

HISTOLOGÍA DEL OVARIO Y OVIDUCTO DE LA RANA DE DESARROLLO DIRECTO *OREOBATES DISCOIDALIS* (ANURA: STRABOMANTIDAE)

HISTOLOGY OF THE OVARY AND OVIDUCT OF THE DIRECT DEVELOPING FROG *OREOBATES DISCOIDALIS* (ANURA: STRABOMANTIDAE)

Ana Pucci Alcaide¹, Franco Pucci Alcaide², María Laura Ponsa^{3*} & Adriana A. Michel²

¹Catedra de Histología Animal, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

²Instituto de Morfología Animal, Área Zoología, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

³Unidad Ejecutora Lillo, CONICET-Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. <https://orcid.org/0000-0002-8750-9680>

*Correspondence: mlponssa@hotmail.com

Received: 2023-12-15. Accepted: 2023-07-04. Published: 2023-07-10.

Editor: Adriana Manzano, Argentina.

Abstract.— *Oreobates discoidalis* is an anuran that reproduces in moist and sheltered habitats, laying relatively large eggs directly on land, and undergoing direct development. In this study, we describe the histology of the sexual organs of mature females during the reproductive period. Our observations reveal ovaries consisting of a single lobe, type 3 ovarian follicles exhibiting sectorization of the cytoplasm due to the accumulation of vitelline platelets, with some of these follicles exhibiting cubic epithelium, and theca formed by two layers in type 3 and 4 ovarian follicles. The oviduct is dominated by acid-type glycoconjugates exhibiting a labyrinthine distribution, organized in a fibrillar and granular manner. This study has revealed distinctive features in the architecture of glucid compounds and the monitoring of oviductal compounds in females of *O. discoidalis*. These characteristics would be suitable for a water-independent mode of reproduction.

Keywords.— Amphibian, female, histology, sexual organs, terrestrial reproduction.

Resumen.— *Oreobates discoidalis* es un anuro que se reproduce en entornos húmedos y protegidos, depositando sus huevos relativamente grandes directamente en tierra y exhibiendo desarrollo directo. En este estudio, se describe la histología de los órganos sexuales de hembras maduras durante el periodo reproductivo de esta especie. Las hembras de *O. discoidalis* presentan ovarios compuestos por un solo lóbulo, así como folículos ováricos tipo 3 con sectorización citoplasmática debido a la acumulación de plaquetas vitelinas. En algunos de estos folículos, el epitelio es de tipo cuboidal, y la teca está formada por dos capas en los folículos ováricos tipo 3. En cuanto al oviducto, se observa una predominancia de glicoconjugados ácidos con una distribución laberíntica, organizados de manera fibrilar y granular. Este estudio ha permitido identificar características particulares en la arquitectura de los compuestos glucídicos y en el seguimiento de los compuestos oviductales en hembras de *O. discoidalis*, las cuales serían adecuadas para un modo de puesta fuera del agua.

Palabras clave.— Anfibios, hembras, histología, órganos sexuales, reproducción terrestre.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios presentan una gran diversidad de modos reproductivos, entre los cuales se asume que el modo ancestral implica la puesta de huevos en agua y el desarrollo larval de vida libre (Wake, 1989). Sin embargo, algunos anuros presentan un modo reproductivo “más terrestre”, i.e. colocan sus puestas en tierra o las retienen durante su desarrollo; muchas de estas especies tienen desarrollo directo (Duellman & Trueb, 1986; Wake & Dickie, 1998; Haddad & Prado, 2005; Nunes de Almeida et al., 2021).

La reproducción en los anuros está potencialmente limitada a un determinado período del año, cuando las condiciones de su hábitat son óptimas para asegurar el correcto desarrollo de los ciclos gonadales y la producción de gametos competentes para la fecundación y posterior desarrollo del embrión (Pierantoni et al., 1984; Paniagua et al., 1990; Fernández & Ramos, 2003). En los ovarios de las hembras sexualmente maduras se desarrollan una serie de etapas de interacción entre las células del linaje germinal u oogonias con las células somáticas (Monroy et al., 1982). La ovogénesis es un proceso durante el cual los oocitos crecen en tamaño por la acumulación de reservas y se diferencian, adquiriendo características que los transforman en gametos aptos para ser fecundados e iniciar el desarrollo embrionario (Bühler et al., 2013). Oliveira & Santos (2004), describen las características morfológicas de las células germinales, a través del estudio del ovario de *Scinax fuscovarius*, su análisis reveló distintos tipos de células: oogonias y oocitos en diferentes estadios, los cuales clasificaron como folículos ováricos tipo I, II, III y IV. Para su clasificación se consideraron características de las células somáticas y de la línea germinal como longitud del folículo, características citológicas de las células foliculares, tecas, cambios en el ooplasma del oocito, formación y distribución de plaquetas vitelinas, cambios de la envoltura nuclear y migración de la vesícula germinal al polo animal. En las células germinales se desencadena una maduración citoplasmática y otra nuclear, que involucra la formación de folículos ováricos previtelogénicos y vitelogénicos, que al finalizar el proceso de ovogénesis formarán oocitos maduros que serán liberados cuando las condiciones ambientales sean óptimas para la ovulación (Oliveira & Santos, 2004).

En el oviducto de anuros, en sentido cefálico caudal, se distinguen las siguientes zonas: Parte Recta (PR), porción que se abre a la cavidad celómica mediante el ostium que colecta a los oocitos durante el proceso de ovulación; Zona Intermedia Proximal (ZIP) o zona de transición, en la que se inicia la formación de asas; Parte Preconvoluta (PPC) región constituida

por asas cortas y prietas que ocupan casi los dos tercios del oviducto; Parte Convoluta (PC), formada por asas largas y anchas de disposición perpendicular con respecto a la anterior, de corta extensión que finaliza en el ovisaco en forma de tubo acodado y replegado que desemboca en la cloaca (Moreno, 1972; Alcaide, 2006). El oviducto está formado, a través de su extensión, por tres túnicas, las cuales desde la luz hacia afuera son: mucosa, muscular y serosa. La túnica mucosa está constituida por un epitelio, una membrana basal y glándulas tubulares que varían en su desarrollo dependiendo de la zona del oviducto; la túnica muscular está formada por fibras musculares lisas mientras que la túnica serosa presenta un epitelio simple y un tejido conectivo subyacente (Moreno, 1972; Moreno & Alcaide, 1978; Alcaide, 2006).

Cualquiera sea el modo de puesta, los oocitos salen a través de la cloaca rodeados por una cubierta gelatinosa organizada, formada por los productos de las células secretoras de la mucosa del oviducto (Olavarría et al., 1968; Pereda, 1970; Moreno & Alcaide, 1978; Beattie, 1980; Alcaide, 1991; Alcaide, 1995). Esta masa gelatinosa afecta la fisiología del huevo y es necesaria para la posterior fecundación (Shaver & Barch, 1960; Katagiri, 1961; 1962, 1963, 1965; Glick & Shaver, 1963; Lee, 1967 a, b; Barbieri & Cabada, 1969; Barbieri & Raisman, 1969; Barbieri & Budeguer, 1973; Winik et al., 1999; Crespo, 2009), ya que posee propiedades bioquímicas que están directamente relacionadas con los variados modos reproductivos de los anuros (Alcaide, 2006; Alcaide et al., 2009; Pucci Alcaide et al. 2011).

El género *Oreobates* incluye 26 especies definidas, entre otros caracteres, por presentar reproducción con huevos terrestre y desarrollo directo, inferido a través de evidencia circunstancial (Padial et al., 2012; Frost, 2021). La biología reproductiva de las especies de *Oreobates* es pobremente conocida, tanto porque cantan esporádicamente como porque presentan baja densidad poblacional (Padial et al., 2008; Akmentins, 2011). En Argentina están presentes dos especies del género: *O. discoidalis* y *O. barituensis*, las cuales se distribuyen en el bosque Montano Subtropical húmedo perteneciente a la ecoregión de las Yungas Andinas (Vaira & Ferrari, 2008). *Oreobates discoidalis* se encuentra entre la hojarasca del sotobosque en áreas de bosque primario y secundario de Yungas (Akmentins et al., 2015). Esta especie se reproduce en lugares húmedos y protegidos, colocando la puesta, de huevos relativamente grandes y con abundante vitelo, directamente en tierra (Rodríguez Gómez et al., 2010; Vaira et al., 2012).

La histomorfología gonadal de especies del género *Oreobates* no ha sido previamente descripta. El objetivo de este trabajo

es analizar la histología de los órganos sexuales de hembras maduras de *O. discoidalis* durante el periodo reproductivo, con el fin de establecer relaciones con el tipo de puesta en tierra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron ovarios y oviductos de hembras maduras de *O. discoidalis* (n = 12). Los ejemplares fueron capturados en el periodo reproductivo de la especie, durante los meses de diciembre a marzo del 2008-2013, en las localidades de Lules y San Javier, provincia de Tucumán (Permiso de colecta Res. N°13-16, DFFSYS), y en la localidad Capital, provincia de Salta (Permiso de colecta Res. N° 000042, Min. de Ambiente y Desarrollo Sustentable), Argentina (Tabla 1).

Los ejemplares fueron llevados al laboratorio donde se anestesiaron y eutanizaron suministrando solución de pulverización de lidocaína al 10%. Este procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina (UNT) Res. No. 1206.2010. Se realizaron disecciones para extraer los órganos reproductivos, los cuales fueron fotografiados con un microscopio estereoscópico Leica EZ4 con cámara Sony Cyber-shot DSC-W100. Las muestras de ovarios y oviductos se fijaron en formol buffer (0,2M; pH 7) y se conservaron en etanol 70%. Se utilizaron dos procedimientos de inclusión y corte del material: a) se deshidrataron en una serie de soluciones graduadas de etanol, se aclararon en xileno y se incluyeron en Histowax (Leica

PF: 54-56°C. Se realizaron cortes seriados de 3 a 5 µm de espesor con un micrótopo Zeiss HYRAX S30; b) Se realizó inclusión en Cryoplast para cortes por congelación de 3 a 5 µm de espesor. Las secciones se realizaron a una temperatura que oscilaban entre -20°C y -30°C, con un Criostato Zeiss HYRAX C25. Los cortes se colorearon con Hematoxilina- Eosina (H-E) como técnica de demostración histomorfológica. Además, dado que la hematoxilina, por su basofilia, tiene afinidad por los grupos ácidos de glúcidos y proteínas, y la eosina reacciona en forma específica con las proteínas básicas, fue posible realizar un primer análisis de la presencia de gliconjugados (glicoproteínas y glicolípidos, péptidoglicanos, proteoglicanos y lipoproteínas) (Alcaide et al., 2009).

Para identificar glicosaminoglicanos (GAG) se usó Periodic Acid Schiff (PAS), los diferentes grados de polimerización se interpretan de acuerdo a la intensidad de la coloración, en orden creciente corresponde a PAS+, PAS++, PAS+++; siendo que el PAS+++ corresponde a GAG altamente polimerizados (moléculas de mayor peso), mientras que el PAS+ corresponde a biomoléculas de bajo peso molecular (Pearse, 1960). Para la determinación de compuestos con diferentes radicales ácidos se utilizó Alcian Blue a pH 2,5 y 0,5. El AB a pH 0,5 identifica glicoconjugados ácidos que tiene grupos terminales de tipo sulfatados; con el AB a pH 2,5 se identifican glicoconjugados ácidos con residuos de tipo carboxilados y fosfatados. Esto permite una identificación diferencial de GAG ácidos. Se usó la

Table 1. List of specimens examined of *Oreobates discoidalis*. Histological collection, Instituto de Morfología Animal (Área Zoología, Fundación Miguel Lillo).

Tabla 1. Lista de especímenes examinadas of *Oreobates discoidalis*. Colección histológica del Instituto de Morfología Animal (Área Zoología, Fundación Miguel Lillo).

Número de colección	Fecha de colecta (dd/mm/aa)	Localidad
APOD0001	22/02/2008	Dpto. Capital. Pcia. Salta. Argentina.
APOD0002	21/03/2008	Dpto. Capital. Pcia. Salta. Argentina.
APOD0003	2012	Dpto. Capital. Pcia. Salta. Argentina.
APOD0004	06/11/2013	Dpto. Lules. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0005	27/11/2013	Dpto. Lules. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0006	27/11/2013	Dpto. Lules. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0010	05/12/2013	San Javier. Dpto. Yerba Buena. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0011	05/12/2013	San Javier. Dpto. Yerba Buena. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0012	05/12/2013	San Javier. Dpto. Yerba Buena. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0013	05/12/2013	San Javier. Dpto. Yerba Buena. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0014	05/12/2013	San Javier. Dpto. Yerba Buena. Pcia. Tucumán. Argentina.
APOD0015	05/12/2013	San Javier. Dpto. Yerba Buena. Pcia. Tucumán. Argentina.

Table 2. Oviduct zones of *Oreobates discoidalis*, glandular types, glycoconjugates reaction and figures. Straight Part (PR), Proximal Intermediate Zone (ZIP), Preconvoluted Part (PPC); Convoluted Part (PC), Ovisaco (Os).

Tabla 2. Zonas del oviducto de *Oreobates discoidalis*, tipos glandulares, respuesta tintorial, reacción de los glicoconjugados, y figuras donde se ilustran. Parte Recta (PR), Zona Intermedia Proximal (ZIP), Parte Preconvoluta (PPC); Parte Convoluta (PC), Ovisaco (Os).

Zonas del oviducto (mucosa)	Tipos Glandulares presentes (G)	Respuesta tintorial	Glicoconjugados	Figuras
PPC, PC	G1a	H	Biomoléculas con residuos ácidos de glúcidos	8, 11
ZIP, PPC, PC, Os	G1b	E	Proteínas básicas de glicoconjugados	7, 8, 11, 13
PPC, PC	G2a	PAS+	Glicoproteínas y glicolípidos neutros	10, 11
PR, ZIP, PC	G2b	PAS++	Glicoproteínas, mucoproteínas y glicolípidos tipo cerebrósidos	6, 7, 11
ZIP, PPC, PC	G2c	PAS+++	Mucoproteínas neutras muy polimerizadas y proteoglicanos neutros con residuos carboxilados y de ácido siálico	7, 9, 10, 11, 12
PR, ZIP, PPC, PC	G3a	AB pH 0,5	Glicoconjugados residuos ácidos de tipo sulfatados y algunos fosfatos y ac. siálico	6, 7, 9, 11, 12
PR, ZIP, PPC, PC	G3b	AB pH 2,5	Mucoproteínas y proteoglicanos con residuos ácidos (carboxilo y fosfatos)	6, 7, 10, 11, 12
PPC	G4β	TB pH 5,6	Glicoconjugados con residuos fosfatados y ácido siálico	9
PR, PPC	G4γ	TB pH 3,4	Glicoconjugados con residuos sulfatados	9, 10
PPC, Os	G5	AB-PAS	Glicoconjugados ácidos y glicoconjugados neutros (glicoproteínas, mucoproteínas y proteoglicanos)	7, 9, 10, 13

combinación de colorantes AB a diferentes pH con la coloración del PAS para la demostración diferencial de glicoconjugados ácidos frente a glicoconjugados neutros. Esta combinación exhibe color azul y/o magenta según la presencia de diferentes grupos reactivos o la sumatoria tintorial (azul-magenta) indicando la presencia de contenidos mixtos. Para corroborar la presencia de sulfomucinas se usó Azul de Toluidina (TB) a pH 5,6 y 3,4, valuando la metacromasia alcohol resistencia mediante el tratamiento con alcoholes terciarios (Michaelis-Granik, 1945; Pearse, 1960; Barka & Anderson 1965; Humason, 1979). Se realizó la valoración de glicoconjugados que se encuentran presentes en los diferentes tipos glandulares a lo largo de oviducto (Tabla 2).

Los cortes fueron observados con un microscopio óptico ZEISS Lab.A1 con cámara ZEISS AxioCam ERc5s (software ZEN 2012), y fotografiados con un microscopio Leica DM2000 con cámara Leica ICC50HD (software Leica LAZ V4.12) y cámara BASLER (software MICRO Visioner MANUALWSI 2021a).

RESULTADOS

OVARIO

Los ovarios de *O. discoidalis* están formados por un solo lóbulo, siendo el derecho de mayor tamaño. Durante el periodo reproductivo los ovarios ocupan gran parte de la cavidad abdominal, y presentan predominio de folículos ováricos tipo 4. En contacto con los ovarios, unidos por medio de tejido conectivo se observan los cuerpos grasos, constituidos por prolongaciones digitiformes de tejido adiposo blanco, formado por adipocitos de diferentes tamaños, aislados o agrupados. El tejido conectivo que rodea a los ovarios está constituido por fibras colágenas y células como fibroblastos y macrófagos; se observa gran vascularización tanto en los ovarios como en los cuerpos grasos (Figs. 1a, b, c, d, e).

Cada ovario está rodeado por un epitelio simple plano y por debajo de éste una delgada capa de tejido conectivo, el cual se

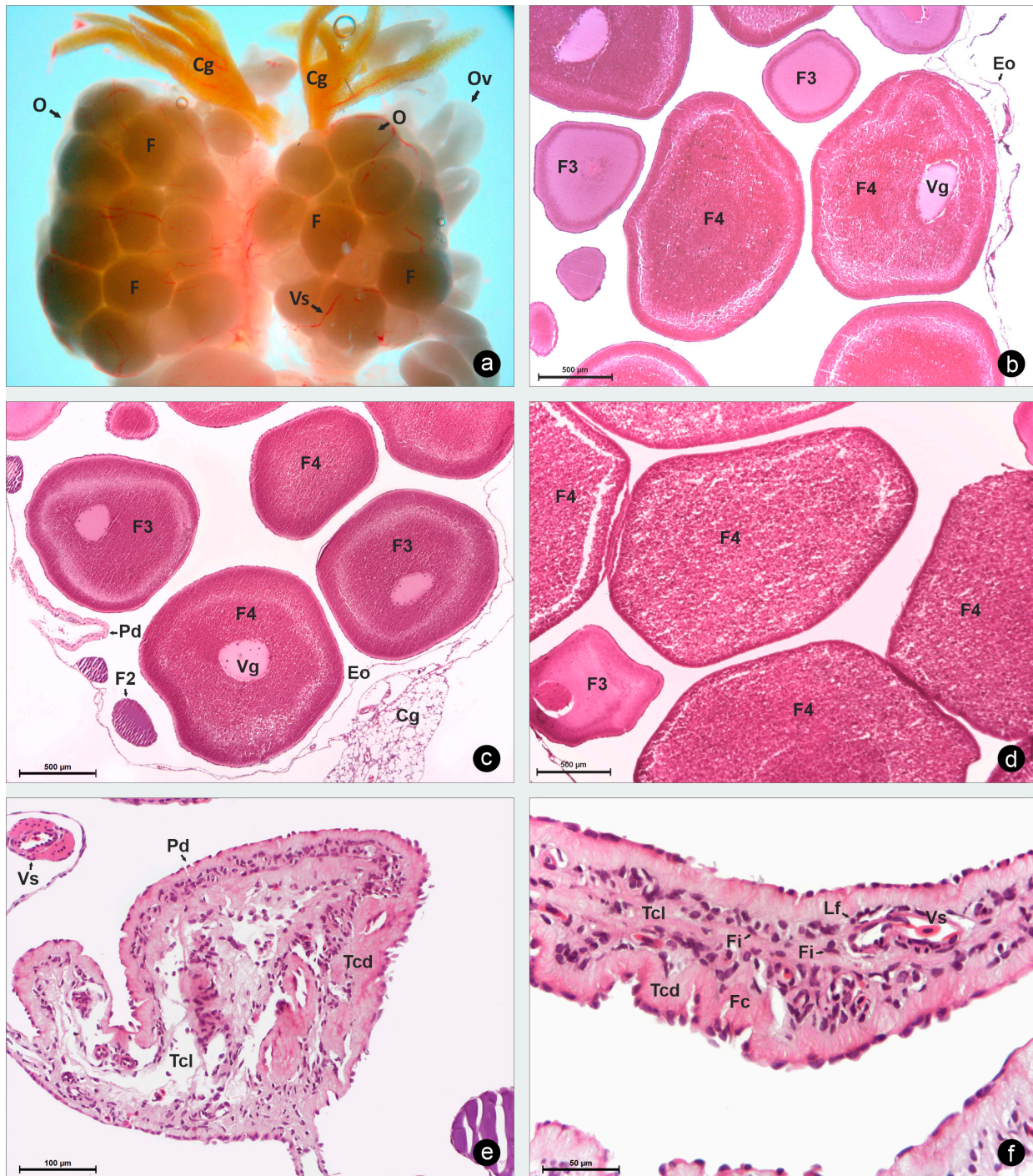


Figure 1. Anatomy and histomorphology of the ovary and digitiform projections of *Oreobates discoidalis*. (a) Macroscopy of ovaries and fatty bodies. (b, c) Histomorphology with different types of ovarian follicles, stroma and fatty body; (H-E). (d) Vitellogenic ovarian follicles (H-E). (e, f) Digitiform projections (H-E). Abbreviations: Fat Body (Cg); Ovarian Strom (Eo); Collagen fibers (Fc); Fibroblast (Fi); Ovarian follicle (F); Previtellogenic ovarian follicle Type 2 (F2); Previtellogenic ovarian follicle Type 3 (F3); Previtellogenic ovarian follicle Type 4 (F4); Lymphocyte (Lf); Ovary (O); Oviduct (Ov); Digitiform projections (Pd); Dense Connective Tissue (Tcd); Lax Connective Tissue (Tcl); Germinal Vesicle (Vg), Blood vessel (Vs), Hematoxylin-Eosin (H-E).

Figura 1. Anatomía e histomorfología del ovario y proyecciones digitiformes de *Oreobates discoidalis*. (a) Macroscopía de ovarios y cuerpos grasos. (b, c) Histomorfología de diferentes tipos de folículos ováricos, estroma y cuerpo graso (H-E). (d) Folículos ováricos vitelogénicos (H-E). (e, f) Proyecciones digitiformes (H-E). Abreviaturas: Cuerpo Graso (Cg); Estroma Ovárico (Eo); Fibras de Colágeno (Fc); Fibroblasto (Fi); Folículo ovárico (F); Folículo ovárico previtelogénico Tipo 2 (F2); Folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (F3); Folículo ovárico vitelogénico Tipo 4 (F4); Linfocito (Lf); Ovario (O); Oviducto (Ov); Proyecciones Digitiformes (Pd); Tejido Conectivo Denso (Tcd); Tejido Conectivo Laxo (Tcl); Vaso Sanguíneo (Vs); Vesícula Germinal (Vg). Hematoxilina-Eosina (H-E).

introduce entre los folículos, como proyecciones digitiformes. En algunas regiones del ovario estas proyecciones se caracterizan por presentar dos zonas de tejido conectivo: una periférica de tejido conectivo denso formado por abundantes fibras de colágeno dispuestas en diferentes direcciones y una central formada por tejido conectivo laxo con abundantes fibroblastos, macrófagos, linfocitos y vasos sanguíneos como arteriolas, vénulas y capilares (Figs. 1c, e, f).

Los ovarios presentan variaciones en el tamaño, relacionadas con el desarrollo de la oogénesis. En los ejemplares con ovarios más pequeños se pueden diferenciar claramente folículos ováricos previtelogénicos tipo 1 y 2 (Fig. 2), mientras que los ejemplares con ovarios de mayor tamaño se distinguen folículos en diferentes momentos de la foliculogénesis, observándose folículos ováricos previtelogénicos tipo 1, 2 y vitelogénicos tipo 3, 4 (Figs. 1, 3, 4).

Oogénesis

Folículos ováricos previtelogénicos

Folículos ováricos tipo 1: se observa aproximadamente 8 folículos previtelogénicos de diferentes tamaños (Figs. 2a, b). Los folículos ováricos tipo 1 presentan externamente una teca delgada de tejido conectivo y un epitelio formado por células foliculares planas. El oocito presenta un citoplasma homogéneo y fuertemente basófilo, esto último sugiere un importante desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres, necesarios para la síntesis proteica durante el período de vitelogénesis.

La vesícula germinal es esférica y se ubica en posición central, la cromatina se presenta como hebras muy finas de aspecto puntiforme basófilas y distribuidas al azar en el nucleoplasma, dando la típica imagen de cromosomas plumulados. Estos oocitos presentan un número reducido de nucléolos de diferentes tamaños, distribuidos en la región periférica, próximos a la envoltura nuclear (Figs. 2c-f).

Folículos ováricos tipo 2: Estos folículos, están constituidos por un epitelio folicular simple plano, rodeado externamente por una teca de tejido conectivo. El oocito presenta un citoplasma granular basófilo, observándose en algunos sectores del ooplasma pequeñas vacuolas libres o aglutinadas (Figs. 2b, f). La vesícula germinal en posición central presenta una envoltura nuclear lisa con ligeros plegamientos, en algunas zonas, y un nucleoplasma acidófilo con nucléolos de diferentes tamaños ubicados en la región periférica de la misma (Figs. 2b, f).

Folículos ováricos vitelogénicos

Folículos ováricos tipo 3: En estos folículos se observa un aumento gradual y progresivo de las plaquetas vitelinas en el ooplasma cortical del oocito. Esto determina que se diferencien tres regiones citoplasmáticas con diferente concentración, tamaño y disposición de las plaquetas vitelinas: cortical, media e interna. La región periférica o cortical está cubierta por abundantes plaquetas vitelinas, muy pequeñas y próximas entre sí, otorgándole a esta región una marcada acidofilia. La región media presenta plaquetas más grandes, redondeadas, distribuidas en hileras separadas entre sí, lo que implica menor acidofilia en esta región. Por último, la región interna que rodea a la vesícula germinal, de mayor espesor y acidofilia intensa, presenta plaquetas vitelinas grandes y pequeñas dispuestas al azar y menos abundantes que en la región periférica (Figs. 3a-d).

En estos oocitos la vesícula germinal presenta una membrana nuclear ligeramente plegada, lo que indicaría el inicio del proceso de desensamblaje; el nucleoplasma es acidófilo y los nucléolos, en menor número, se distribuyen en la región periférica próximos a la envoltura nuclear (Figs. 3a, b). Externamente al epitelio folicular se observan las tecas constituidas por dos capas muy capilarizadas (Fig. 3c). Entre el oolema y el epitelio folicular se observa una delgada matriz extracelular homogénea intensamente acidófila que corresponde a la envoltura vitelina. Asimismo, entre la membrana plasmática del oocito y el citoplasma cortical se observa una estrecha zona granular acidófila que corresponde a la zona de gránulos corticales o córtex (Figs. 3c, f).

Folículos ováricos tipo 4: Los oocitos presentan un ooplasma completamente cubierto de grandes plaquetas vitelinas, de forma esféricas u ovaladas, distribuidas de manera homogénea en la región media y central del citoplasma; mientras que en la región periférica o córtex las plaquetas son pequeñas, abundantes y muy próximas entre sí (Figs. 4a, b, d). En estos oocitos la vesícula germinal migra al polo animal, y se caracteriza porque la envoltura nuclear está plegada, fragmentada en algunos puntos, presenta finas granulaciones basófilas; numerosos nucléolos localizados principalmente en su región central (Figs. 4c, f).

En los folículos ováricos tipo 4 el epitelio folicular varía según el tamaño de los mismos de simple plano a cubico, pudiendo variar el espesor de las células foliculares en algunas regiones del folículo. Las tecas tienen un espesor variable según el tamaño del folículo, en los más pequeños están constituidas por dos capas de fibras de colágeno y fibroblastos, mientras que en los de mayor tamaño por una capa muy delgada de estos elementos (Figs. 4a, d, e).

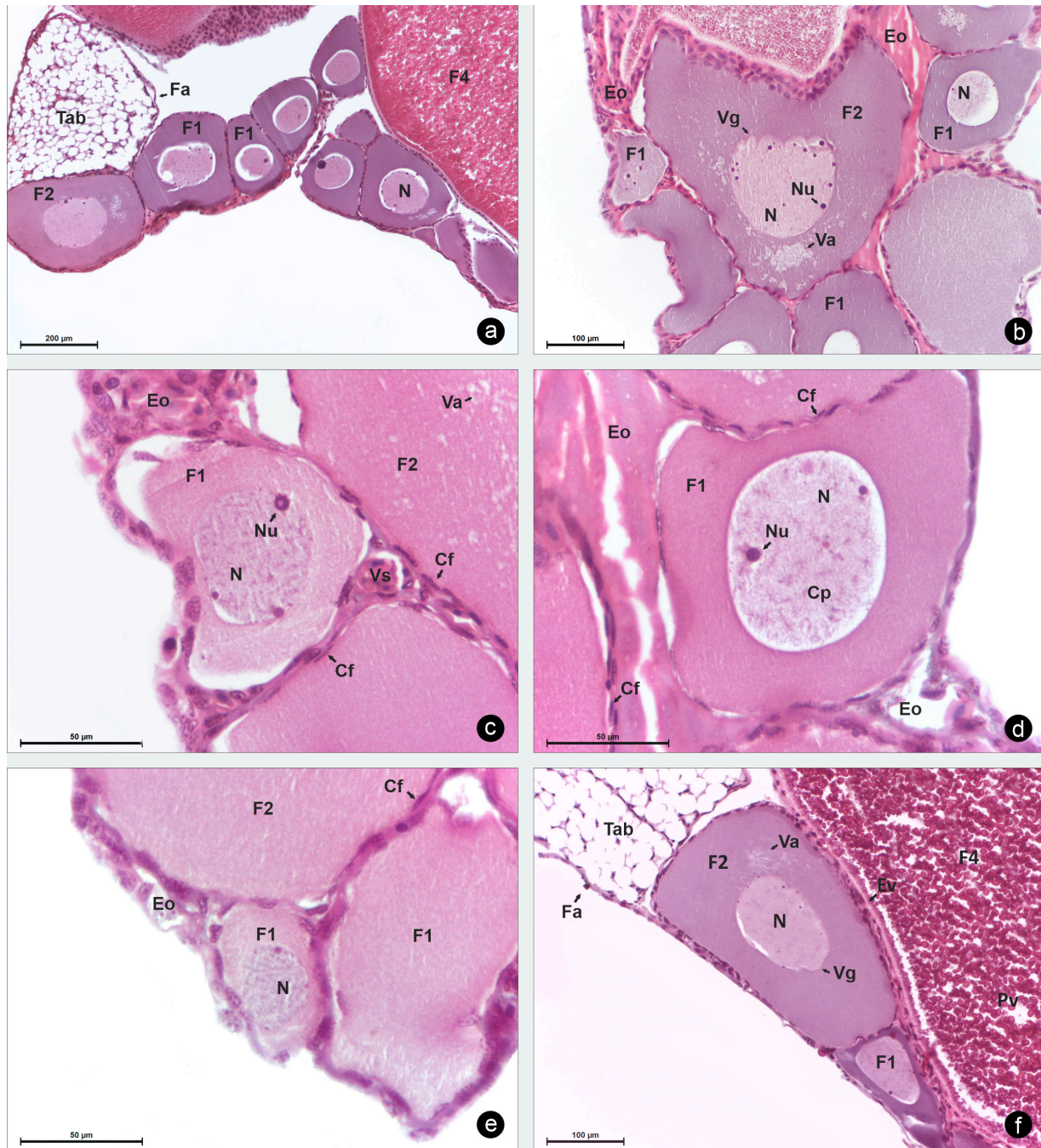


Figure 2. Histological section of ovaries with previtellogenic ovarian follicles of *Oreobates discoidalis*. (a) Types of ovarian follicles (H-E). (b) Previtellogenic ovarian follicle (H-E). (c) Ovarian strom (H-E). (d) Follicle ovarian previtellogenic Type 1 and ovarian strom (H-E). (e) Previtellogenic ovarian follicle (H-E). (f) Previtellogenic ovarian follicles, vitellogenic ovarian follicle and atretic follicle (White adipose tissue) (H-E). Abbreviations: Follicular cell (Cf); Plumulated chromosome (Cp); Vitelline envelope (Ev); Ovaric Strom (Eo); Follicle Atretic (Fa); Previtellogenic ovarian follicle Type 1 (F1); Previtellogenic ovarian follicle Type 2 (F2); Previtellogenic ovarian follicle Type 4 (F4); White adipose tissue (Tab); Nucleus (N); Nucleolus (Nu); Vitellin Plaquettes (Pv); Vacuole (Va); Germinal Vesicle (Vg), Blood Vessel (Vs). Hematoxylin-Eosin (H-E).

Figura 2. Corte histológico de ovarios con folículos ováricos previtelogénicos de *Oreobates discoidalis*. (a) Tipos de folículos ováricos (H-E). (b) Folículos ováricos previtelogénicos (H-E). (c) Estroma ovárico (H-E). (d) Folículo ovárico previtelogénico Tipo 1 y estroma ovárico (H-E). (e) Folículo ovárico previtelogénico (H-E). (f) Folículos ovárico previtelogénicos, folículo ovárico vitelogénico y folículo atrésico (tejido adiposo blanco) (H-E). Abreviaturas: Célula Folicular (Cf); Cromosoma Plumulado (Cp); Envoltura vitelina (Ev); Estroma Ovárico (Eo); Folículo Atrésico (Fa); Folículo ovárico previtelogénico Tipo 1 (F1); Folículo ovárico previtelogénico Tipo 2 (F2); Folículo ovárico vitelogénico Tipo 4 (F4); Tejido adiposo blanco (Tab); Núcleo (N); Nucleolo (Nu); Plaquetas Vitelinas (Pv); Vacuola (Va); Vesícula Germinal (Vg); Vaso Sanguíneo (Vs). Hematoxilina-Eosina (H-E).

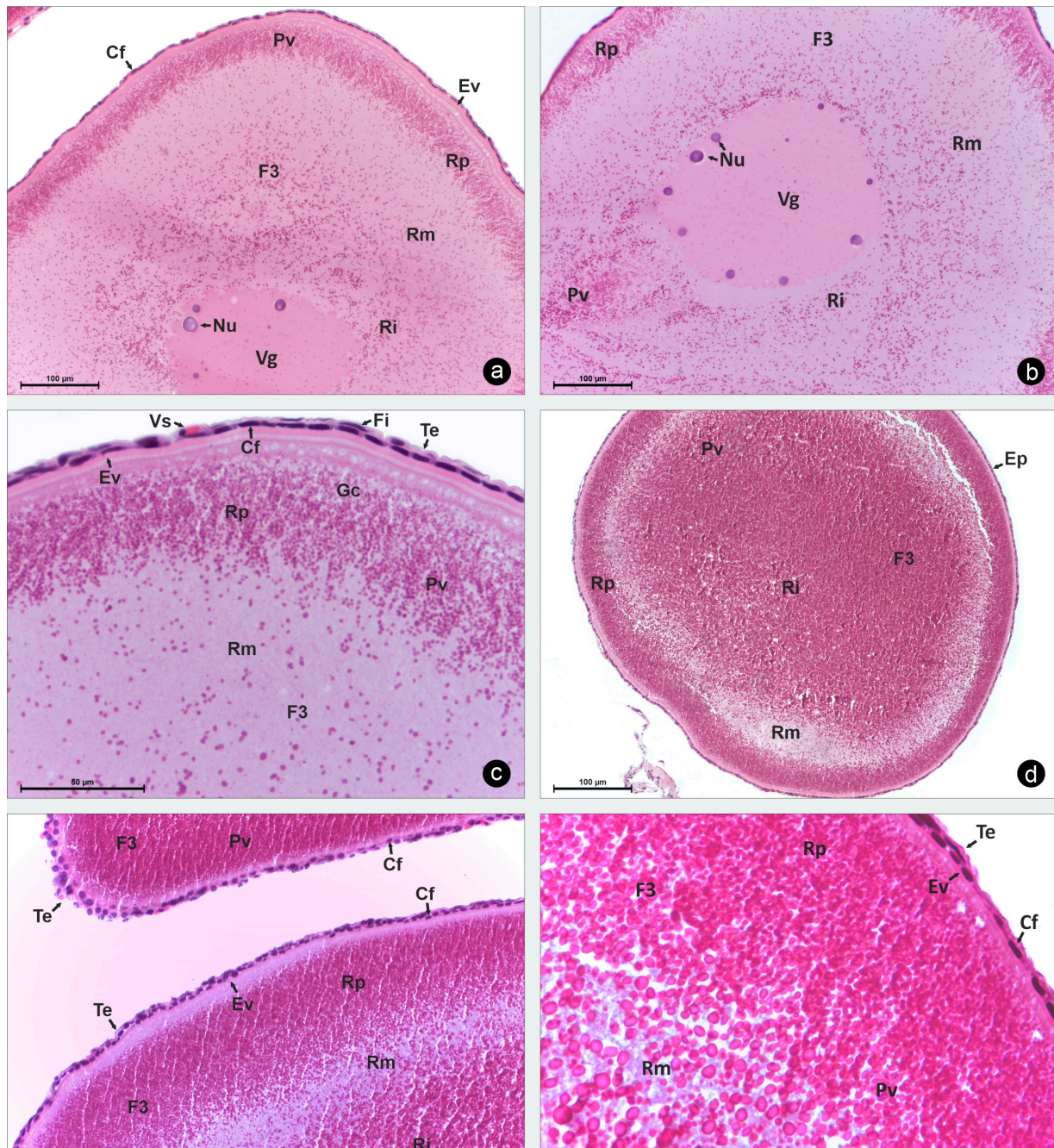


Figure 3. Histological section of ovaries with vitellogenic ovarian follicles of *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorphology of vitellogenic ovarian follicle Type 3 (H-E). (b) Germinal vesicle and cytoplasmic regions of vitellogenic ovarian follicle Type 3 (H-E). (c) Structural components of the cortical region and teca of vitellogenic ovarian follicle Type 3 (H-E). (d) Distribution of vitellin plaquettes in the cytoplasmic regions of the vitellogenic ovarian follicle Type 3 (H-E). (e) Middle and peripheral region of the vitellogenic ovarian follicle Type 3 (H-E). (f) Variation in size and concentration of vitellin plaquettes (H-E). Abbreviations: Follicular Cell (Cf); Epithelium (Ep); Vitelline envelope (Ev); Fibroblast (Fi); Vitellogenic ovarian follicle Type 3 (F3); Nucleolus (Nu); Vitellin Plaquettes (Pv); Internal Region (Ri); Middle Region (Rm); Peripheral Region (Rp); Blood Vessel (Vs); Germinal Vesicle (Vg); Teca (Te). Hematoxylin-Eosin (H-E).

Figura 3. Corte histológico de ovarios con folículos ováricos vitelogénicos de *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorfología de un folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (H-E). (b) Vesícula germinal y regiones citoplasmáticas del folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (H-E). (c) Componentes estructurales de la región cortical y tecas del folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (H-E). (d) Distribución de plaquetas vitelinas en las regiones citoplasmáticas del folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (H-E). (e) Región media y periférica del folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (H-E). (f) Variación en tamaño y concentración de plaquetas vitelinas (H-E). Abreviaturas: Célula Follicular (Cf); Envoltura vitelina (Ev); Epitelio (Ep); Fibroblasto (Fi); Folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (F3); Gránulos Corticales (Gc); Nucléolo (Nu); Plaquetas Vitelinas (Pv); Región Interna (Ri); Región Media (Rm); Región Periférica (Rp); Vaso Sanguíneo (Vs); Vesícula Germinal (Vg); Teca (Te). Hematoxilina-Eosina (H-E).

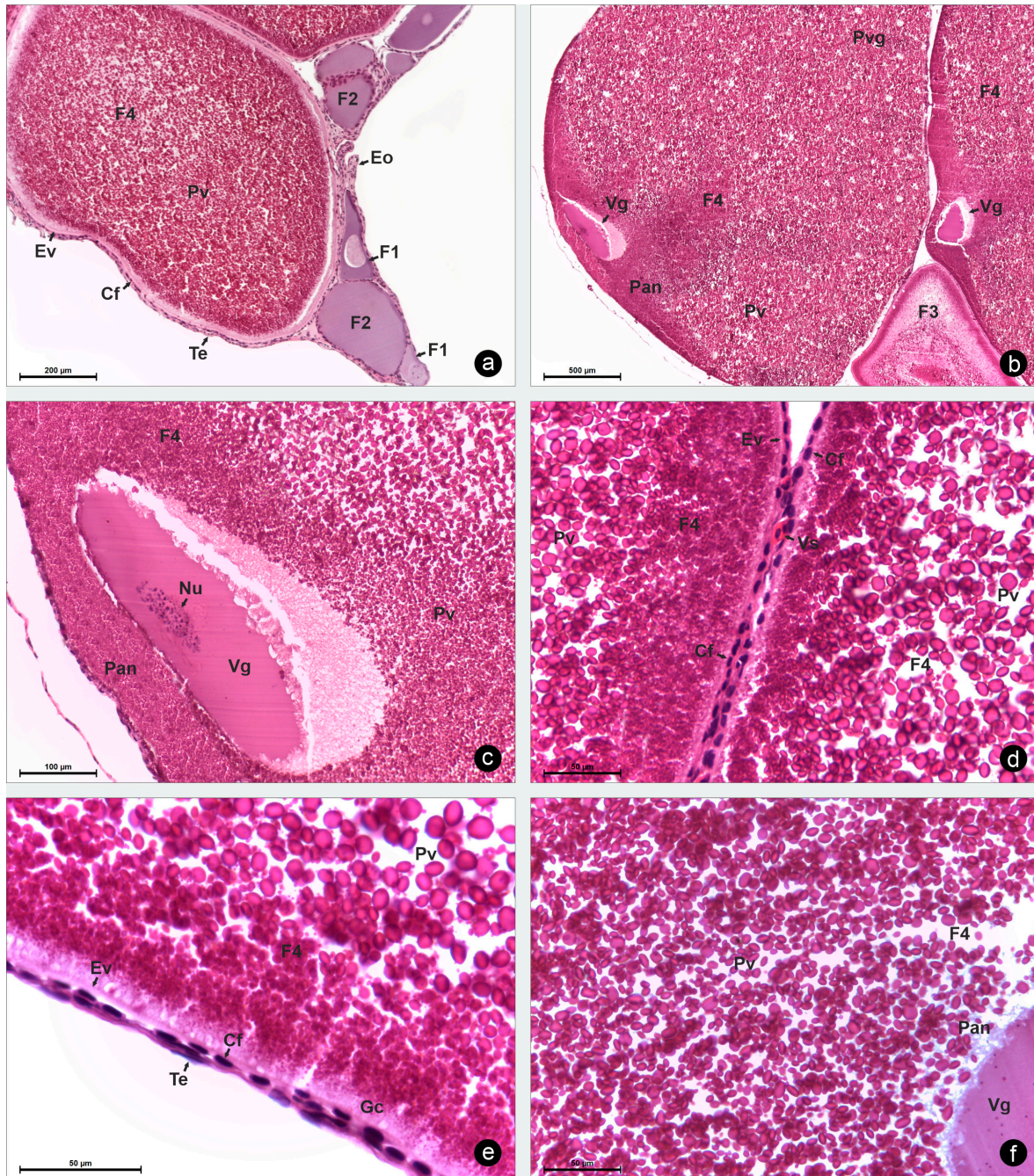


Figure 4. Vitellogenic ovarian follicles of *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorphology of the ovary with different types of ovarian follicles (H-E). (b) Detail of vitellogenic ovarian follicles; (H-E). (c) Animal Pole in vitellogenic ovarian follicle Type 4 (H-E). (d, e) Structural components of the cortical region of vitellogenic ovarian follicle Type 4 (H-E). (f) Vitellin plaquettes and germinal vesicle of vitellogenic ovarian follicle Type 4 (H-E). Abbreviations: Follicular Cell (Cf); Ovaric Stroma (Eo); Vitelline envelope (Ev); Previtellogenic ovarian follicle Type 1 (F1); Previtellogenic ovarian follicle Type 2 (F2); Vitellogenic ovarian follicle Type 3 (F3); Vitellogenic ovarian follicle Type 4 (F4); Cortical Granules (Gc); nucleolus (Nu); Vitellin Plaquettes (Pv); Animal Pole (Pan); Vegetative Pole (Pvg); Teca (Te); Germinal Vesicle (Vg); Blood vessel (Vs). Hematoxylin-Eosin (H-E).

Figura 4. Folículos ováricos vitelogénicos de *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorfología del ovario con diferentes tipos de folículos ováricos; (H-E). (b) Detalle de folículos ováricos vitelogénicos; (H-E). (c) Polo animal en folículo ovárico vitelogénico Tipo 4; (H-E). (d, e) Componentes estructurales de la región cortical del folículo ovárico vitelogénico Tipo 4 (H-E). (f) Plaquetas vitelinas y vesícula germinal del folículo ovárico vitelogénico Tipo 4; (H-E). Abreviaturas: Célula Folicular (Cf); Envoltura Vitelina (Ev); Estroma Ovárico (Eo); Folículo ovárico previtelogénico Tipo 1 (F1); Folículo ovárico previtelogénico Tipo 2 (F2); Folículo ovárico vitelogénico Tipo 3 (F3); Folículo ovárico vitelogénico Tipo 4 (F4); Gránulos Corticales (Gc); Nucleolo (Nu); Plaquetas Vitelinas (Pv); Polo Animal (Pan); Polo Vegetativo (Pvg), Teca (Te); Vaso Sanguíneo (Vs); Vesícula Germinal (Vg). Hematoxilina-Eosina (H-E).

OVIDUCTO

En los especímenes analizados, el desarrollo del oviducto está relacionado con el desarrollo del ovario, se observan ovarios con oocitos maduros preparados para la ovulación, y oviductos preparados para el tránsito de los oocitos y la formación de las cubiertas oocitarias.

El oviducto está formado en toda su extensión por tres túnicas, que se distinguen concéntricamente desde la luz hacia afuera: mucosa, muscular y serosa. La túnica mucosa está constituida por un epitelio con su membrana basal y glándulas tubulares, inmersas en el tejido conectivo, que varían en su desarrollo dependiendo de la zona del oviducto. La túnica muscular varía de grosor y está formada por fibras musculares lisas. Por último, la túnica serosa reviste la parte más externa del oviducto, y está constituida por un epitelio simple y tejido conectivo. Ésta está fijada a la pared por inserciones de tejido conectivo que presentan vasos sanguíneos y nervios.

Con respecto a las zonas del oviducto, la Parte Recta (PR) se diferencia de la Zona Intermedia Proximal (ZIP), porque en esta última comienza el desarrollo del estrato glandular. La Zona Preconvoluta (PPC) y Convoluta (PC) presentan un gran desarrollo de las glándulas, no presentan diferencias relevantes en todo su trayecto y se diferencian porque el sector de la PC presenta asas largas, anchas y de disposición perpendicular al eje del cuerpo. La Zona Convoluta es de corta extensión y finaliza en la última zona del oviducto que corresponde al ovisaco (Os) (Figs. 5a-d).

Túnica Mucosa

En la PR la mucosa se proyecta hacia la luz del ducto en forma de pliegues. El epitelio de revestimiento presenta abundantes células ciliadas, donde se intercalan algunas células caliciformes (Figs. 6a-f). En la ZIP, PPC y la PC el revestimiento epitelial se proyecta como pliegues; en el estrato glandular se observan glándulas túbulo acinosas simples que varían en su desarrollo de acuerdo a las diferentes zonas del oviducto. Las glándulas de la ZIP son cortas mientras que en la PPC y la PC están muy desarrolladas, llegando a ocupar dos tercios del espesor de la mucosa (Figs. 7-12).

En el epitelio de las glándulas, a lo largo del oviducto, se reconocen de cuatro a seis células secretoras, según el grado de actividad que presenten. Éstas se caracterizan por ser cilíndricas, con un núcleo heterocromático desplazado hacia el citoplasma basal de la célula debido a la gran cantidad de secreción acumulada en la región media de la misma. Las glándulas están separadas

por delgados tabiques interglandulares de tejido conectivo formado por fibras de colágena, fibroblastos y abundantes vasos sanguíneos de pequeño calibre que se anastomosan formando dos plexos: el superficial, el submucoso e interglandular (Figs. 8e, f). Los glicoconjugados presentes en los diferentes tipos glandulares a lo largo de oviducto se sintetizaron en la Tabla 2.

Parte recta (PR)

Esta región presenta una delgada mucosa constituida por un epitelio pseudoestratificado formado por: células cilíndricas ciliadas, células caliciformes y células basales cúbicas con núcleo eucromático. En el sector próximo a la ZIP, la mucosa presenta glándulas tubulares cortas con contenidos de tipo 3a, 3b y 4c. Esto indicaría células secretoras con gran cantidad de glicoconjugados con residuos sulfatados determinados por la abundancia de biomoléculas con carga negativa y una intensa metacromasia de tipo gama. A lo largo de la mucosa se observan algunas glándulas de tipo 2b, indicando la presencia de glicoproteínas. Las secreciones producidas por los diferentes tipos glandulares son las que forman la primera cubierta oocitaria (Tabla 2).

Externamente a la mucosa se observa una delgada capa muscular formada por dos o tres capas de fibras musculares. Por fuera se observa una gruesa túnica serosa, constituida por un mesotelio formado por un epitelio simple plano acompañado por un tejido conectivo laxo delgado, formada por fibras de colágeno acidófilas de disposición irregular, fibroblastos, macrófagos, células musculares aisladas y vasos sanguíneos (Figs. 6a-f).

Zona Intermedia Proximal (ZIP)

En esta zona de transición la mucosa presenta pliegues más cortos, en relación a los de la PR, y está formada por un epitelio de revestimiento simple constituido por células ciliadas, células secretoras, con contenidos de glicoconjugados ácidos, y células basales. Asimismo, en la ZIP se observa un gran desarrollo de las glándulas tubulares acinares cortas, separadas por delgados tabiques de tejido conectivo. Las células secretoras de las glándulas, que se encuentran cerca de la Parte Recta, presentan glándulas de tipo 1b y 3b con contenidos que reaccionaron positivamente con AB a pH 2,5, lo que indica la presencia de glicoconjugados de tipo mucoproteínas y proteoglicanos que tienen GAG con residuos ácidos carboxilados y o fosfatados. Con AB pH 0,5 y TB a pH 3,4 se observan glándulas de tipo 3a indicando la presencia de proteínas básicas ligantes de grupos iónicos y glándula de tipo 4γ con glicoconjugados con residuos ácidos de tipos sulfatados metacromáticos, que indican los niveles de concentración de estos grupos ácidos. Además,

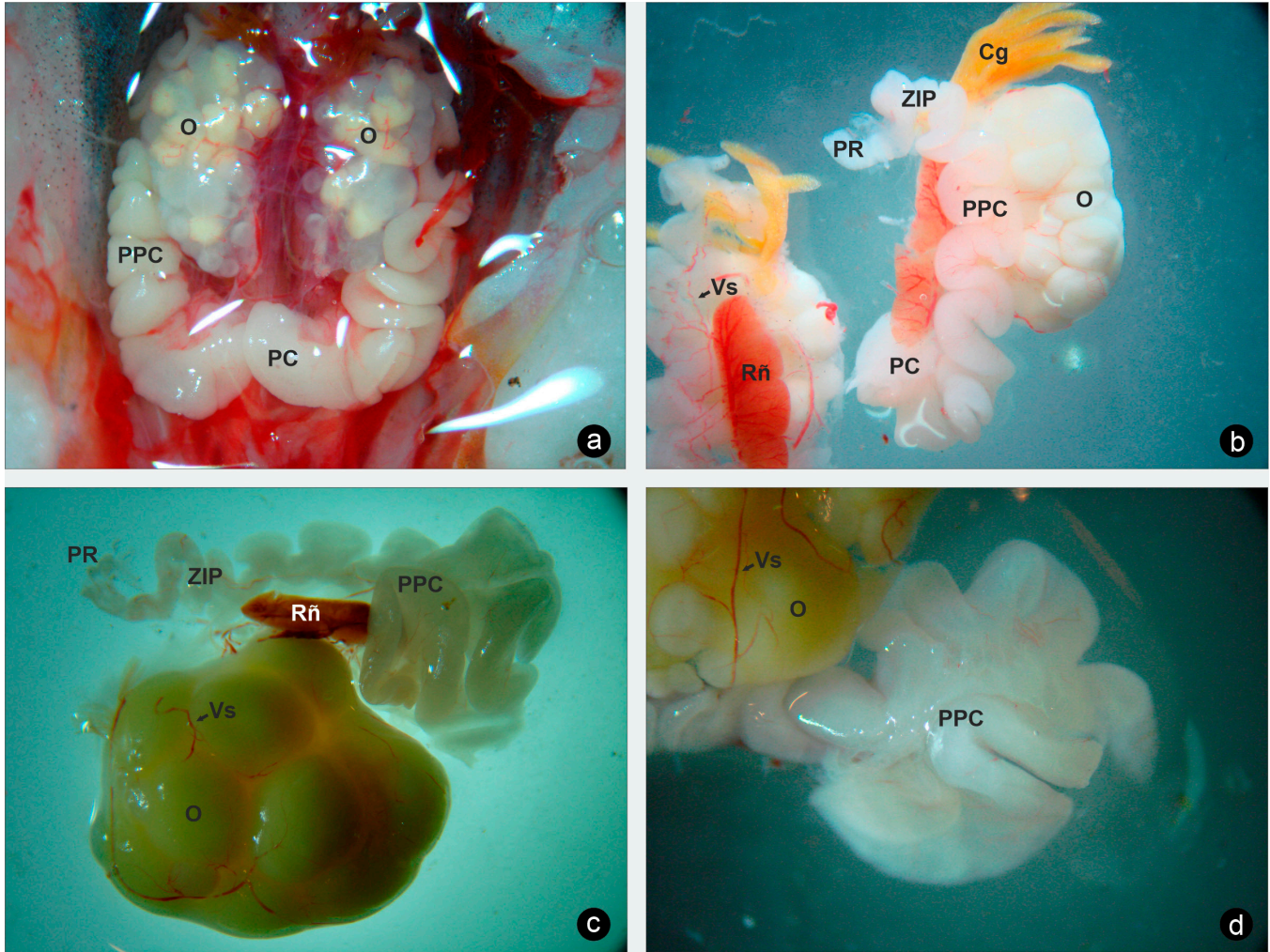
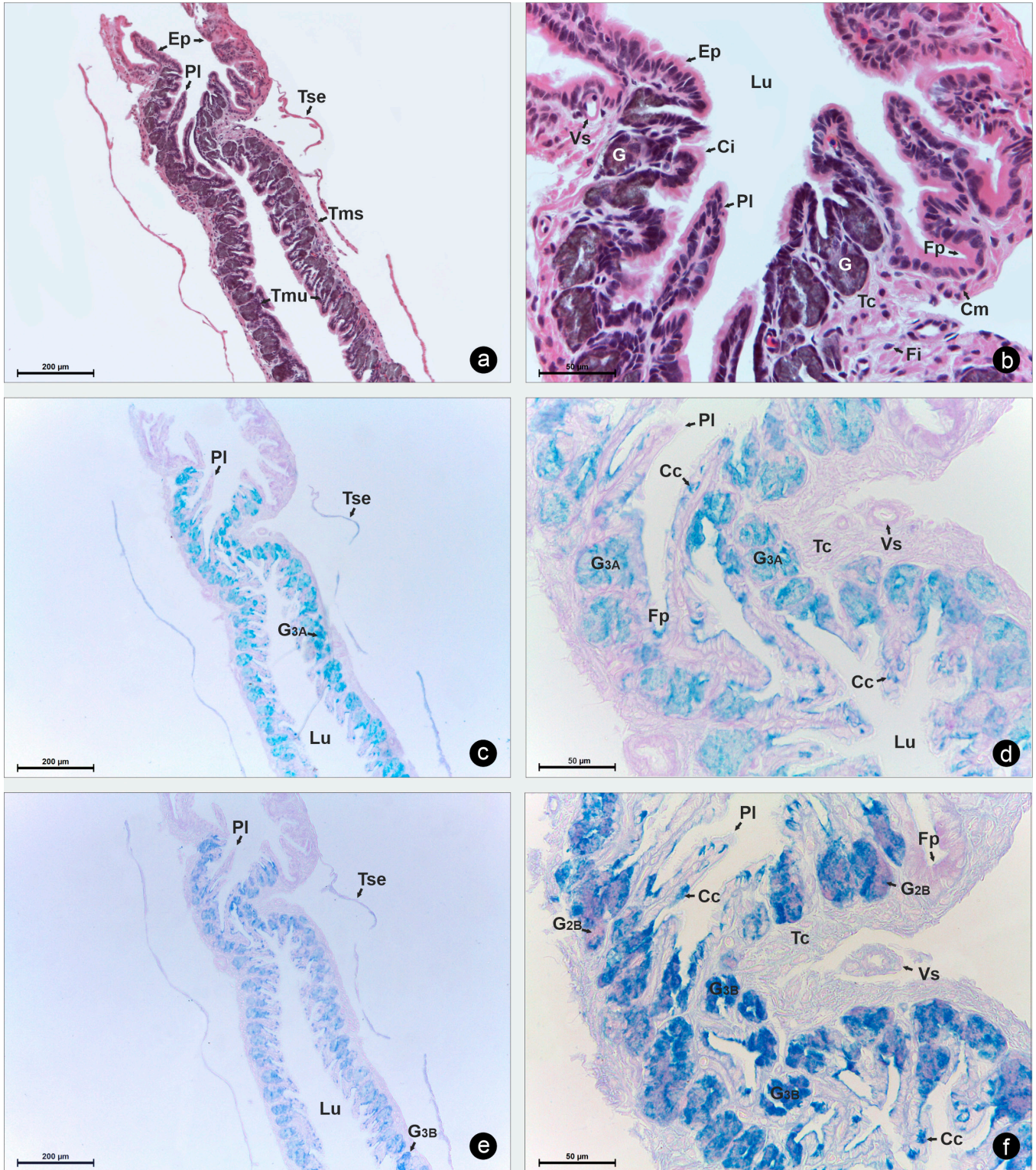


Figure 5. Oviduct macroscopy of *Oreobates discoidalis*. (a) Ventral view of ovaries and oviducts. (b, c, d) Reproductive organs of the female in relation to kidney and fatty body. The different zones of the oviduct are highlighted. Abbreviations: Fat Body (Cg); Ovary (O); Convoluted Part (PC); Preconvoluted Part (PPC); Straight Part (PR); Kidney (Rñ); Blood Vessel (Vs); Proximal Intermediate Zone (ZIP).

Figura 5. Macroscopía del oviducto de *Oreobates discoidalis*. (a) Vista ventral de ovarios y oviductos. (b, c, d) Órganos reproductivos de la hembra en relación con riñón y cuerpo graso. Se destacan las diferentes zonas del oviducto. Abreviaturas: Cuerpo Graso (Cg); Ovario (O); Parte Convoluta (PC); Parte Preconvoluta (PPC); Parte Recta (PR); Riñón (Rñ); Vaso Sanguíneo (Vs); Zona Intermedia Proximal (ZIP).

Figure 6 (Next page). Sagittal section of the straight part of the oviduct (PR) of *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorphology of the tunics of the straight part (H-E). (b) Folds of the glandular epithelium of the straight part (H-E). (c,d) Histochemistry of the straight part and detail of the content of the Type G3A glands (AB pH 0,5-PAS). (e,f) Histochemistry of the straight part and detail of the content of the Type G3B glands (AB pH 2,5-PAS). Abbreviations: Caliciform Cell (Cc); Muscle Cell (Cm); Cilia's (Ci); Epithelium (Ep); Fibroblast (Fi); Fold background (Fp); Gland (G); Gland PAS ++ (G2B); Gland AB pH 0,5 (G3A); Gland AB pH 2,5 (G3B); Lumen (Lu); Fold (Pl); Mucous Tunic (Tmu); Muscle Tunic (Tms); Serous Tunic (Tse); Blood Vessel (Vs); Connective Tissue (Tc). Hematoxylin-Eosin (H-E); Alcian Blue pH 0,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 0,5-PAS); Alcian Blue pH 2,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 2,5-PAS).

Figura 6 (Página siguiente). Corte sagital de la parte recta del oviducto (PR) de *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorfología de las tunicas de la PR (H-E). (b) Pliegues del epitelio glandular de la PR (H-E). (c, d) Histoquímica de la PR y detalle del contenido de las glándulas Tipo G3A (AB pH 0,5-PAS). (e, f) Histoquímica de la PR y detalle del contenido de las glándulas Tipo G3B (AB pH 2,5-PAS). Abreviaturas: Célula Caliciforme (Cc); Célula Muscular (Cm); Cilios (Ci); Epitelio (Ep); Fibroblasto (Fi); Fondo de Pliegue (Fp); Glándula (G); Glándula PAS ++ (G2B); Glándula AB pH 0,5 (G3A); Glándula AB pH 2,5 (G3B); Lumen (Lu); Pliegue (Pl); Túnica Mucosa (Tmu); Túnica Muscular (Tms); Túnica Serosa (Tse); Vaso Sanguíneo (Vs); Tejido Conectivo (Tc). Hematoxilina-Eosina (H-E); Azul Alcian pH 0,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 0,5-PAS); Azul Alcian pH 2,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 2,5-PAS).



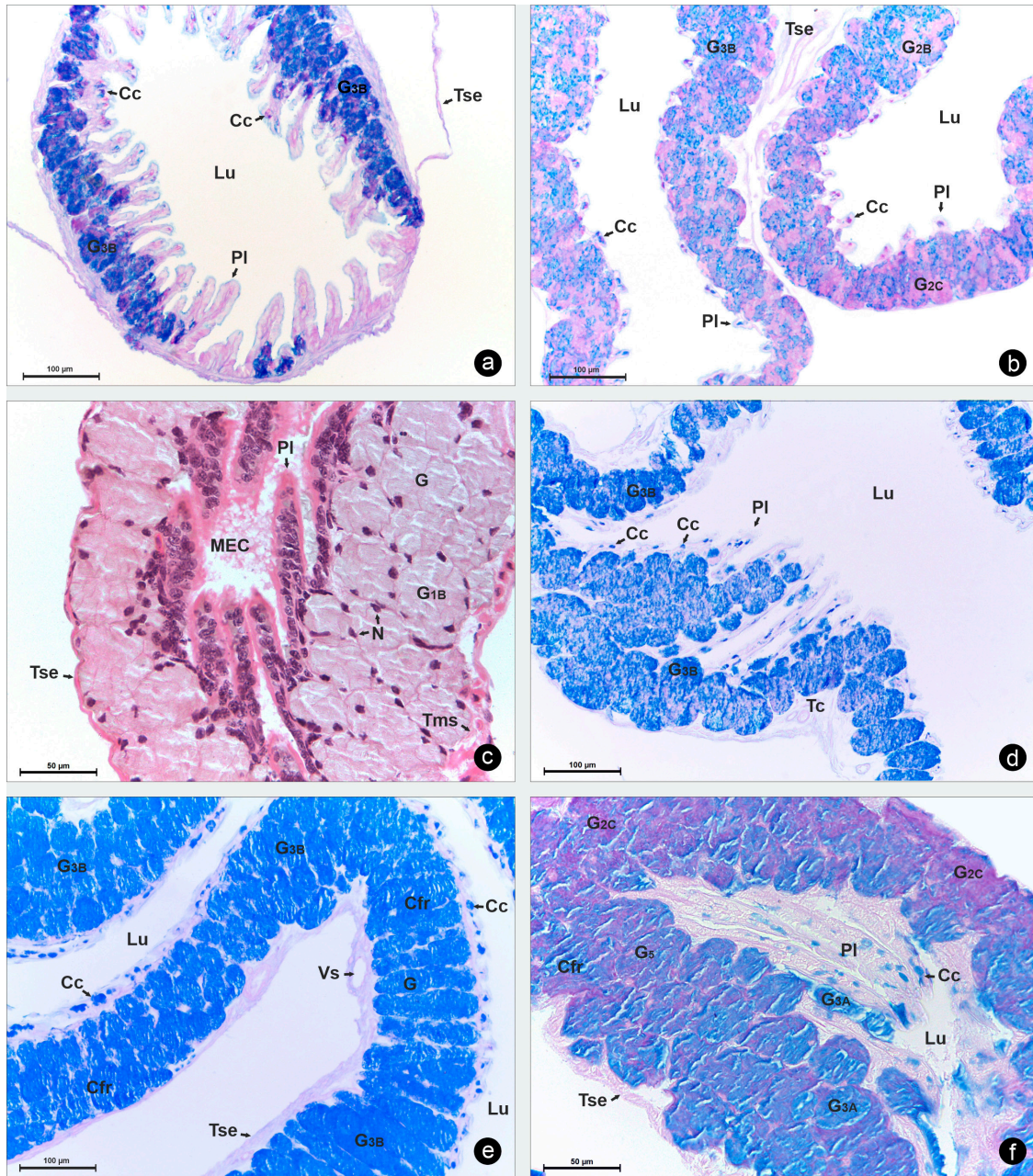


Figure 7. Sagittal section of the proximal intermediate zone (ZIP) of *Oreobates discoidalis*. (a) Histochemical reaction of the anterior part of the ZIP (AB pH 2,5-PAS). (b) Histochemical reaction of the anterior part of the middle zone of the ZIP; (AB pH 2,5-PAS). (c) Histomorphology of the distal zone of the ZIP (H-E). (d) Histochemical reaction of the glands contents of G3B glands of the mucosa of the ZIP (AB pH 2,5-PAS). (e) Histochemical reaction of the glands contents of G3B glands of the mucosa of the ZIP (AB pH 2,5-PAS). (f) Histochemical reaction of the glands contents of G3A glands of the mucosa of the ZIP (AB pH 0,5-PAS). Abbreviations: Caliciform Cell (Cc); Fibrillar Content (Cfr); Gland (G); Gland AB pH 0,5 (G3A); Gland AB pH 2,5 (G3B); Gland Eosin (G1B); Gland Mixed (G5); Gland PAS ++ (G2B); Gland PAS +++ (G2C); Lumen (Lu); Fold (PI); Muscle Tunic (Tms); Serous Tunic (Tse); Extracellular Matrix (MEC); Nucleus (N); Connective Tissue (Tc); Blood Vessel (Vs). Hematoxylin-Eosin (H-E); Alcian Blue pH 0,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 0,5-PAS); Alcian Blue pH 2,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 2,5-PAS).

Figura 7. Corte sagital de la zona intermedia proximal (ZIP) de *Oreobates discoidalis*. (a) Reacción histoquímica de la parte anterior de la ZIP (AB pH 2,5-PAS). (b) Reacción histoquímica de la zona media de la ZIP (AB pH 2,5-PAS). (c) Histomorfología de la zona distal de la ZIP (H-E). (d) Reacción histoquímica de las glándulas G3B de la mucosa de la ZIP (AB pH 2,5-PAS). (e) Reacción histoquímica de los contenidos de las glándulas G3B de la ZIP (AB pH 2,5-PAS). (f) Reacción histoquímica de los contenidos de las glándulas G3A de la ZIP (AB pH 0,5-PAS). Abreviaturas: Célula Caliciforme (Cc); Contenido Fibrilar (Cfr); Glándula (G); Glándula AB pH 0,5 (G3A); Glándula AB pH 2,5 (G3B); Glándula Eosina (G1B); Glándula Mixta (G5); Glándula PAS ++ (G2B); Glándula PAS +++ (G2C); Lumen (Lu); Pliegue (PI); Túnica Muscular (Tms); Matriz Extracelular (MEC); Núcleo (N); Tejido Conectivo (Tc); Túnica Serosa (Tse); Vaso Sanguíneo (Vs). Hematoxilina-Eosina (H-E); Azul Alcian pH 0,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 0,5-PAS); Azul Alcian pH 2,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 2,5-PAS).

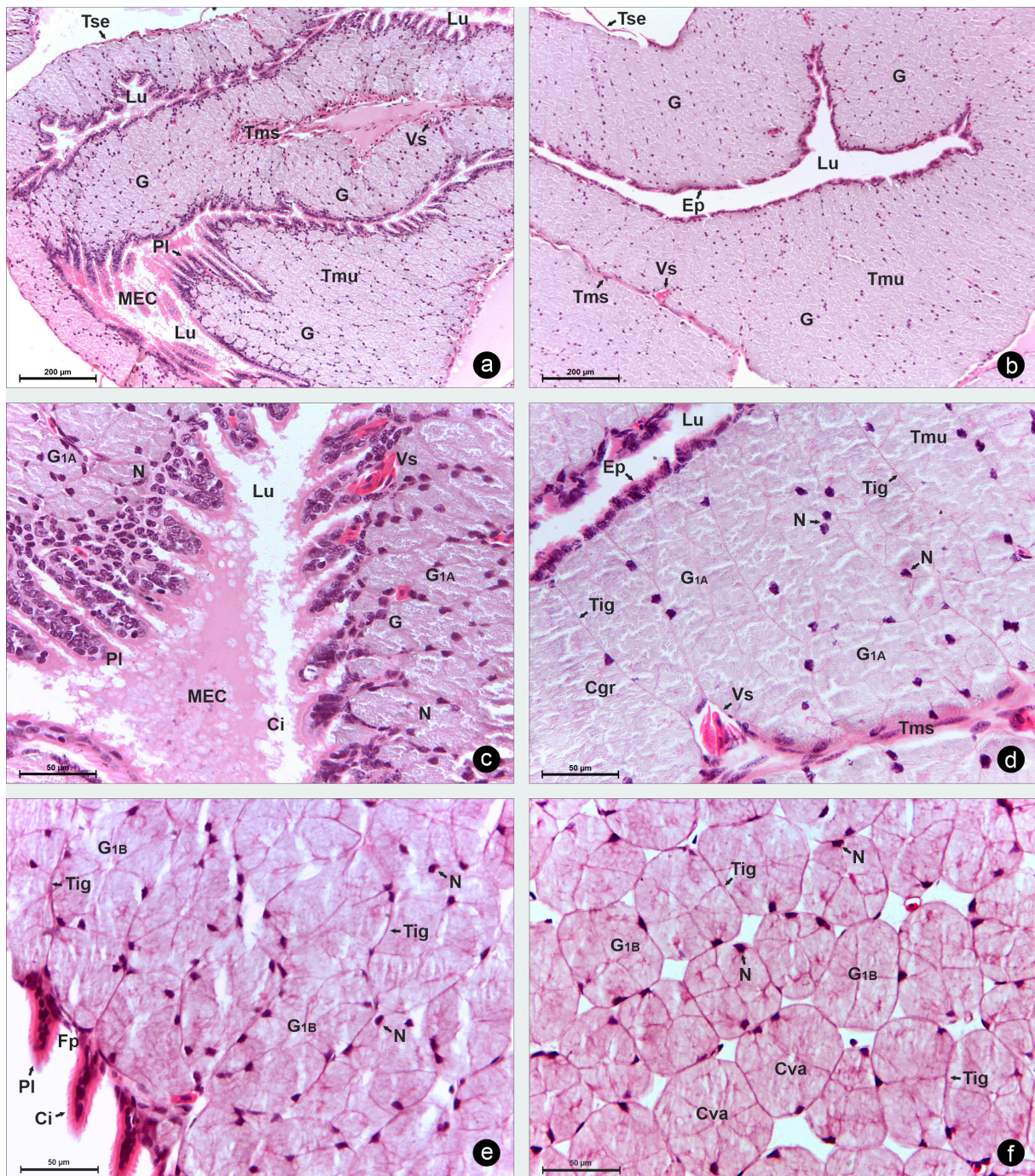


Figure 8. Sagittal section of the preconvoluted part (PPC) of *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorphology of the PPC (H-E). (b) Structural components of the PPC (H-E). (c) Detail of the folds of the mucosa and extracellular matrix (H-E). (d) Parenchyma and organization of glandular contents (H-E). (e) Detail of the lining epithelium and Mucosa (H-E). (f) Detail of glandular acini and organization of their contents (H-E). Abbreviations: Cilios (Ci); Granular Content (Cgr); Vacuolar Content (Cva); Epithelium (Ep); Fold background (Fp); Gland (G); Gland Eosin (G1B); Gland Hematoxylin (G1A); Lumen (Lu); Matrix Extracellular (MEC); Nucleus (N); Fold (PI); Mucosa Tunic (Tmu); Muscle Tunic (Tms); Serous Tunic (Tse); Interglandular Septum (Tig); Blood Vessel (Vs). Hematoxylin-Eosin (H-E).

Figura 8. Corte sagital de la parte preconvoluta (PPC) de *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorfología de la PPC (H-E). (b) Componentes estructurales de la PPC (H-E). (c) Detalle de los pliegues de la mucosa y matriz extracelular (H-E). (d) Parénquima y organización de los contenidos glandulares (H-E). (e) Detalle del epitelio de revestimiento y la mucosa (H-E). (f) Detalle de acinos glandulares y organización de sus contenidos (H-E). Abreviaturas: Cilios (Ci); Contenido Granular (Cgr); Contenido Vacuolar (Cva); Epitelio (Ep); Fondo de Pliegue (Fp); Glándula (G); Glándula Eosina (G1B); Glándula Hematoxilina (G1A); Lumen (Lu); Matriz Extracelular (MEC); Núcleo (N); Pliegue (PI); Túnica Mucosa (Tmu); Túnica Muscular (Tms); Túnica Serosa (Tse); Tabique Interglandular (Tig); Vaso Sanguíneo (Vs). Hematoxilina-Eosina (H-E).

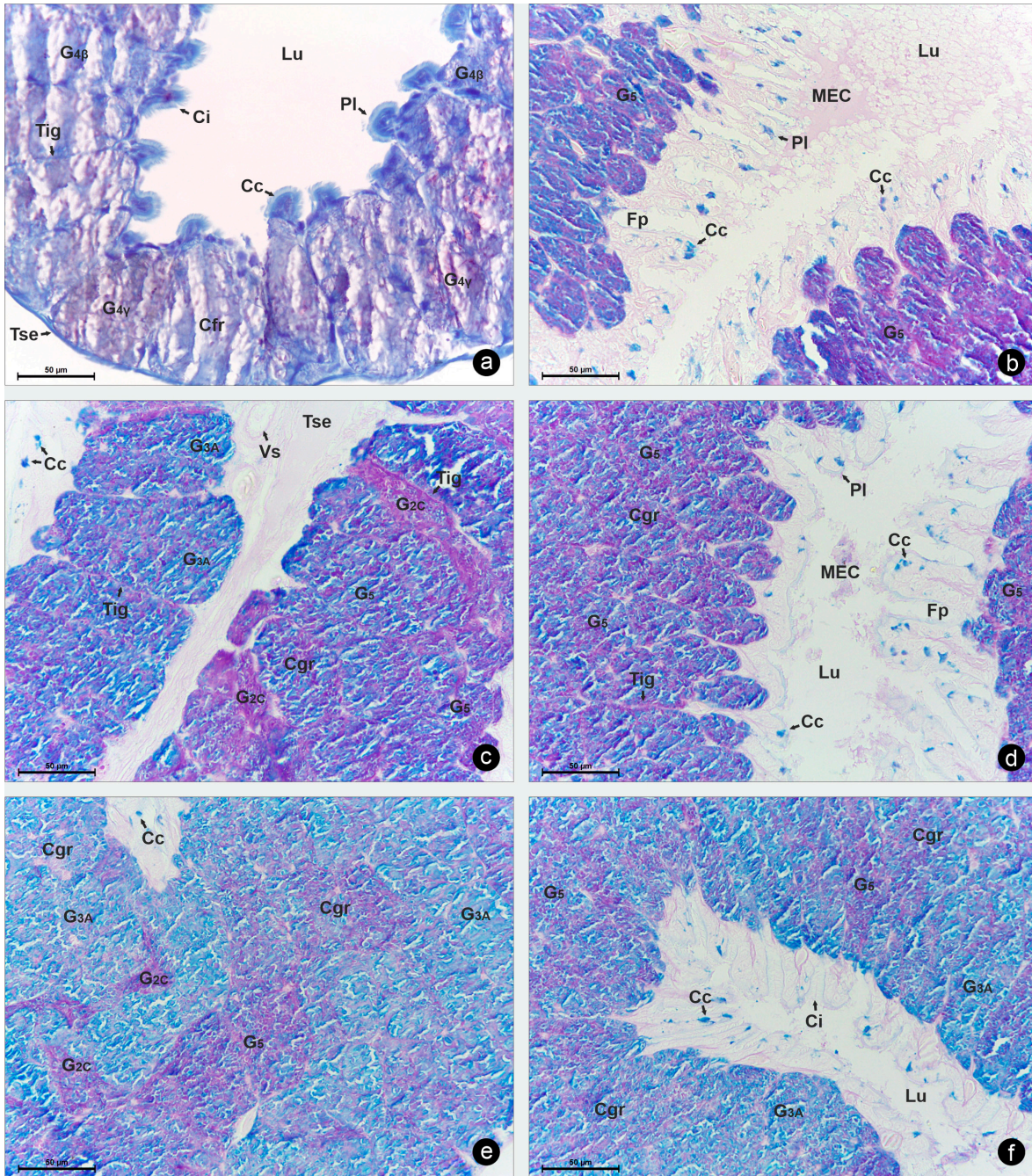


Figure 9. Histochemistry of the preconvoluted part (PPC) of *Oreobates discoidalis*. (a) Structural components of the wall and metachromasia of the glandular acini (TB pH 3,6). (b) Histochemistry of the mucosa and extracellular matrix (AB pH 0,5-PAS). (c) Histochemistry of the glandular layer (AB pH 0,5-PAS). (d) Histochemistry of the apical area of the mucosa and the extracellular matrix (AB pH 0,5-PAS). (e,f) Mucosa histochemistry and organization of gland contents (AB pH 0,5-PAS). Abbreviations: Caliciform Cell (Cc); Cilio (Ci); Fibrillar Content (Cfr); Granular Content (Cgr); Fold Background (Fp); Gland AB pH 0,5 (G3A); Gland Mixed (G5); Gland PAS +++ (G2C); Gland TB Beta (G4β); Gland TB Gama (G4γ); Lumen (Lu); Extracellular Matrix (MEC); Fold (PI); Interglandular Septum (Tig); Serous Tunic (Tse); Blood Vessel (Vs). Toluidin Blue pH 3,6 (TB pH 3,6); Alcian Blue pH 0,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 0,5-PAS).

Figura 9. Histoquímica de la parte preconvoluta (PPC) de *Oreobates discoidalis*. (a) Componentes estructurales de la pared y metacromasia de los acinos glandulares (TB pH 3,6). (b) Histoquímica de la mucosa y matriz extracelular; (AB pH 0,5-PAS). (c) Histoquímica del estrato glandular (AB pH 0,5-PAS). (d) Histoquímica del área apical de la mucosa y de la matriz extracelular (AB pH 0,5-PAS). (e,f) Histoquímica de la mucosa y organización de los contenidos de las glándulas (AB pH 0,5-PAS). Abreviaturas: Célula Caliciforme (Cc); Cilios (Ci); Contenido Fibrilar (Cfr); Contenido Granular (Cgr); Fondo de Pliegue (Fp); Glándula AB pH 0,5 (G3A); Glándula Mixta (G5); Glándula PAS +++ (G2C); Glándula TB Beta (G4β); Glándula TB Gama (G4γ); Lumen (Lu); Matriz Extracelular (MEC); Pliegue (PI); Tabique Interglandular (Tig); Túnica Serosa (Tse); Vaso Sanguíneo (Vs). Azul de Toluidina pH 3,6 (TB pH 3,6); Azul Alcian pH 0,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 0,5-PAS).

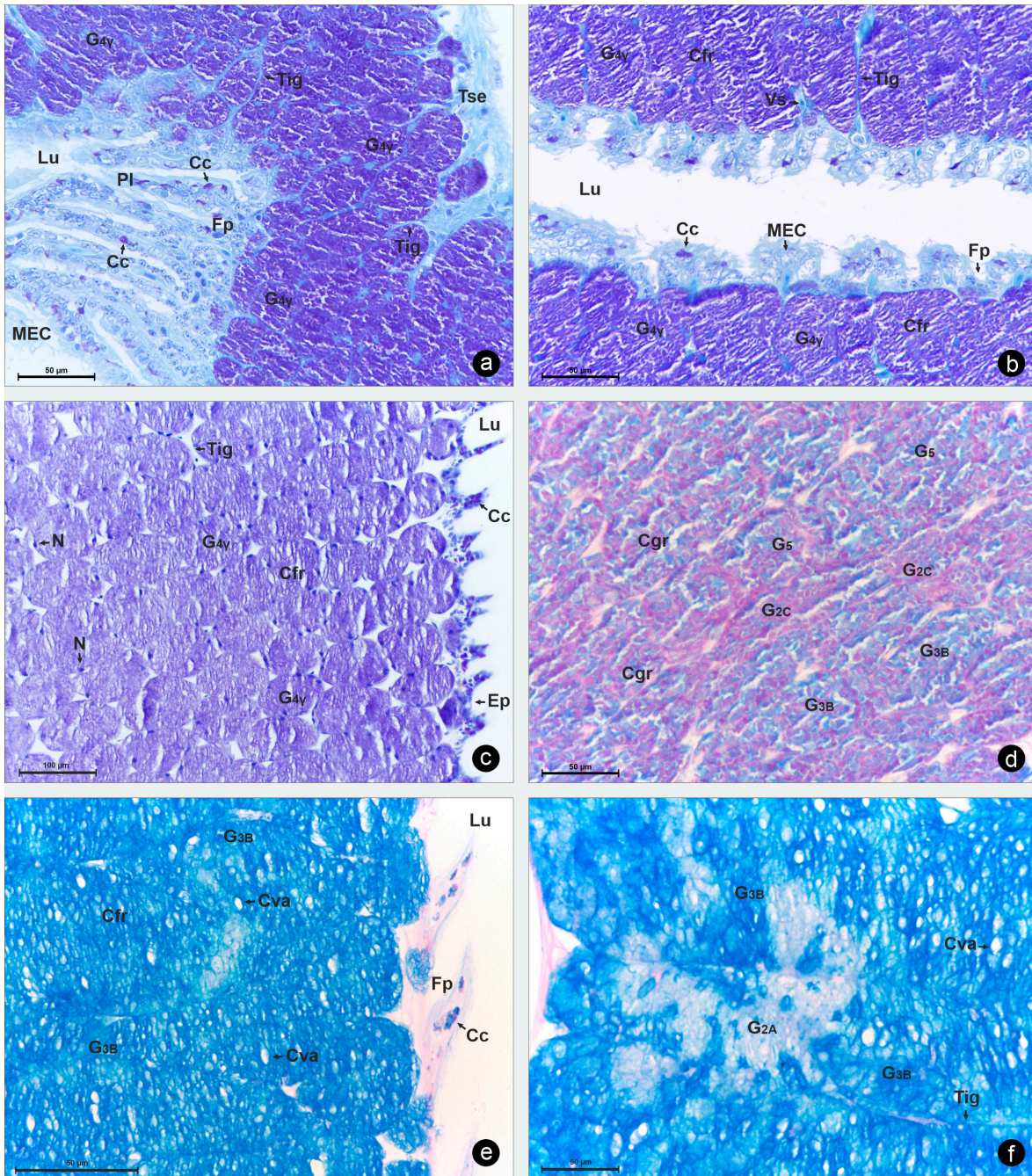


Figure 10. Histochemistry of the preconvoluted part (PPC) of *Oreobates discoidalis*. (a, b, c) Metachromasia reaction of the lining epithelium and glands (TB pH 3,6). (d) Histochemistry and organization of the contents of the glandular acini of the mid-mucosal region; (AB pH 2,5-PAS). (e, f) Histochemistry and organization of gland contents (AB pH 2,5-PAS). Abbreviations: Caliciform Cell (Cc); Fibrillar Content (Cfr); Granular Content (Cgr); Vacuolar Content (Cva); Epithelium (Ep); Fold Background (Fp); Gland AB pH 2,5 (G3B); Gland Mixed (G5); Gland PAS + (G2A); Gland PAS +++ (G2C); Gland TB Gama (G4γ); Lumen (Lu), Extracellular Matrix (MEC); Nucleus (N); Fold (PI); Interglandular Septum (Tig); Serous Tunic (Tse); Blood Vessel (Vs). Toluidin Blue pH 3,6 (TB pH 3,6); Alcian Blue pH 2,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 2,5-PAS).

Figura 10. Histoquímica de la parte preconvoluta (PPC) de *Oreobates discoidalis*. (a, b, c) Reacción de metacromasia del epitelio de revestimiento y glándulas (TB pH 3,6). (d) Histoquímica y organización de los contenidos de los acinos glandulares de la región media de la mucosa (AB pH 2,5-PAS). (e, f) Histoquímica y organización de los contenidos de las glándulas (AB pH 2,5-PAS). Abreviaturas: Célula Caliciforme (Cc); Contenido fibrilar (Cfr); Contenido Granular (Cgr); Contenido Vacuolar (Cva); Epitelio (Ep); Fondo de Pliegue (Fp); Glándula AB pH 2,5 (G3B); Glándula Mixta (G5); Glándula PAS + (G2A); Glándula PAS +++ (G2C); Glándula TB Gama (G4γ); Lumen (Lu), Matriz Extracelular (MEC); Núcleo (N); Pliegue (PI); Tabique Interglandular (Tig); Túnica Serosa (Tse); Vaso Sanguíneo (Vs). Azul de Toluidina pH 3,6 (TB pH 3,6); Azul Alcian pH 2,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 2,5-PAS).

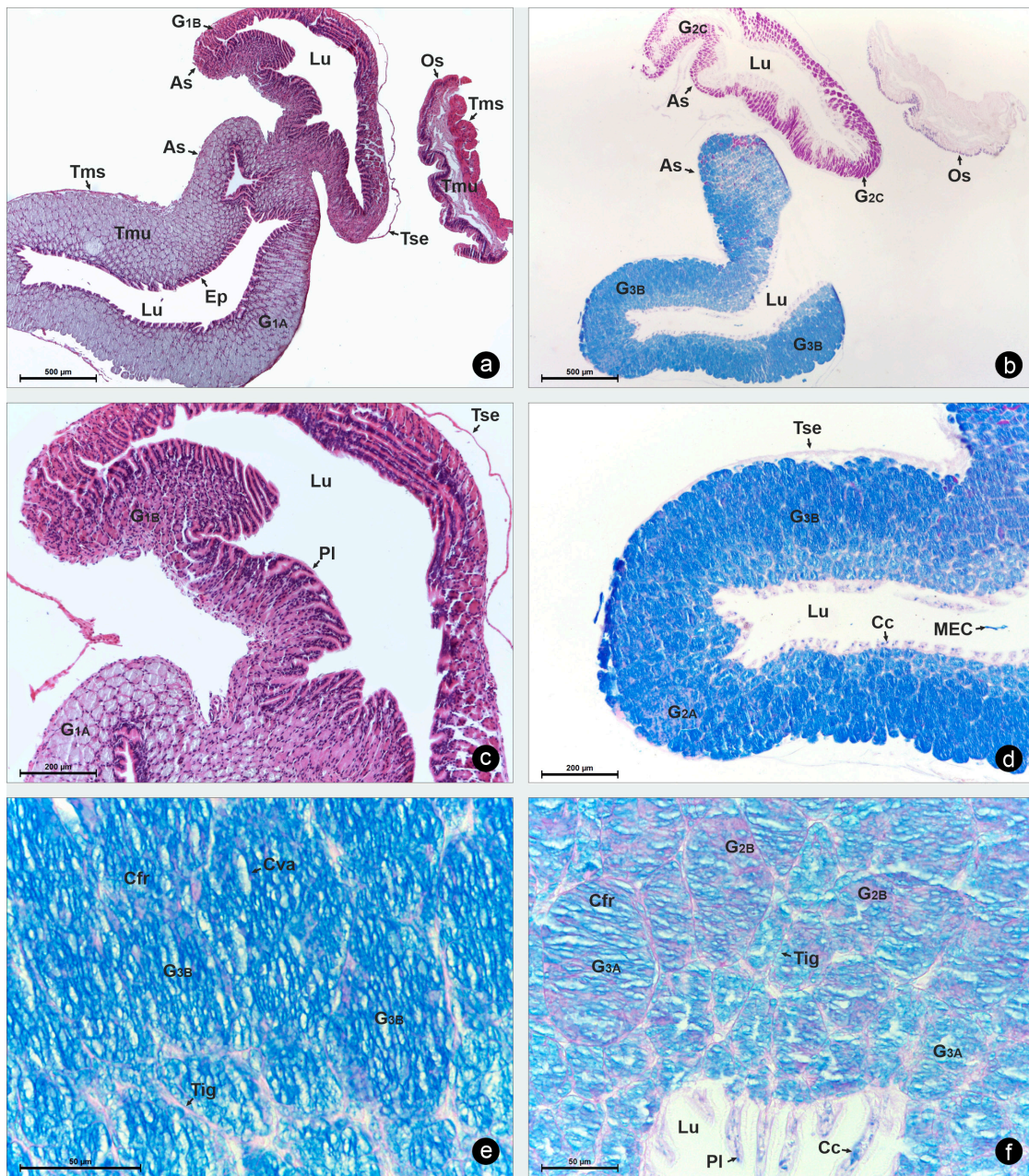


Figure 11. Sagittal section of the convoluted part (PC) of *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorphology of the PC and ovisac (H-E). (b) Histochemistry of the PC and ovisac; (AB pH 2,5-PAS). (c) Histomorphology of the last asa of the PC (H-E). (d) Histochemistry of the first handle of the PC; (AB pH 2,5-PAS). (e) Organization of the contents of the glandular acini; (AB pH 2,5-PAS). (f) Histochemistry and organization of the contents of the epithelium and glands; (AB pH 0,5-PAS). Abbreviations: Handles (As); Caliciform Cell (Cc); Fibrillar Content (Cfr); Granular Content (Cgr); Vacuolar Content (Cva); Epithelium (Ep); Gland AB pH 0,5 (G3A); Gland AB pH 2,5 (G3B); Gland Eosin (G1B); Gland Hematoxylin (G1A); Gland PAS + (G2A); Gland PAS ++ (G2B); Gland PAS +++ (G2C); Lumen (Lu), Extracellular Matrix (MEC); Ovisac (Os); Fold (PI); Interglandular Septum (Tig); Mucous Tunic (Tmu); Muscle Tunic (Tms), Serous Tunic (Tse). Hematoxylin-Eosin (H-E); Alcian Blue pH 0,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 0,5-PAS); Alcian Blue pH 2,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 2,5-PAS).

Figura 11. Corte sagital de la parte convoluta (PC) de *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorfología de las asas de la PC y ovisaco (H-E). (b) Histoquímica de la PC y ovisaco (AB pH 2,5-PAS). (c) Histomorfología de la última asa de la PC (H-E). (d) Histoquímica de la primera asa de la PC (AB pH 2,5-PAS). (e) Organización de los contenidos de los ácinos glandulares (AB pH 2,5-PAS). (f) Histoquímica y organización de los contenidos del epitelio y las glándulas (AB pH 0,5-PAS). Abreviaturas: Asas (As); Célula Caliciforme (Cc); Contenido fibrilar (Cfr); Contenido Granular (Cgr); Contenido Vacuolar (Cva); Epitelio (Ep); Glándula AB pH 0,5 (G3A); Glándula AB pH 2,5 (G3B); Glándula Eosina (G1B); Glándula Hematoxilina (G1A); Glándula PAS + (G2A); Glándula PAS ++ (G2B); Glándula PAS +++ (G2C); Lumen (Lu), Matriz Extracelular (MEC); Ovisaco (Os); Pliegue (PI); Tabique Interglandular (Tig); Túnica Mucosa (Tmu); Túnica Muscular (Tms), Túnica Serosa (Tse). Hematoxilina-Eosina (H-E); Azul Alcian pH 0,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 0,5-PAS); Azul Alcian pH 2,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 2,5-PAS).

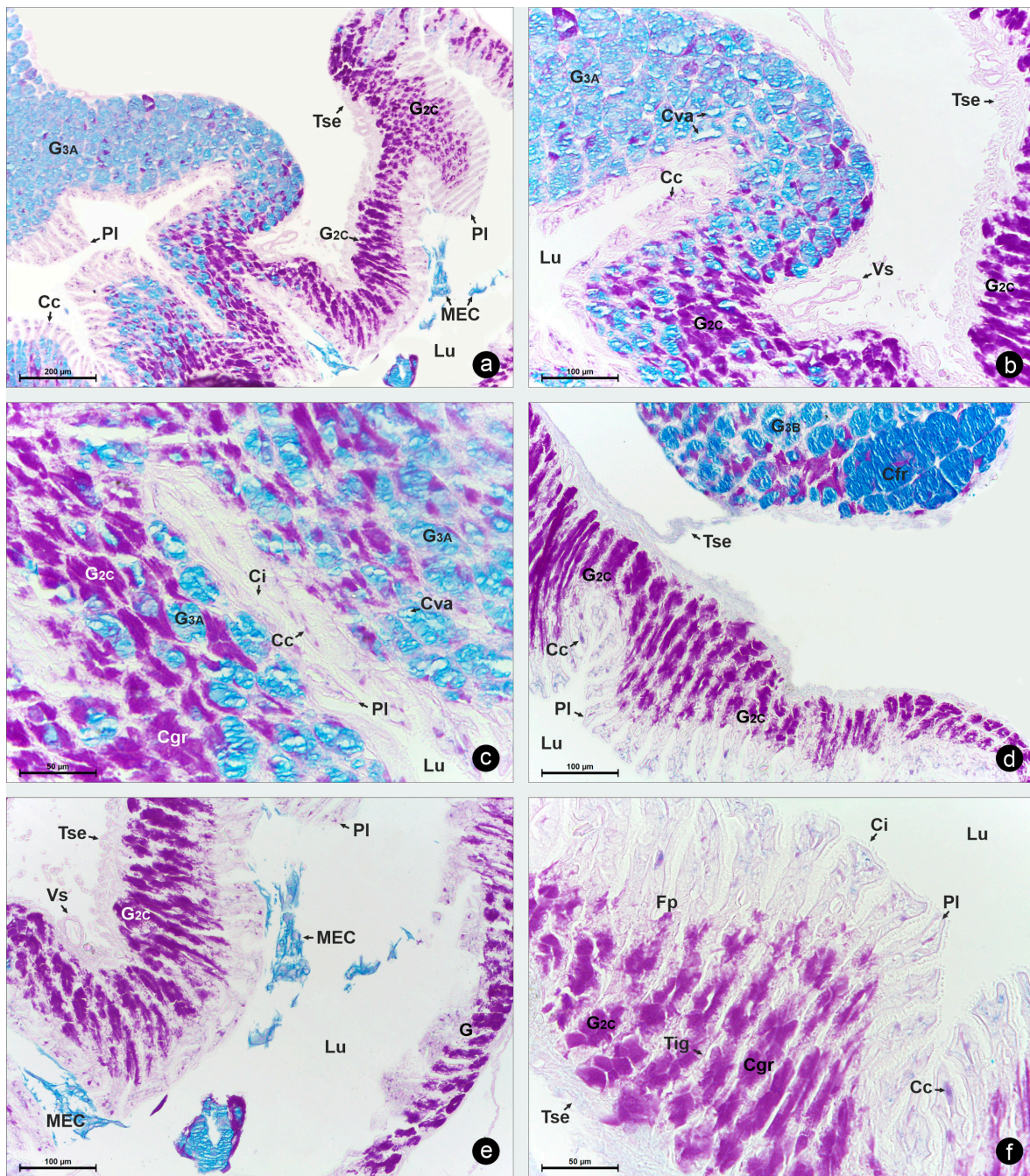


Figure 12. Sagittal section of the convoluted part (PC) of *Oreobates discoidalis*. (a, b) Histochemistry of the transition zone of the PC (AB pH 0,5-PAS). (c) Histochemistry and organization of the contents of the mucosal glands (AB pH 0,5-PAS). (d) Histochemistry of the PC (AB pH 2,5-PAS). (e) Histochemistry of the mucosa and extracellular matrix (AB pH 0,5-PAS). (f) Histochemistry of the epithelium and organization of cell contents (AB pH 2,5-PAS). Abbreviations: Caliciform Cell (Cc); Cilia (Ci); Granular Content (Cgr); Fibrillar Content (Cfr); Vacuolar Content (Cva); Fold Background (Fp); Gland (G); Gland AB pH 0,5 (G3A); Gland AB pH 2,5 (G3B); Gland PAS +++ (G2C); Lumen (Lu), Extracellular Matrix (MEC); Fold (PI); Interglandular Septum (Tig); Serous Tunic (Tse); Blood Vessel (Vs). Alcian Blue pH 0,5- Periodic Acid Schiff (AB pH 0,5-PAS); Alcian Blue pH 2,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 2,5-PAS).

Figura 12. Corte sagital de la parte convoluta (PC) de *Oreobates discoidalis*. (a, b) Histoquímica de la zona de transición de la PC (AB pH 0,5-PAS). (c) Histoquímica y organización de los contenidos de las glándulas de la mucosa (AB pH 0,5-PAS). (d) Histoquímica de diferentes asas de la PC (AB pH 2,5-PAS). (e) Histoquímica de la mucosa y matriz extracelular (AB pH 0,5-PAS). (f) Histoquímica del epitelio y organización de los contenidos celulares (AB pH 2,5-PAS). Abreviaturas: Célula Caliciforme (Cc); Cilios (Ci); Contenido Granular (Cgr); Contenido Fibrilar (Cfr); Contenido Vacuolar (Cva); Fondo de Pliegue (Fp); Glándula (G); Glándula AB pH 0,5 (G3A); Glándula AB pH 2,5 (G3B); Glándula PAS +++ (G2C); Lumen (Lu), Matriz Extracelular (MEC); Pliegue (PI); Tabique Interglandular (Tig); Túnica Serosa (Tse); Vaso Sanguíneo (Vs). Azul Alcian pH 0,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 0,5-PAS); Azul Alcian pH 2,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 2,5-PAS).

se observan algunos sectores con glándulas de tipo 2c con mucoproteínas neutras muy polimerizadas y glándulas de tipo 5 con contenidos mixtos ácidos y neutros. Los contenidos glandulares, de aspecto fibrilar y vacuolado, comprimen al núcleo de las células secretoras dándole una forma alargada. En el lumen de esta región se observa una importante matriz extracelular formada a partir de la secreción de los diferentes contenidos glandulares (Figs. 7a-f) (Tabla 2).

Parte Preconvoluta (PPC)

Esta zona se caracteriza por el gran desarrollo del estrato glandular. Las glándulas, de mayor longitud con respecto a las glándulas de la ZIP, están cargadas de contenidos que en algunos sectores comprimen el epitelio disminuyendo la longitud de los pliegues. El contenido glandular se libera en la región situada entre los pliegues (Figs. 8a, c). Las células secretoras de las glándulas presentan forma de prismas hexagonales con un núcleo basal aplanado (Figs. 8b, d, e, f).

En la PPC, las células caliciformes, que conforman la glándula, son metacromáticas y AB positivas, lo que indica que elaboran mucinas con residuos sulfatados. En el parénquima glandular los contenidos ácidos son determinados por la reacción con TB pH 3,6 de las glándulas de tipo 4γ con glicoconjugados con residuos sulfatados y las glándulas de tipo 3a y 3b reactivas con AB a pH 0,5 y 2,5, indicando la presencia de glicoconjugados con residuos ácidos de tipos sulfatados, carboxilados y fosfatados (Figs. 9a, c, e, f; 10 a-f).

Numerosas asas con glándulas de tipo 5 muestran un mosaico de contenidos, con una secreción central de aspecto granular grueso PAS positiva que indica la presencia de mucoproteínas neutras muy polimerizadas y externamente una secreción amorfa AB positivas con glicoconjugados ácidos. Ambos contenidos describen una trayectoria laberíntica tanto PAS como AB positiva, observándose en algunas glándulas la superposición de contenidos dando un color morado intenso (Figs. 9b, d-f). Entre los contenidos mixtos y alcianófilos se observan algunas glándulas de tipo 2c con mucoproteínas neutras muy polimerizadas (Fig. 9c; 10d). También, se observan asas con glándulas cargadas de contenidos ácidos, las cuales rodean vacuolas de glicolípidos que se organizan en forma uni o multilocular, estos contenidos tienen una distribución desordenada en el adenómero (Figs. 10e, f).

Parte Convoluta (PC)

En esta zona se observan glándulas de tipo 1, 2 y 3 cuyos contenidos intracelulares presentan una organización de naturaleza fibrilar

y granular basófilo (Fig. 11). En las primeras asas se observan glándulas de tipo 1a, 2 y 3 con contenidos de proteoglicanos con residuos ácidos, principalmente carboxilados y sialilados, con una organización de tipo fibrilar en las cuales se visualiza fibras paralelas basófilas y AB positivas (Figs. 11a, c, b, d-f). Mientras que, la última asa de PC presenta glándulas de tipo 1b y 2c con contenidos acidófilos y PAS positivo que indican la presencia de proteoglicanos neutros (Figs. 11c; 12a-f). El epitelio mucoso de esta región se destaca la presencia de células caliciformes con un contenido intensamente PAS positivo y algunas células con contenido AB positivo, lo cual indica la presencia de mucoproteínas neutras muy polimerizadas y proteoglicanos neutros con residuos ácidos de tipo carboxilados y de ácido siálico (Figs. 11d, f; 12c). Los contenidos en la PC muestran una organización de tipo granular finas y gruesas, son PAS positivos, y en algunos sectores de la glándula alcianófilas los contenidos se organizan de manera fibrilar y vacuolada (Figs. 11e, f; 12c, f).

Ovisaco (Os)

La mucosa del ovisaco está formada por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico. Está constituido por abundantes células caliciformes y glándulas de tipo 5 con secreciones mixta AB-PAS positiva que indican la superposición de contenidos de glicoconjugados fuertemente ácidos con glicoconjugados neutros muy polimerizados que dan una coloración morada. El epitelio de revestimiento se apoya sobre una delgada membrana basal PAS positiva. En el tejido conectivo laxo subyacente se visualizan fibras de colágeno, fibroblasto, macrófagos y abundantes vasos sanguíneos. (Figs. 13a-f).

Túnica muscular

La túnica muscular varía en espesor a lo largo del oviducto, observándose en la PR, ZIP y PC una delgada capa formada por dos a tres láminas de fibras musculares lisas dispuestas circularmente, que aumentan de espesor en la PPC. En el ovisaco, externamente a la lámina propia, se observa una gruesa capa muscular constituida por dos capas de músculo liso, con una capa interna con fibras de orientación circular y una externa con orientación longitudinal (Figs. 6a, b; 7c; 8a, 13b).

Túnica serosa

La túnica serosa varía de espesor en las diferentes zonas del oviducto. Está formada por tejido conectivo con abundantes fibras de colágeno relativamente desorganizadas y una importante irrigación con vasos de mediano y pequeño calibre: arterias, arteriolas, venas, vénulas y capilares con terminales

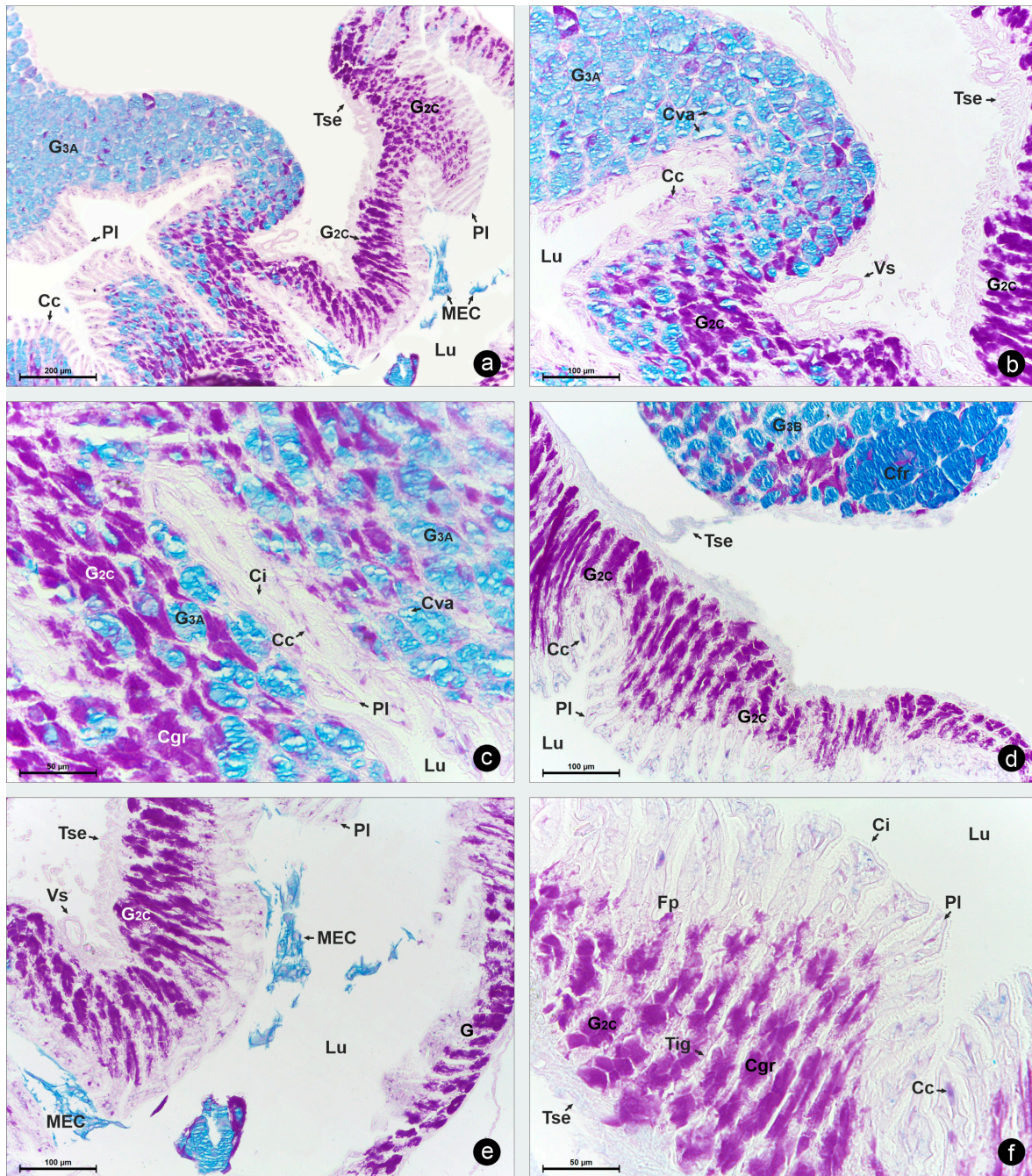


Figure 13. Sagittal section of ovisac (Os) of *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorphology of the Os (H-E). (b) Tunics and structural components of the Os (H-E). (c) Detail of the lining epithelium (H-E). (d) Histochemistry of the wall of the tunics of the Os (AB pH 0,5-PAS). (e) Histochemistry of secretory cells of lining epithelium (AB pH 0,5-PAS). (f) Histochemistry of the ovisac mucosa (AB pH 2,5-PAS). Abbreviations: Caliciform Cell (Cc); Granular Content (Cgr); Vacuolar Content (Cva); Epithelium (Ep); Fibroblast (Fi); Gland Eosin (G1B); Gland Mixed (G5); Laminate Basal (Lb); Lymphocyte (Lf); Lumen (Lu); Macrophage (Ma); Nucleus (N); Ovisac (Os); Convoluted Part (PC); Connective Tissue (Tc); Lax connective tissue (Tcl); Muscle Tunic (Tms), Serous Tunic (Tse); Blood Vessel (Vs). Hematoxylin-Eosin (H-E); Alcian Blue pH 0,5- Periodic Acid Schiff (AB pH 0,5-PAS); Alcian Blue pH 2,5- Periodic Acid-Schiff's reactive (AB pH 2,5-PAS).

Figura 13. Corte sagital de ovisaco (Os) de *Oreobates discoidalis*. (a) Histomorfología del Os (H-E). (b) Túnicas y componentes estructurales del Os (H-E). (c) Detalle del epitelio de revestimiento (H-E). (d) Histoquímica de la pared de las túnicas del Os (AB pH 0,5-PAS). (e) Histoquímica de células secretoras de epitelio de revestimiento (AB pH 0,5-PAS). (f) Histoquímica de la mucosa del Os (AB pH 2,5-PAS). Abreviaturas: Célula Caliciforme (Cc); Contenido Granular (Cgr); Contenido Vacuolar (Cva); Epitelio (Ep); Fibroblasto (Fi); Glándula Eosina (G1B); Glándula Mixta (G5); Lamina Basal (Lb); Linfocito (Lf); Lumen (Lu); Macrófago (Ma); Núcleo (N); Ovisaco (Os); Parte Convoluta (PC); Tejido Conectivo (Tc); Tejido Conectivo Laxo (Tcl); Túnica Muscular (Tms), Túnica Serosa (Tse); Vaso Sanguíneo (Vs). Hematoxilina-Eosina (H-E); Azul Alcian pH 0,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 0,5-PAS); Azul Alcian pH 2,5-Acido Periódico-reactivo de Schiff (AB pH 2,5-PAS).

nerviosas que constituyen paquetes vasculo-nerviosos (Figs. 6a; 7c; 8a, b; 11c; 13a, b).

En síntesis, los resultados permiten destacar como características relevantes: mayor desarrollo del ovario derecho y ovarios constituidos por un solo lóbulo. Durante el período reproductivo, presencia de pocos oocitos y tecas muy desarrolladas. En cada ovario, presencia de hasta 10 folículos ováricos vitelogénicos tipo 3 y 4 que se caracterizan por el desplazamiento de la vesícula germinativa al polo animal, retracción de la membrana nuclear y escasos nucléolos ubicados en la región central del núcleo. Los folículos ováricos tipo 3 en el ooplasma del oocito presentan plaquetas vitelinas de diferentes tamaños organizadas en estratos; los folículos ováricos tipo 4 presentan plaquetas que se compactan formando una estructura homogénea.

En el oviducto, desde la región ZIP a la PPC, se observa predominancia de contenido de gliconjugados. En la PC las asas finales muestran contenidos de glicoconjugados neutros. Se destaca la presencia de áreas glandulares con vacuolas de diferentes tamaños y límites basófilos, las cuales contienen glicolípidos.

DISCUSIÓN

Una característica distintiva de las hembras de la especie *O. discoidalis* es la presencia de ovarios compuestos por un solo lóbulo. Este rasgo contrasta con la estructura ovárica observada en otras especies de anuros con diferentes modos de puesta, como *Lithobates catesbeianus* (Costa et al. 1998), *Rhinella arenarum* (Cabada et al., 1996), *Scinax fuscovarius* (Oliveira, 2004), *Pelophylax lessonae* (Rastogi et al., 1983) y *Leptodactylus latinasus* (Pucci Alcaide et al., 2012), las cuales poseen ovarios formados por varios lóbulos. Al igual que en la mayoría de los anuros, la especie estudiada, en el proceso de foliculogénesis, muestra las mismas etapas durante el periodo preovulatorio, que involucra la interacción entre las células de la línea germinal y las células somáticas para la formación de los folículos ováricos previtelogénicos y vitelogénicos (Monroy et al., 1982).

Las características generales de los diferentes folículos del ovario, tales como: tamaño de los folículos, plegamiento y migración de la vesícula germinal, formación de las plaquetas vitelinas y disposición de las plaquetas en el citoplasma fueron similares a las descritas en *S. fuscovarius* (Oliveira, 2004); *R. arenarum* (Cabada, 1996), *Xenopus laevis* (Dumont, 1972), *Leptodactylus labyrinthicus* (Prado et al., 2004), y *Osteopilus septentrionalis* (Rodríguez Gómez, 2014).

En *O. discoidalis*, se observan diferencias significativas en los folículos ováricos de tipo 3 en comparación con otras especies. En *O. discoidalis*, la teca de estos folículos está más desarrollada, compuesta por dos capas, y el epitelio folicular es de tipo simple cuboidal. En contraste, en seis especies del género *Eleutherodactylus*, las cuales también presentan desarrollo directo, se ha observado que la teca está formada por una sola capa y presentan un epitelio folicular simple plano (Rodríguez Gómez et al., 2010). Además, en los folículos con vitelogénesis avanzada de *O. discoidalis*, se ha observado la incorporación progresiva de plaquetas vitelinas en el citoplasma de manera centrípeta, con plaquetas pequeñas y grandes dispuestas en hileras. Este proceso de incorporación progresiva de plaquetas vitelinas en regiones sectorizadas de los folículos ováricos tipo 3 también ha sido descrito en *L. labyrinthicus* (Prado et al., 2004). En la especie estudiada, el oocito y su núcleo experimentan un crecimiento durante el desarrollo folicular, especialmente en la primera y segunda fase de crecimiento de los folículos ováricos. Esta relación lineal entre el folículo y sus diámetros nucleares también se describió en *Euphlyctis ehrenbergi* (Pancharatna & Saidapur, 1985). El plegamiento de la envoltura nuclear y la disposición de los nucléolos a lo largo del proceso de foliculogénesis fueron similares a los descritos en *Flectonotus pygmaeus* (Del Pino & Humphries, 1978), y en especies del género *Eleutherodactylus* (Rodríguez Gómez et al., 2010). La abundancia de cromosomas plumulados en los primeros momentos de la foliculogénesis fue también observada en *X. laevis* (Coggins, 1973; Espinosa et al., 1980; Capco & Jeffery, 1982). Se han observado proyecciones digitiformes de tejido conectivo en ciertos sectores del estroma ovárico de *O. discoidalis*, características que también han sido descritas en *P. lessonae* como folículos postovulatorios (Rastogi et al., 1983). Estas estructuras están sectorizadas en una corteza y una médula con abundantes células correspondientes al tejido linfático.

El oviducto de *O. discoidalis* presenta una población celular en el epitelio de la mucosa similar a la observada en otras especies de anuros, como *R. arenarum* (Moreno, 1972) y *Leptodactylus chaquensis* (Alcaide, 1991). Sin embargo, la histoquímica evidencia especificidad de glicoconjugados en las diferentes zonas del oviducto, con una predominancia de proteoglicanos ácidos y mosaico de contenidos ácidos y neutros, desde la ZIP a la PPC, mientras que en PC las asas finales muestran contenidos de glicoconjugados neutros. Los resultados obtenidos evidencian que la síntesis y la organización de los glicoconjugados en el oviducto de *O. discoidalis* difiere de otras especies que colocan las puestas en el agua, como las pertenecientes a las familias Bufonidae, Leptodactylidae, Hylidae y Microhylidae (Alcaide, 2006). Las biomoléculas presentes en los contenidos sintetizadas

a lo largo del oviducto tendrían un rol trascendental en la biología reproductiva de *O. discoidalis*, ya que tienen un efecto directo en la fisiología del huevo y la posterior fecundación (Katagiri, 1961, 1962, 1963, 1965; Glick & Shaver, 1963; Barbieri & Cabada, 1969; Barbieri & Raisman, 1969; Barbieri & Budeguer de Atenor, 1973; Raisman et al., 1980; Winik et al., 1999; Crespo, 2009). La presencia de una alta concentración de gliconjugados, principalmente con carga negativa debido a la presencia de grupos sulfatos, en el oviducto de *O. discoidalis*, sugiere una capacidad para atraer agua que facilitaría la difusión de macromoléculas hidrosolubles. Esta hidratación adicional sería especialmente útil en un modo de puesta fuera del agua, tal como se ha descrito para esta especie (Akmentins et al., 2015). Además, aunque los gliconjugados neutros producidos en el oviducto no son muy abundantes, serían suficientes para conferir a la puesta la adhesión necesaria para mantenerse aglutinada en el medio terrestre. Estos glúcidos también forman las cubiertas ovocitarias, que proporcionan un medio de protección para el futuro embrión.

En *O. discoidalis* la arquitectura de los compuestos glucídicos y el seguimiento de los procesos que ocurren en cada uno de los sectores oviductales nos han permitido comprender organizaciones específicas que estarían basadas en los componentes de las biomoléculas presentes que expondría los sitios de unión específicos para el reconocimiento de los espermatozoides de la misma especie; y proporcionarían características adecuadas a un modo de puesta fuera del agua.

Agradecimientos.– Expresamos nuestro agradecimiento a la Fundación Miguel Lillo (Proyecto Z-0075-1) y a CONICET PIP 2018 (otorgado a MLP) por brindarnos asistencia financiera. Permisos de colecta otorgado a M.L.P. Resolución N°000042 (Ministerio de Ambiente y Producción Sustentable, Gbno. Pcia. de Salta, Argentina) y N°229-19 (Dirección de Flora, Fauna Silvestre y Suelos Gbno. Pcia. de Tucumán, Argentina).

LITERATURA CITADA

- Akmentins, M.S. 2011. Vocal repertoire of two species of *Oreobates* Jiménez de la Espada. 1872 (Anura: Strabomantidae) of the Yungas Andean forest, NW Argentina. *Journal of Natural History* 45:1789-1799.
- Akmentins, M.S., L.C. Pereyra, E.A. Sanabria & M. Vaira. 2015. Patterns of daily and seasonal calling activity of a direct-developing frog of the subtropical Andean forests of Argentina. *Bioacoustics* 24:89-99.
- Alcaide, M.F. 1991. Aspectos histoquímicos del oviducto de *Leptodactylus chaquensis*. *Acta Zoologica Lilloana* 40:109-115.
- Alcaide, M.F. 1995. Determinación histoquímica de las mucinas en el oviducto de *Ceratophrys cramwelli* (Anura, Leptodactylidae). Período Preovulatorio. *Acta Zoologica Lilloana* 43:49-55.
- Alcaide, M.F. 2006. Relaciones entre Oviducto de Anuros y los Modos de Ovoposición en el Agua. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. Biblioteca Facultad de Ciencias Naturales (UNT).
- Alcaide, M.F., Lavilla, E.O. & A. Pucci Alcaide. 2009. Histology and histochemistry of the albumin glands in some foam-nesting anurans. *South American Journal of Herpetology* 4:151-163.
- Barbieri, F.D. & M. Cabada. 1969. The role of the diffusible factors released by the eggs jelly in fertilization of the toad egg. *Experientia* 25:1312-1313.
- Barbieri, F.D. & J.S. Raisman. 1969. Non-gametic factors involved in the fertilization of *Bufo arenarum* oocytes. *Development, Growth & Differentiation* 10:363-372.
- Barbieri, F.D. & M.S. Budeguer de Atenor. 1973. Rol of oviducal secretions in the fertilization of *Bufo arenarum* oocytes. *Archives of Biology* 84:501-511.
- Barka, T. & P.J. Anderson. 1965. *Histochemistry Theory, Practice and Bibliography*. Hoeber Medical Division: Harper Row, Publishers, Inc. New York, Evanston, and London. England.
- Bühler, M.I., G. Sánchez Toranzo & L. Zelarayam. 2013. El Ovocito de *Rhinella arenarum* como Modelo para el Estudio de la Maduración y Activación. *Opera Lilloana* N°48. Fundación Miguel Lillo. Tucumán. Argentina.
- Beattie, R.C. 1980. A physico-chemical investigation of the jelly capsules surrounding eggs of the common frog (*Rana temporaria temporaria*). *Journal of Zoology* 190:1-25.
- Cabada, M.O., A. Sánchez, N. Riera, H.D. Genta, S.S. Sánchez & G. A. Barisone. 1996. Vitelline envelope formation during oogenesis in *Bufo arenarum*. *Biocell* 20:77-86.
- Capco, D.G., & W.R. Jeffery. 1982. Transient localizations of messenger RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Developmental Biology* 89:1-12.

- Coggins, L.W. 1973. An ultrastructural and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis*. *Journal of Cell Science* 12:71-93.
- Costa, C., S.L. Lima, D.R. Andrade & C.Â. Agostinho. 1998. Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. *Revista Brasileira de Zootecnia. Brazilian Journal of Animal Science* 27:642-650.
- Crespo, C. 2009. Biomoléculas secretadas por el oviducto de *Bufo arenarum*. Su relación con la fecundación Tesis de Doctorado. Facultad de Bioquímica Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. Biblioteca Facultad de Bioquímica Química y Farmacia (UNT).
- Del Pino, E.M. & A.A. Jr. Humphries. 1978. Multiple nuclei during early oogenesis in *Flectonotus pygmaeus* and other marsupial frogs. *The Biological Bulletin* 154:198-212.
- Duellman, W.E. & L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. Mc. Graw-Hill Book Co. New York, St. Louis, San Francisco. USA.
- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136:153-179.
- Espinoza, A.M., P.E. León, G. Macaya, A.L. Fuentes & J.M. Gutiérrez. 1980. Estructura y función de los cromosomas plumulados. *Revista de Biología Tropical* 28:209-226.
- Fernández, S.N. & I. Ramos. 2003. Endocrinology of reproduction. Pp. 73-117. En Jamieson, G.M. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Anura*. Boca Raton, USA.
- Frost, D.R. 2021. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.1. Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001 [Consultado en noviembre 2021]
- Glick, R.N. & J.R. Shaver. 1963. The fertilizability of frog eggs from different levels of the female reproductive tract. *Experimental Cell Research* 32:615-618.
- Haddad, C.F. & C.P. Prado. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55:207-217.
- Humason, G. 1979. *Animal Tissue Techniques*. 4th edition. W. H. Freeman and Co. Ltd., New York. USA.
- Katagiri, C. 1961. On the fertilizability of the frog egg. I. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series VI Zoology* 14:607-613.
- Katagiri, C. 1962. On the fertilizability of the frog egg II. Change of the jelly envelopes in water. *Japanese Journal of Zoology* 13:365-373.
- Katagiri, C. 1963. On the fertilization of the frog egg. III. Removal of egg envelopes from unfertilized egg. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series VI Zoology* 15:202-211.
- Katagiri, C. 1965. The fertilizability of coelomic and oviducal eggs of the toad *Bufo bufo formosus*. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Series VI Zoology* 15:633-643.
- Lee, P.A. 1967a. Studies of frog oviductal jelly secretion I. Chemical analysis of secretory product. *Journal of Experimental Zoology* 166:99-106.
- Lee, P.A. 1967b. Studies of frog oviductal jelly secretion II. Cytology of secretory cycle. *Journal of Experimental Zoology* 166:107-12.
- Michaelis, L. & S. Granick. 1945. Einführung in die Farbstoffchemie für Histologen, Berlin. *Journal of the American Chemical Society* 67:1212.
- Monroy, A., E. Parisi & F. Rosati. 1982. On the segregation of the germ and somatic cell lines in the embryo. *Differentiation* 23:179-183.
- Moreno, A.R. 1972. Histomorfología del oviducto de *Bufo arenarum* (Hensel), *Revista del Noroeste Argentino* 9:585-602.
- Moreno, A.R. & M.F. Alcaide. 1978. Histomorfología del oviducto de *Ceratophrys ornata* (Bell), (Amphibia, Anura). *Acta Zoológica Lilloana* 33:93-106.
- Nunes de Almeida, C.H.L., C.F.B. Haddad & L.F. Toledo. 2021. A revised classification of the amphibian reproductive modes. *Salamandra* 57:413-427.
- Olavarría, J.M., B.A. Méndez & M. J. Lefebvre. 1968. La secreción del oviducto del sapo *Bufo arenarum*. Introducción al estudio de la composición química. *Acta Physiologica Latinoamericana* 18:173-187.



- Oliveira, C.D. & L.R.D.S. Santos. 2004. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscovarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 21:919-923.
- Padial, J.M., J. Koehler, A. Munoz & I. De la Riva. 2008. Assessing the taxonomic status of tropical frogs through bioacoustics: geographical variation in the advertisement calls in the *Eleutherodactylus discoidalis* species group (Anura). *Zoological Journal of the Linnean Society* 152:353-365.
- Padial, J.M., J.C. Chaparro, S. Castroviejo-Fisher, J.M. Guayasamin, E. Lehr, A.J. Delgado, M. Vaira, M. Jr. Teixeira, R. Aguayo & I. De La Riva. 2012. A revision of species diversity in the Neotropical genus *Oreobates* (Anura: Strabomantidae), with the description of three new species from the Amazonian slopes of the Andes. *American Museum Novitates* 3752:1-55.
- Pancharatna, M. & S.K. Saidapur. 1985. Ovarian cycle in the frog *Rana cyanophlyctis*: a quantitative study of follicular kinetics in relation to body mass, oviduct, and fat body cycles. *Journal of Morphology* 186:135-147.
- Paniagua, R., B. Fraile & F.J. Sáez. 1990. Efectos del fotoperíodo y la temperatura sobre la función testicular en anfibios. *Histología e Histopatología* 5:365-378.
- Pearse, E. 1960. *Histoquímica Teórica y Aplicada*. Aguilar, Madrid. España.
- Pereda, J. 1970. Etude histochemique des mucopolysaccharides de l'oviducte et des gangues muqueuses des ovocytes de *Rana pipiens*: Incorporation du ³⁵SO₄. *Developmental Biology* 21:318-330.
- Pierantoni, R., L. Iela G. Delrio & R.K. Rastogi. 1984. Seasonal plasma sex steroid levels in the female *Rana esculenta*. *General and Comparative Endocrinology* 53:126-134.
- Prado, C., F.C. Abdalla, A.P.Z. Silva & J. Zina. 2004. Late gametogenesis in *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) and some ecological considerations. *Journal of Morphological Sciences* 21:177-184.
- Pucci Alcaide, A., M.F. Alcaide, F. Pucci Alcaide & Lavilla, E.O. 2011. The vesicles of *Phyllomedusa sauvagii* (Anura: Hylidae) nest. *South American Journal of Herpetology* 6:20-26.
- Pucci Alcaide, A., M.L. Ponssa F.J. Pucci Alcaide & M.F. Alcaide. 2012. Histología de ovario en hembras vitelogénicas de *Leptodactylus latinasus* (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana* 56:44-53.
- Raisman, J.S., R.W. De Cunio, M.O. Cabada, E.J. Del Pino & I.M. Mariano. 1980. Ruptura del acrosoma en espermatozoides de *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia Anura). *Desarrollo, Crecimiento y Diferenciación* 22:289-297.
- Rastogi, R.K., I. Izzo-Vitiello, M. Di Meglio, L. Di Matteo, R. Franzese, M.G. Di Costanzo & G. Chieffi. 1983. Ovarian activity and reproduction in the frog, *Rana esculenta*. *Journal of Zoology* 200:233-247.
- Rodríguez Gómez, Y., A., Sanz-Ochotorena, M. D. L. Segura-Valdés, R. Lara-Martínez & L.F. Jiménez-García. 2010. Morfología del ovario en ranas del género *Eleutherodactylus* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Microscópica* 19:271-278.
- Rodríguez Gómez, Y. 2014. Desarrollo folicular en la rana platanera *Osteopilus septentrionalis* (Anura: Hylidae). *Morfovirtual*:1-9.
- Shaver, J.R. & S.H. Barch. 1960. Experimental studies on the role of jelly coat material in fertilization in the frog. *Acta Embryologiae et Morphologiae Experimentalis* 3:180-189.
- Vaira, M. & L. Ferrari. 2008. A new species of *Oreobates* (Anura: Strabomantidae) from the Andes of northern Argentina. *Zootaxa* 1908:41-50.
- Vaira, M., M. Akmentins, Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barrionuevo, J.S. & V. Zaracho. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26:131-159.
- Wake, M.H. 1989. Phylogenesis of direct development and viviparity in vertebrates. En D.B. Wake & G. Roth (Eds.), *Complex Organismal Functions: Integration and Evolution in Vertebrates*. John Wiley, New York and Chichester, USA.
- Wake, M.H. & R. Dickie. 1998. Oviduct structure and function and reproductive modes in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 282:477-506.
- Winik, B.C., M.F. Alcaide, C.A. Crespo, M.F. Medina, I. Ramos & S.N. Fernández. 1999. Ultrastructural changes in the oviductal mucosa throughout the sexual cycle in *Bufo arenarum*. *Journal of Morphology* 239:61-73.

