.

- MANZANILLA, J. & PÉFAUR, J. E. 2000. Consideraciones sobre métodos y técnicas de campo para el estudio de anfibios y reptiles. **Revista de Ecología Latinoamericana** 7 (1-2): 17-30.
- MCDIARMID, R. W. 1971. Comparative morphology and evolution of frogs of the Neotropical genera *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Melanophryniscus*, and *Oreophrynella*. **Bulletin of the Los Angeles County Museum of Natural History Science** 12: 1-66.
- MC MANUS, J. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature** 158: 202.
- PEARSE, A. G. E. 1968. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. v1. J & A. Churchill, London. 759 p.
- PELTZER, P. M.; PONSSA, M. L. & LAJMANOVICH, R. C. 2001. Caso de malformación en *Leptodactylus mystacinus* (Anura, Leptodactylidae). **Natura Neotropicalis** 32 (2): 165-168.
- PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M. & CEJAS, W. 2005. Diversidad y conservación de anuros en ecosistemas agrícolas de Argentina: implicancias en el control biológico de plagas. **INSUGEO** 14: 263-280.
- PELTZER, P. M.; LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M. & BELTZER, A. H. 2006. Diversity of anurans across agricultural ponds in Argentina. **Biodiversity and Conservation** 15: 3499-3513.
- PELTZER, P. M.; ATTADEMO, 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.
- PORTO, J. 1936. Contribución al estudio de la histofisiología del tegumento de los batracios. **La Prensa Médica Argentina** 34: 5-53.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. & SOBIN, L. H. 1994. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington, DC: American Registry of Pathology. 280 p.
- QUAY, W. B. 1972. Integument and the environment: Glandular composition, function, and evolution. **American Zoologist** 12: 5-18.
- R VERSION 3.2.2 (2015-08-14). Fire Safety Copyright © 2015 **The R Foundation for Statistical Computing**. Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit).



- RAMÍREZ, W. D.; RONDÓN, I. B.; HOVER VIDAL, B. & ESLAVA, P. 2009. Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux ® 411F. **Revista MVZ Córdoba** **14**(1): 1563-1575.
- SCHWINGER, G.; ZANGER, K. & GREVEN, H. 2001. Structural and mechanical aspects of the skin of *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.
- SPICER, S. 1960. Correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. **Journal of Histochemistry** **8**: 18-34.
- 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.
- TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A. & NETO, A. G. F. 2003. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. São Paulo. Manole. p. 34-41.
- URQUIZA, S. & CAREZZANO, F. 2013. Anfibios de agroecosistemas de la Pampa del centro de Argentina. **Biocenosis** **27**: 57-61.
- VITT, L. J. & CALDWELL, J. P. 2014. **Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles**. Academic Press, London. p. 48-54.
- WELLS, K. D. 2007. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. Chicago y London, The University of Chicago Press. 1162 p.

Tabla 1. Valores medios, medidos en  $\mu\text{m}$  y sus respectivos desvíos estándar de los distintos estratos de cada región corporal del tegumento de *O. americanus*, en base a los ambientes analizados.

Región corporal	Estrato	Tipo de ambiente	
		Agroecosistema	Bosque fluvial
MD	Córneo	14,48 $\pm$ 4,61	15,65 $\pm$ 5,16
	Granuloso	54,25 $\pm$ 14,69	58,65 $\pm$ 19,90
	Germinativo	32,67 $\pm$ 12,69	31,60 $\pm$ 10,45
	Epidermis	101,40 $\pm$ 24,40	105,14 $\pm$ 25,69
	Esponjoso	191,37 $\pm$ 57,80	268,95 $\pm$ 82,78
	Compacto	276,69 $\pm$ 92,72	303,83 $\pm$ 86,62
	Dermis	468,06 $\pm$ 109,19	572,78 $\pm$ 103,63
	TOTAL	569,46 $\pm$ 116,59	677,93 $\pm$ 113,17
MV	Córneo	16,34 $\pm$ 5,05	16,97 $\pm$ 5,02
	Granuloso	64,61 $\pm$ 23,74	62,69 $\pm$ 32,97
	Germinativo	33,20 $\pm$ 11,01	32,56 $\pm$ 13,19
	Epidermis	114,15 $\pm$ 25,78	112,21 $\pm$ 46,51
	Esponjoso	214,47 $\pm$ 67,56	242,74 $\pm$ 85,44
	Compacto	301,78 $\pm$ 71,95	258,80 $\pm$ 97,44
	Dermis	516,25 $\pm$ 85,26	501,54 $\pm$ 148,85
	TOTAL	630,40 $\pm$ 84,02	613,75 $\pm$ 170,16
I	Córneo	16,51 $\pm$ 4,58	22,43 $\pm$ 7,56
	Granuloso	82,28 $\pm$ 28,31	62,68 $\pm$ 17,28
	Germinativo	30,86 $\pm$ 10,04	30,04 $\pm$ 10,15
	Epidermis	129,64 $\pm$ 30,31	115,15 $\pm$ 24,03
	Esponjoso	244,14 $\pm$ 75,48	247,45 $\pm$ 86,13
	Compacto	273,14 $\pm$ 78,21	245,26 $\pm$ 74,86
	Dermis	517,29 $\pm$ 102,27	492,71 $\pm$ 114,74
	TOTAL	646,93 $\pm$ 102,13	607,86 $\pm$ 120,26

Tabla 2. Valor  $\chi^2$  obtenido mediante el test de Kruskal Wallis, con su respectivo valor p, de cada estrato tegumentario, por región corporal del tegumento de *O. americanus* según el hábitat.

Región	Estrato	Valor $\chi^2$	Valor p
MD	Córneo	6,52	0,01*
	Granuloso	0,20	0,66
	Germinativo	0,87	0,35
	Epidermis	0,58	0,44
	Esponjoso	77,92	0,01*
	Compacto	7,75	0,01*
	Dermis	59,42	0,01*
	Total	56,016	< 0,01*
MV	Córneo	1,80	0,18
	Granuloso	1,96	0,16
	Germinativo	6,64	0,01*
	Epidermis	8,51	0,01*
	Esponjoso	9,27	0,01*
	Compacto	27,10	< 0,01*
	Dermis	0,87	0,37
	Total	0,0252	0,87
I	Córneo	58,04	< 0,01*
	Granuloso	1,12	0,29
	Germinativo	45,15	< 0,01*
	Epidermis	21,09	< 0,01*
	Esponjoso	0,16	0,69
	Compacto	8,39	< 0,01*
	Dermis	4,40	0,04*
	Total	8,846	< 0,01*

\*diferencias estadísticamente significativas entre los ejemplares del agroecosistema y el bosque fluvial.

Tabla 3. Resultados de las reacciones histoquímicas de los distintos tipos glandulares presentes en el tegumento de *O. americanus* en las diferentes regiones corporales según el habitat. Los valores se expresan de acuerdo a la intensidad de la coloración como: 0 (ausente), 1 (débil), 2 (moderado) y 3 (intenso).

Ambiente	Región corporal	Tipo glandular	Técnica histoquímica		
			PAS	AB	ATO
Agroecosistema	MD	mucosa	3	3-1	2
		serosa	2	0	0
	MV	mucosa	3	3-2	2
		serosa	1	0	0
	I	mucosa	3	3-2	2
		serosa	1	0	1
Bosque fluvial	MD	mucosa	3	3-1	2
		serosa	2	0	0
	MV	mucosa	3	3-1	2
		serosa	2	0	0
	I	mucosa	3	3-1	2
		serosa	2	0	0

Fig. 1. Ejemplar adulto de *Odontophrynus americanus*. Foto: Fernando Carezzano.



Fig. 2. Sitios de muestreo de *Odontophrynus americanus*. A, agroecosistema, sitio de alta perturbación antrópica; B, bosque fluvial, sitio de baja perturbación antrópica. Imágenes obtenidas de Google Earth.

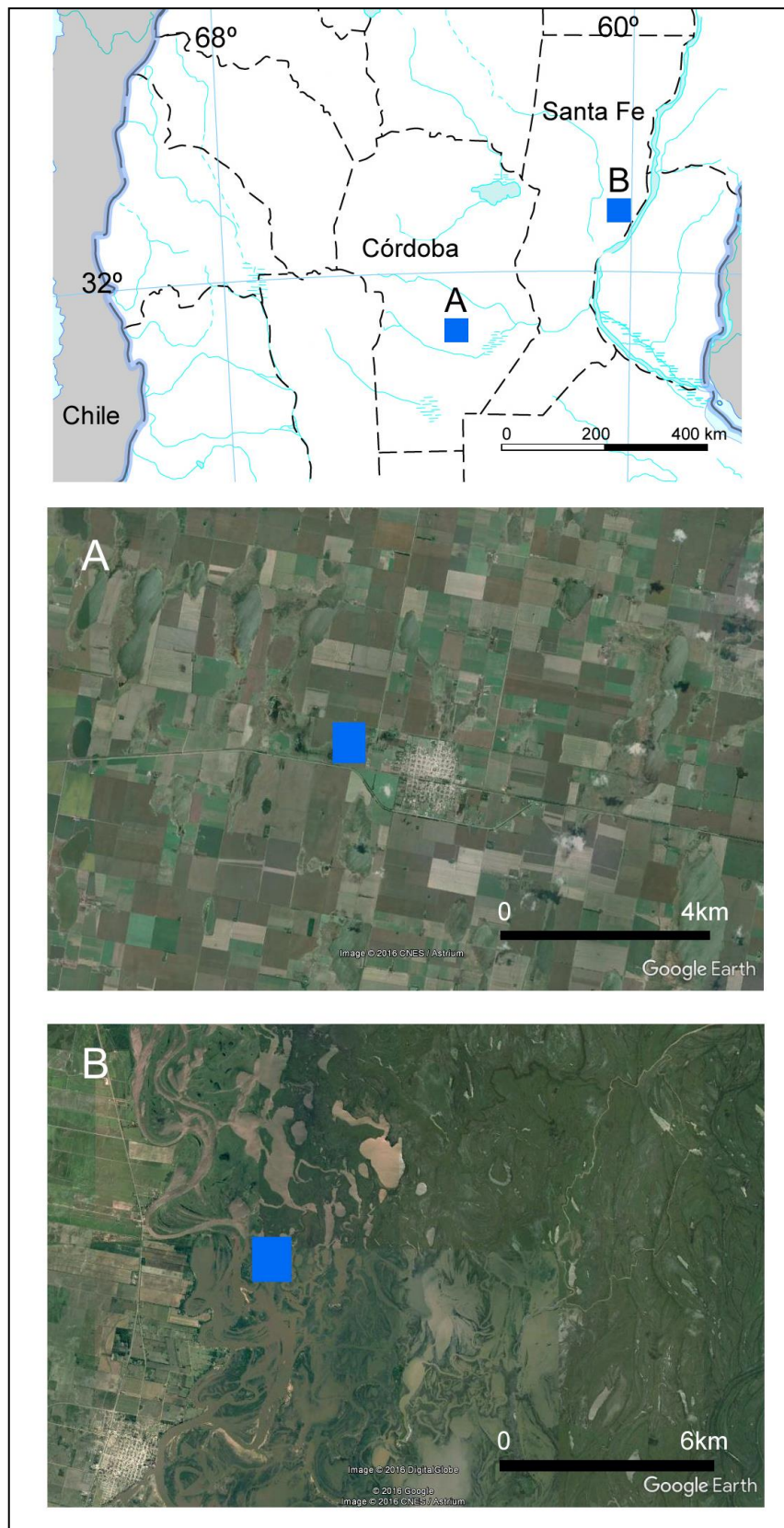


Fig. 3. Tegumento de la región medio dorsal de *O. americanus*. Bosque fluvial. 1, estrato córneo; 2, estrato granuloso; 3, estrato germinativo; 4, glándula mucosa; 5, glándula serosa; cromatóforos, asteriscos; flecha, fibras colágenas verticales (x40 HE).

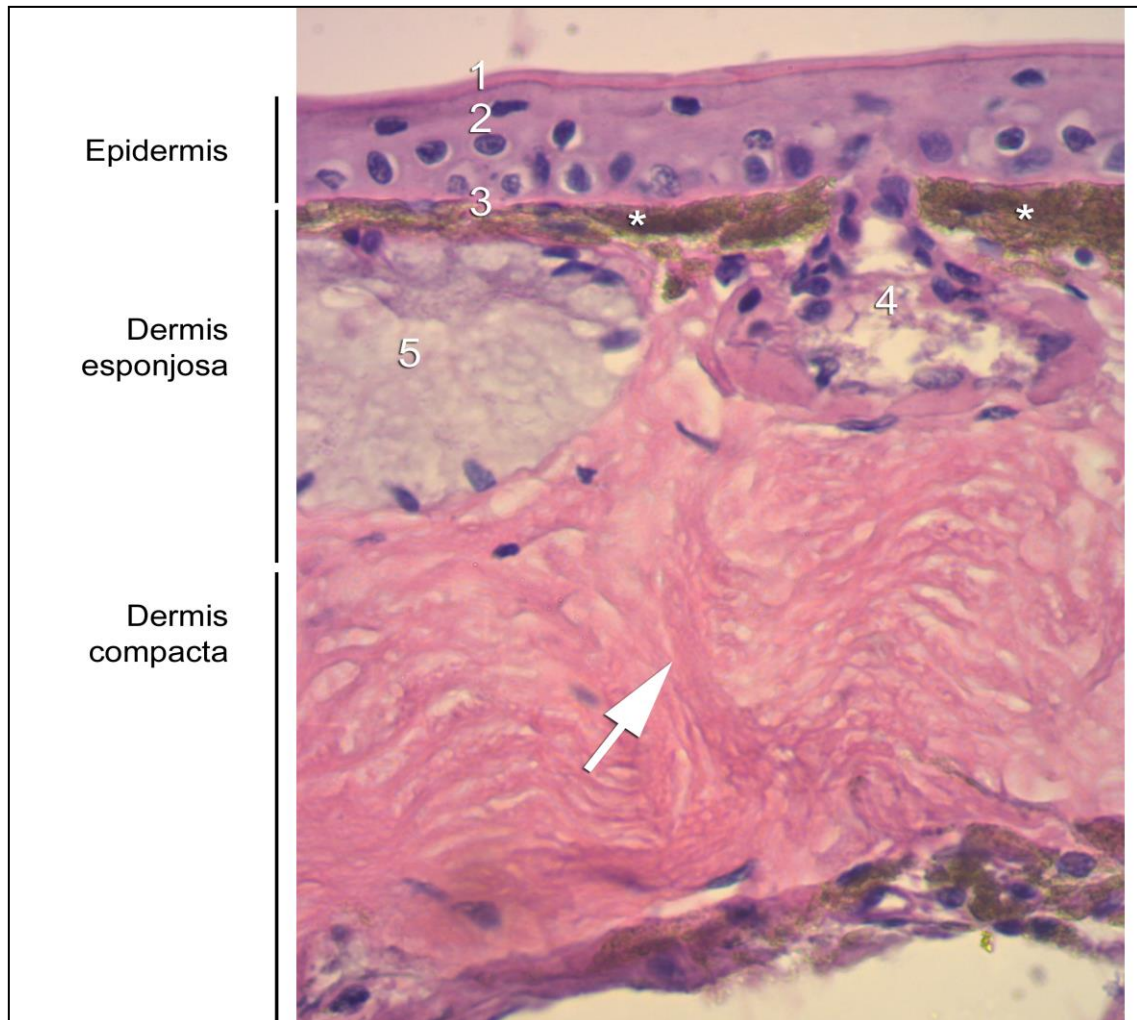


Fig. 4. Tegumento de la región medio ventral de *O. americanus*. Agroecosistema.

1, estrato córneo; 2, estrato granuloso; 3, estrato germinativo; 4, glándula mucosa; 5, glándula serosa; cromatóforos, asteriscos; v, vaso sanguíneo; flechas, fibras colágenas verticales (x40 Tricrómico de Casson).

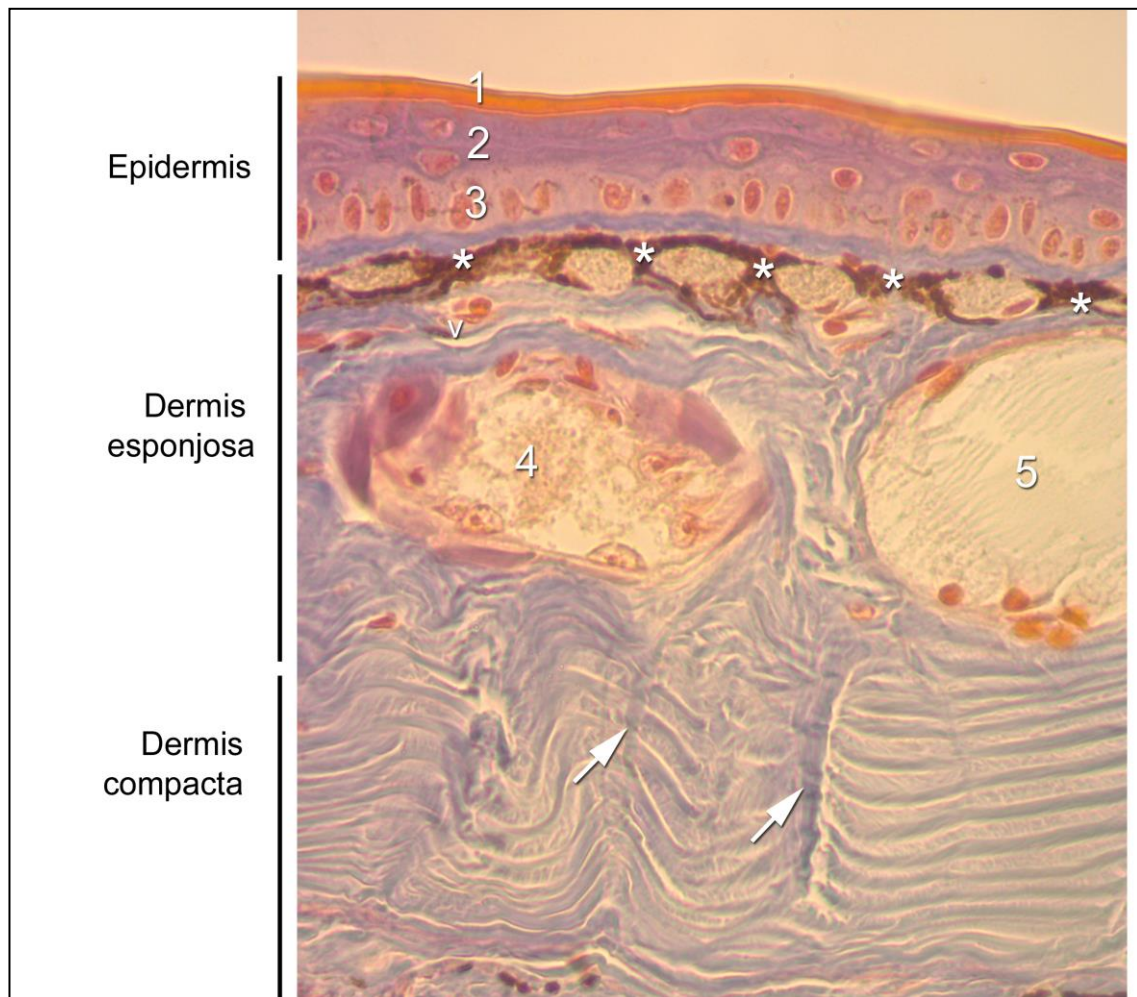




Fig. 5. Tegumento de la región medio ventral de *O. americanus*. Agroecosistema.

Las flechas indican las células AB positivas de las glándulas mucosas (x10 AB pH 2,5).

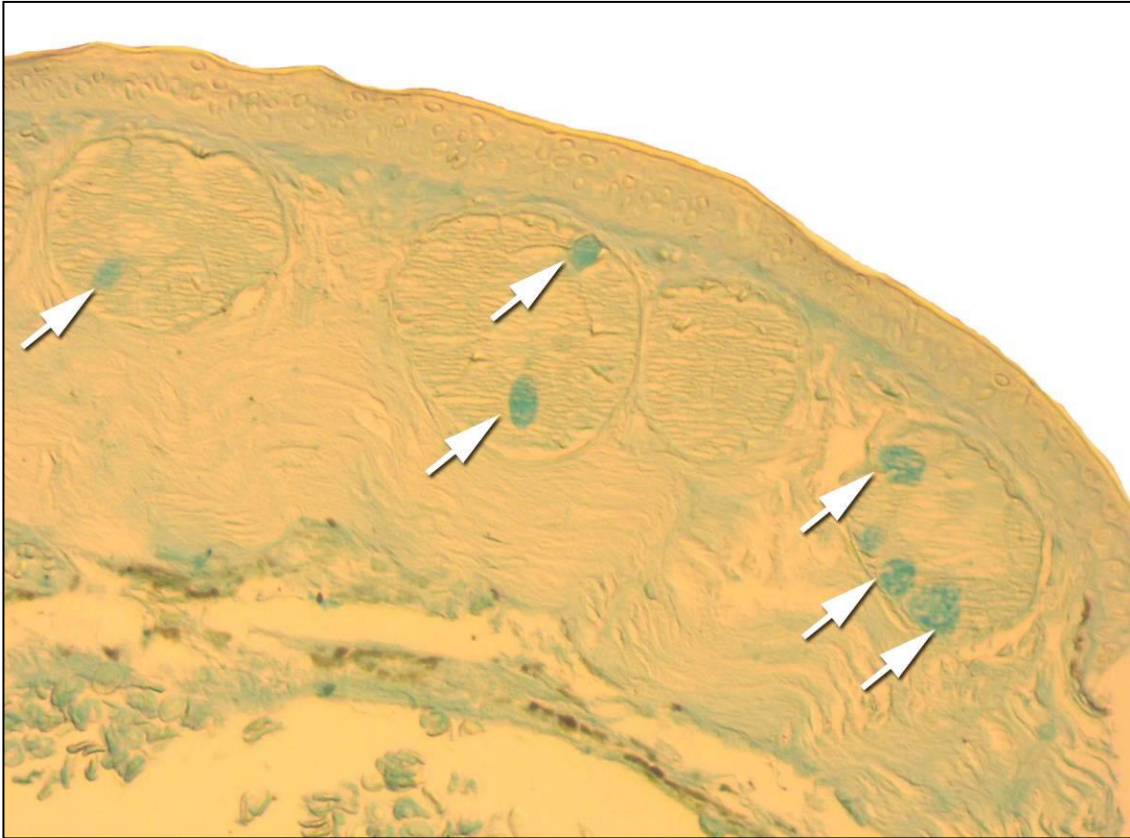


Fig. 6. Tegumento de la región medio dorsal de *O. americanus*. Agroecosistema.

1, estrato córneo; 2, estrato granuloso; 3, estrato germinativo; 4, glándula mucosa; cromatóforos, asteriscos; v, vaso sanguíneo (x40 PAS).

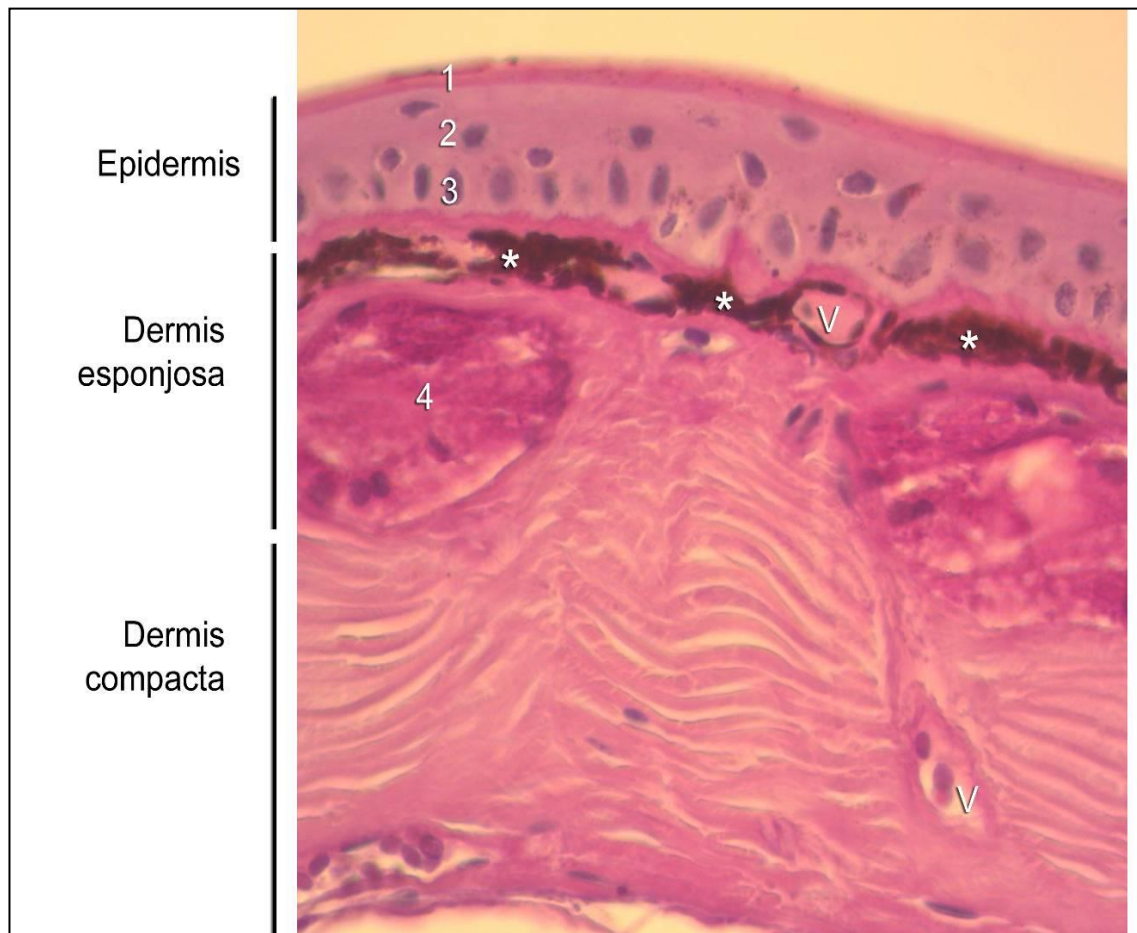


Fig. 7. Tegumento de la región inguinal de *O. americanus*. Agroecosistema. 1, glándula mucosa; 2, glándula serosa (x10 ATO).

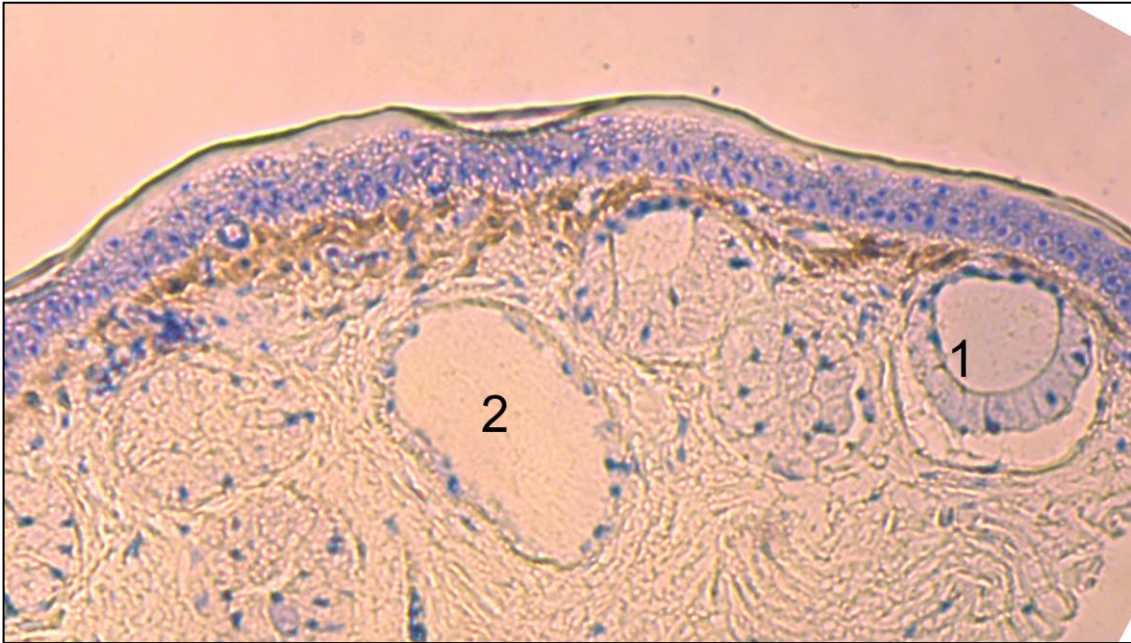


Fig. 8. Tegumento de la región medio ventral de *O. americanus*. Bosque fluvial.  
1, glándula mucosa; 2, glándula serosa metacromática (x10 ATO).

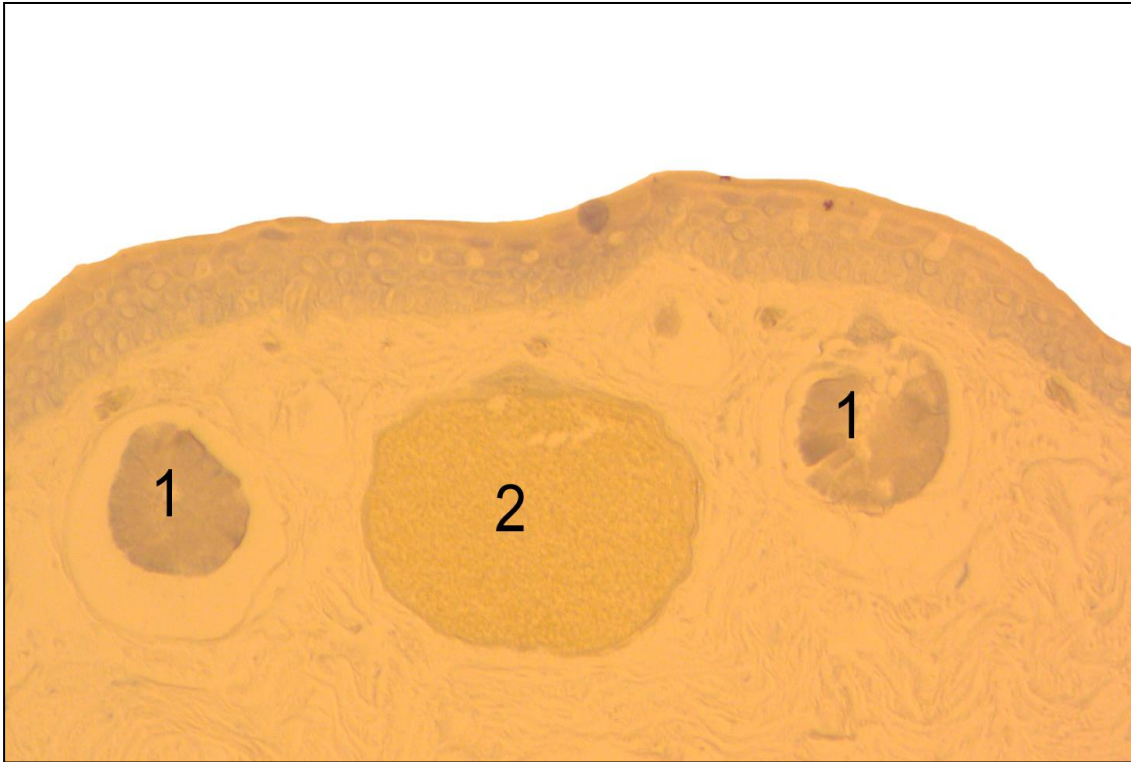


Fig. 9. Tegumento de la región medio ventral de *O. americanus*. Bosque fluvial. 1, glándula mucosa; 2, glándula serosa (x40 PAS).



Fig. 10. Tegumento de la región medio dorsal de *O. americanus*. Bosque fluvial.  
1, glándula mucosa; 2, glándula serosa metacromática. (AB pH 2,5 x 10).

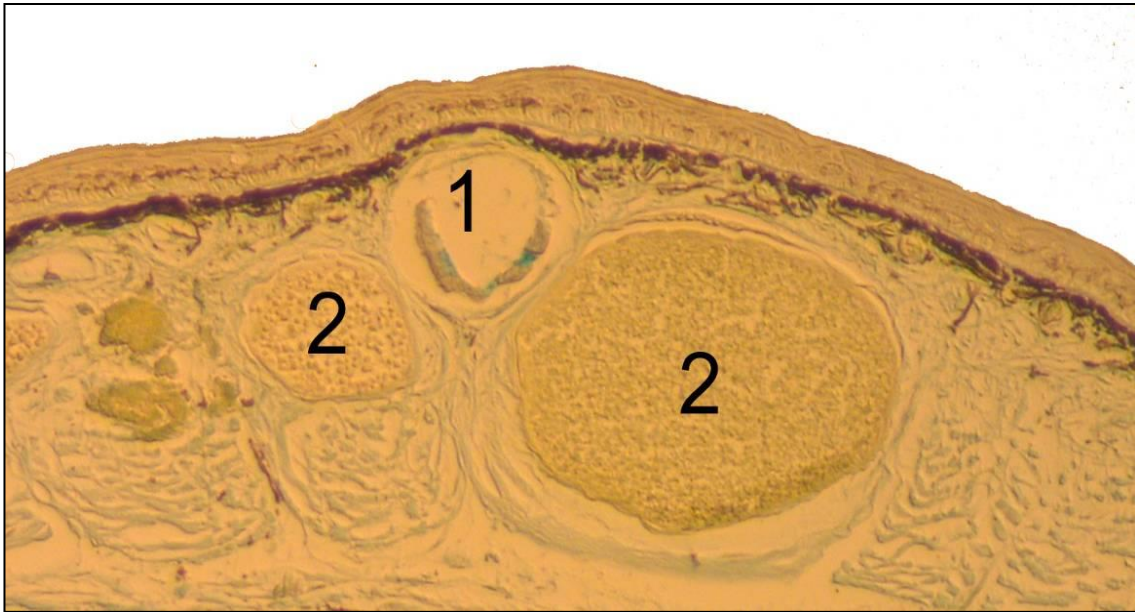


Fig. 11. Comparación del porcentaje de los dos tipos glandulares presentes en el tegumento de *O. americanus* según la región corporal y el habitat. MD, región corporal medio dorsal; MV, región corporal medio ventral; I, región corporal inguinal; 1: agroecosistema; 2: bosque fluvial.

