



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

TESTICULAR MORPHOHISTOLOGY OF *ODONTOPHRYNUS AMERICANUS* (DUMERIL & BIBRÓN, 1841) (ANURA, ODONTOPHRYNIDAE) OF ARGENTINA

MORFOHISTOLOGÍA TESTICULAR DE *ODONTOPHRYNUS AMERICANUS*: (DUMERIL & BIBRÓN, 1841) (ANURA, ODONTOPHRYNIDAE) DE ARGENTINA

Fernando Carezzano^{1,2}; Sergio Urquiza¹; Karina Dorflinger² & Matías Alonso¹

¹Cátedra de Morfología Animal, Departamento de Diversidad Biológica y Ecología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Avda. Vélez Sarsfield 299, Córdoba (X5000JJC), Argentina.

²Cátedra de Anatomía Comparada, Departamento de Diversidad Biológica y Ecología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Avda. Vélez Sarsfield 299, Córdoba (X5000JJC), Argentina.
fercarezza@yahoo.com

The Biologist (Lima), 2013, 11(1), jan-jun: 119-129.

ABSTRACT

We described the morphohistological features of the testis of adult *Odontophrynus americanus* (Dumeril & Bibrón 1841) ($n = 7$) from wetlands of central Argentina. Testes were processed by routine histological techniques, sectioned at 8 microns and stained with hematoxylin–eosin. The gonads are paired, yellowish and ovoid organs, 5.25 ± 0.17 mm long x 2.15 ± 0.15 mm wide. Histologically, there is a thin tunica albuginea (4.90 ± 1.05 m μ) surrounding the testicles. Inside them, there are seminiferous locules measuring 280.47 ± 59.73 m μ in diameter, distinguished in cysts with spermatogenic cells at different stages of development. The interstitial tissue is scarce and the Leydig cells and blood vessels stand out. Spermatogonia I are the largest cells of the germinal series (18.76 ± 2.46 m μ), have granular chromatin and multilobular aspect, commonly found one by cyst, and they originate spermatogonia II, which are smaller (11.02 ± 1.16 m μ). Spermatocytes II have slightly condensed chromatin and are slightly smaller than its predecessors, the Spermatocytes I (9.92 ± 0.41 m μ). Spermatocytes II measure 7.89 ± 0.90 m μ and are the most abundant cell type in the specimens analyzed. Spermatids I are spherical, measuring 5.02 ± 0.59 m μ and are grouped in rounded cysts. The spermatids II, in contrast are elongate and not within the cysts, but they are organized in packets associated with Sertoli cells. Sperms are free, elongated cells towards the center of the loculus, flagellated and with a remarkable nuclear compaction. The morphohistology of testes analyzed show macroscopic and histologic features similar to those observed in other species of neotropical anuran amphibians, presenting all spermatogenic lineage cells in a single locule with abundant spermatocytes, indicating that they have continuous spermatogenic cycles.

Keywords: Anura, histology, Odontophrynidae, *Odontophrynus americanus*, testis, morphometry.

RESUMEN

Se describen las características morfohistológicas del testículo de individuos adultos ($n=7$) de *Odontophrynus americanus* (Dumeril & Bibrón, 1841) (Odontophrynidae) provenientes de humedales del centro de Argentina. Los testículos se procesaron mediante técnicas histológicas de rutina, se cortaron a 8 μm y las láminas obtenidas se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las gónadas son órganos pares, amarillentas y ovoides de $5,25 \pm 0,17$ mm de largo x $2,15 \pm 0,15$ mm de ancho. Histológicamente se observa una delgada túnica albugínea ($4,90 \pm 1,05$ μm) rodeando a los testículos. En su interior se hallan túbulos seminíferos que miden $280,47 \pm 59,73$ μm de diámetro, en ellos se distinguen cistos con células espermatogénicas en distintas etapas de desarrollo. El tejido intersticial es escaso y en él se destacan las células de Leydig y vasos sanguíneos. Las espermatogonias I son las células más grandes de la serie germinal ($18,76 \pm 2,46$ μm); poseen la cromatina granular y de aspecto multilobular, hallándose comúnmente una por cisto, estas originan a las espermatogonias II, más pequeñas ($11,02 \pm 1,16$ μm). Los espermatoцитos II presentan la cromatina levemente condensada y son un poco más chicos que sus precedentes, los espermatoцитos I ($9,92 \pm 0,41$ μm). Los espermatoцитos II miden $7,89 \pm 0,90$ μm y son el tipo celular más abundante en los especímenes analizados. Las espermátidas I son esféricas, miden $5,02 \pm 0,59$ μm y se agrupan en cistos redondeados. Las espermátidas II, en cambio son alargadas y no se hallan dentro de cistos, pero siguen organizadas en paquetes asociadas a células de Sertoli. Los espermatozoides son células libres hacia el centro del lóculo, alargadas, flageladas y con una notable compactación nuclear. La morfohistología de los testículos analizados muestran características macroscópicas e histológicas similares a las observadas en otras especies de anfibios anuros neotropicales, presentando todas las células del linaje espermatogénico en un mismo lóculo, con predominio de espermatoцитos, lo que indicaría que presentan ciclos espermatogénicos continuos.

Palabras clave: histología, morfometría, Odontophrynidae, *Odontophrynus americanus*, testículo.

INTRODUCCIÓN

Desde hace años los anfibios se hallan en franco retroceso numérico a nivel mundial (Pounds & Crump 1994, Kiesecker et al. 2001, Blaustein et al. 2003, Stuart et al. 2004, Beebee & Griffiths 2005, McCallum 2007, Roelants et al. 2007, Aguilar-Miguel et al. 2009). Entre las causas de esta disminución se cuentan la contaminación del agua y el suelo por agroquímicos, la destrucción y fragmentación del hábitat, la introducción de especies exóticas depredadoras, la radiación ultravioleta, la lluvia ácida, etc. (Lips et al. 1999). De continuar este fenómeno se

convertiría en la sexta extinción masiva, abarcando a todo un grupo (Wake & Vredenburg 2008). Es por ello que conocer aspectos sobre la biología reproductiva de estos organismos es importante puesto que permite diseñar e implementar estrategias y planes de acción para su protección y conservación.

La biología reproductiva de una especie es la combinación de características morfológicas, fisiológicas y conductuales que permitan obtener un número de descendientes óptimos y aptos bajo ciertas condiciones ambientales (Duellman & Trueb 1994). Entre los ítems que se analizan se halla la morfohistología gonadal, debido a que además de aportar

información básica sobre la estructura y composición tisular de estos órganos, permite conocer las etapas del ciclo reproductivo de las especies (Oliveira *et al.* 2007).

Los ciclos reproductivos en los anuros se relacionan estrechamente con las condiciones ambientales tales como la temperatura, el fotoperíodo y las lluvias. Tales factores afectan la gametogénesis. Se han descrito tres ciclos espermatogénicos en los anfibios anuros en relación a factores ambientales y hormonales, el ciclo continuo, el potencialmente continuo y el discontinuo. En el primero la producción de espermatozoides se realiza ininterrumpidamente durante todo el año pudiendo presentar ciertos grados de variación estacional, histológicamente se observan en los túbulos seminíferos todo el linaje de las células espermatogénicas. Los ciclos potencialmente continuos se caracterizan por ser estacionales, presentando una moderada supresión de la espermatogénesis en los meses fríos, pero pueden ser estimulados intrínsecamente y extrínsecamente. Los ciclos discontinuos se ven interrumpidos durante parte del año, caracterizándose los testículos por presentar quistes germinales con células en degeneración durante el período de éstasis, no pudiéndose ser reactivados ni endógenamente ni exógenamente (Rastogi 1976, Duellman & Trueb 1994, Oliveira *et al.* 2002, Asenjo *et al.* 2011, Norris & Lopez 2011).

Estudios sobre la morfohistología de los testículos de anfibios neotropicales son escasos. En ellos se los describe como órganos pares, generalmente ovoides, localizados en la región abdominal y ventral de los riñones.

Revestidos por la túnica albugínea de tejido conectivo, la cual puede o no presentar células pigmentarias. En su interior se observan túbulos o lóculos seminíferos con células espermatogénicas en diferentes estadios de desarrollo, agrupadas en cistos y asociadas a

células de Sertoli. Rodeando los cistos se halla la túnica propia formada por células planas y tejido conectivo laxo. En el tejido intersticial se destacan las células de Leydig, secretoras de hormonas (Rastogi *et al.* 1988, Bão *et al.* 1991, Oliveira *et al.* 2002, Oliveira & Zieri 2005, Oliveira *et al.* 2007, Ferreira *et al.* 2008, 2009, Carezzano & Cabrera 2010, Asenjo *et al.* 2011).

Odontophrynus americanus es una especie de amplia distribución en el neotrópico, desde el centro y sur de Brasil, Uruguay, Paraguay y norte y centro de Argentina (Ceñal 1980) que presenta poblaciones diploides y tetraploides, y una gran proporción de figuras meióticas en las zonas que estarían en contacto, lo que lleva a postular a algunos autores la posible ocurrencia de fenómenos de especiación. La poliploidía es un fenómeno poco común en vertebrados, en los cuales, al igual que en otros grupos en los que va ligado a la aparición de figuras meióticas multivalentes, favorecería los cambios adaptativos, habiéndose detectado en diez géneros de anuros (Barrio & Chieri 1970, Salas & Martino 2009). Claramente se infiere de aquí, que, dada la situación de vulnerabilidad y potencial extinción en masa de este grupo, aclarar su ciclo, comportamiento y caracteres morfohistológicos reproductivos es crucial para mantener los ciclos ecológicos y evolutivos de los humedales.

El objetivo del presente estudio es aportar datos básicos sobre la morfohistología del testículo de individuos de *O. americanus* capturados en plena época reproductiva en el centro de Argentina y así conocer parte de su ciclo reproductivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente estudio se realizó en humedales

próximos a la localidad Ucacha (33° 01' S; 63° 30' W), provincia de Córdoba, República Argentina (Figs. 1 y 2). Presenta lagunas de origen pluvial y fluvial. El clima es estacional, presentando inviernos fríos y secos y veranos cálidos y lluviosos. La temperatura media anual es de 16 °C, variando de 9 °C en julio, con mínimas -8 °C, a 24 °C en enero, con máximas de hasta 43 °C. La precipitación media anual es de 850 mm y está concentrada entre los meses de octubre y marzo (Gorgas & Tassile 2003, Aimar *et al.* 2010).

Animales analizados

Se capturaron a mano en lagunas someras de origen pluvial, localizándolos por sus vocalizaciones, siete machos adultos de *O. americanus* (Fig. 3) entre el dos y tres de enero de 2013, en plena época reproductiva. Los ejemplares fueron tratados éticamente. Se anestesiaron y eutanizaron en el laboratorio mediante vapores de cloroformo, posteriormente se les efectuó una incisión en la pared abdominal y se extrajeron sus órganos reproductores. Los mismos se fijaron en solución de Bouin durante 12 h, conservándolos luego en alcohol etílico al 70% (Santos & Oliveira 2007, 2008). Los especímenes se depositaron en la Colección herpetológica de la Cátedra de Anatomía Comparada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba bajo la numeración AC-685 al 691.

Es de hacer notar que esta especie es considerada como no amenazada por Lavilla & Heatwole (2010), por lo que este estudio no implica un impacto negativo sobre las poblaciones de este anfibio.

Morfometría e Histología

Las gónadas se midieron en ambos ejes con un calibre digital de precisión 0,01mm. Las mismas se procesaron mediante técnicas histológicas de rutina de inclusión en parafina,

se realizaron cortes seriados a 8 micras ($m\mu$) de espesor, los que se tiñeron con hematoxilina de Harris-eosina amarilla a los fines de identificar los distintos componentes tisulares.

Para el estudio morfohistológico se tomaron veinte cortes de cada espécimen a intervalos regulares, de modo de cubrir toda la longitud de la gónada, y con la ayuda de una cámara digital Zeiss AxioCam ERc 5s adosada a un microscopio trinocular Zeiss Primo Star se midieron 50 células por corte de cada tipo de célula espermática utilizando el programa AxioVision 4.0 V 4.8.2.0. También se midió la túnica albugínea y el diámetro de los túbulos seminíferos. En la identificación de los distintos tipos de células espermáticas se siguieron los trabajos realizados en anfibios de Oliveira *et al.* (2002), Jamieson (2003), Ferreira *et al.* (2008) y Carezzano & Cabrera (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los testículos de *O. americanus* son órganos pares, amarillentos y ovoides de $5,25 \pm 0,17$ mm de largo por $2,15 \pm 0,15$ mm de ancho; asociados a ellos se hallan los cuerpos adiposos de buen desarrollo (Fig. 4).

Histológicamente se observan rodeados por una delgada túnica albugínea ($4,90 \pm 1,05 m\mu$) formada por tejido conectivo denso, en el que predominan fibras de colágeno. También se observan células de músculo liso y vasos sanguíneos. En su interior se hallan numerosos túbulos seminíferos que miden $280,47 \pm 59,73 m\mu$ de diámetro, en ellos se distinguen cistos con células espermáticas en distintas etapas de desarrollo. Rodeando los cistos se halla la túnica propia, formada por tejido conectivo laxo y células planas, las células peritubulares. El tejido intersticial es escaso y en él se destacan células poliédricas con un núcleo central esférico, las células de Leydig y vasos

sanguíneos (Figs. 5 y 6). No se observaron células pigmentarias.

En el interior de los túbulos se identifican las células espermatogénicas, en distintas etapas de desarrollo y asociadas a las células de Sertoli (Figs. 6 y 7).

Espematogonias. Los cistos con espermatogonias diploides están próximos a la pared de los folículos. Se pueden identificar espermatogonias I y espermatogonias II. Las primeras son las células más grandes ($18,76 \pm 2,46 \mu\text{m}$); poseen la cromatina granular y de aspecto multilobular, hallándose comúnmente una por cisto. Estas células por mitosis originan las espermatogonias II, más pequeñas ($11,02 \pm 1,16 \mu\text{m}$) y con la cromatina más condensada. Las células de Sertoli asociadas son planas (Figs. 5, 6 y 7).

Espermatocitos. Células originadas por diferenciación de las espermatogonias II.

Presentan la cromatina levemente condensada y son un poco más pequeñas que sus precedentes, los espermatocitos I ($9,92 \pm 0,41 \mu\text{m}$). Los espermatocitos II se originan por meiosis de los espermatocitos I, estos son aún más pequeños ($7,89 \pm 0,90 \mu\text{m}$) y se observan más teñidos. Estas células son las más abundantes en los especímenes analizados (Figs. 5 y 6).

Espermátidas. Estas células poseen una variedad de formas, desde esféricas a alargadas. Los espermatocitos II completan la meiosis II y se transforman en espermátidas I, células esféricas agrupadas en cistos redondeados ($5,02 \pm 0,59 \mu\text{m}$), las que se diferenciarán en las espermátidas II, células alargadas que no se hallan dentro de cistos, se organizan en paquetes asociadas a células de Sertoli, las que se distinguen fácilmente (Fig. 5).



Figura 1. Ubicación del área de estudio.

Espermatozoides. Las espermátidas II sufren el proceso de espermiogénesis y originan a los espermatozoides, células libres hacia el centro del lóculo, alargadas, con una notable compactación nuclear y en donde se observa un flagelo (Figs. 5, 6 y 7).

El análisis del testículo *O. americanus* muestra características macroscópicas e histológicas similares a las observadas en otras especies de anfibios anuros neotropicales como *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Oliveira et al. 2002), *Batrachyla antartandica* Barrio, 1967, *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867), *Odontophrynus cultripes* Reinhardt & Lütken, 1862, *Telmatobius schreiteri* Vellard, 1946 (Jamieson 2003), *Physalaemus nattereri* Steindachner, 1863 (Oliveira & Zieri 2005),

Physalaemus biligonigerus (Cope, 1861) (Carezzano & Cabrera 2010) y *Allobates femoralis* (Boulenger, 1884) (Asenjo et al. 2011). Los especímenes analizados exhiben lóculos con todas las células del linaje espermatogénico, con un predominio de espermatoцитos, lo que indicaría que presentan ciclos continuos.

Estudios histológicos del ciclo reproductivo completo de esta especie, no solo analizando la espermatogénesis, sino también la oogénesis, son necesarios para complementar este análisis. Asimismo estos estudios podrían extenderse a otras regiones de su amplia distribución, juntamente a la ocurrencia de la conocida variabilidad en su ploidía y en las figuras meióticas que exhibe.



Figura 2. Laguna somera de origen pluvial de los humedales del centro de Argentina en donde se realizó el muestreo.



Figura 3. Macho de *O. americanus*.

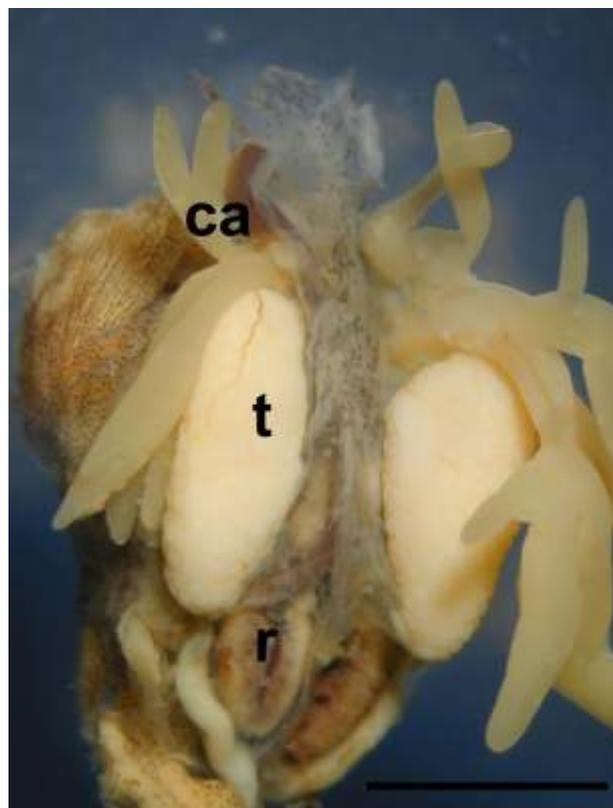


Figura 4. Vista macroscópica del testículo de *O. americanus*. ca, cuerpos adiposos; r, riñón; t, testículo. Barra: 3 mm.

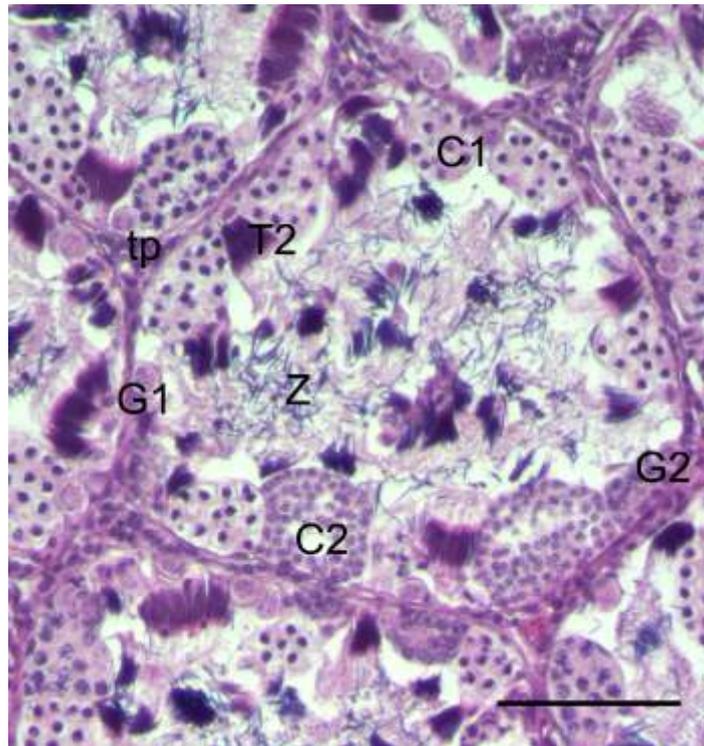


Figura 5. Corte histológico del testículo de *O. americanus*. C1, espermatoцитos 1; C2, espermatoцитos 2; G1, espermatoгонias 1; G2, espermatoгонias 2; T2, espermátidas 2; tp, túnica propia; Z, espermatozoides. HE. Barra: 100 mμ.

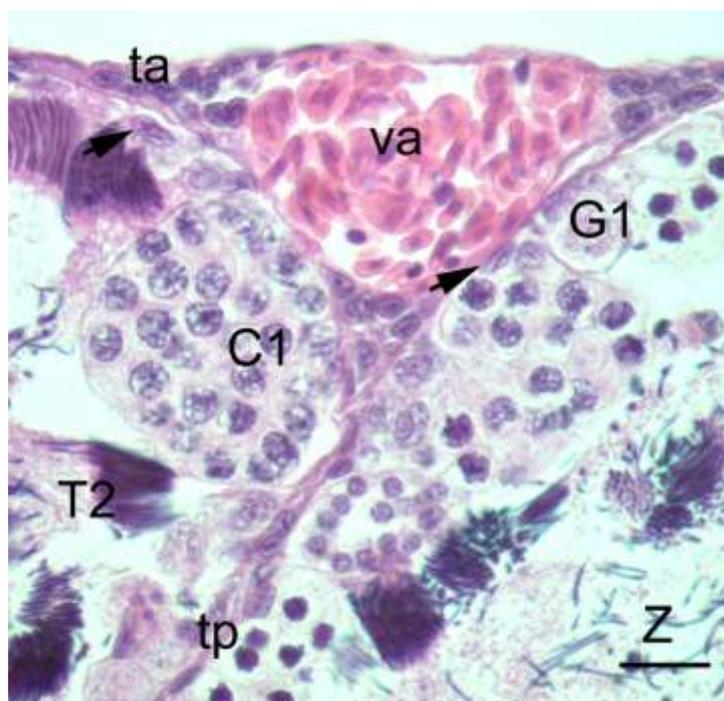


Figura 6. Corte histológico del testículo *O. americanus*. C1, espermatoцитos 1; G1, espermatoгонias 1; ta, túnica albugínea; tp, túnica propia; Z, espermatozoides. Las flechas señalan las células de Sertoli. HE. Barra: 20 mμ.

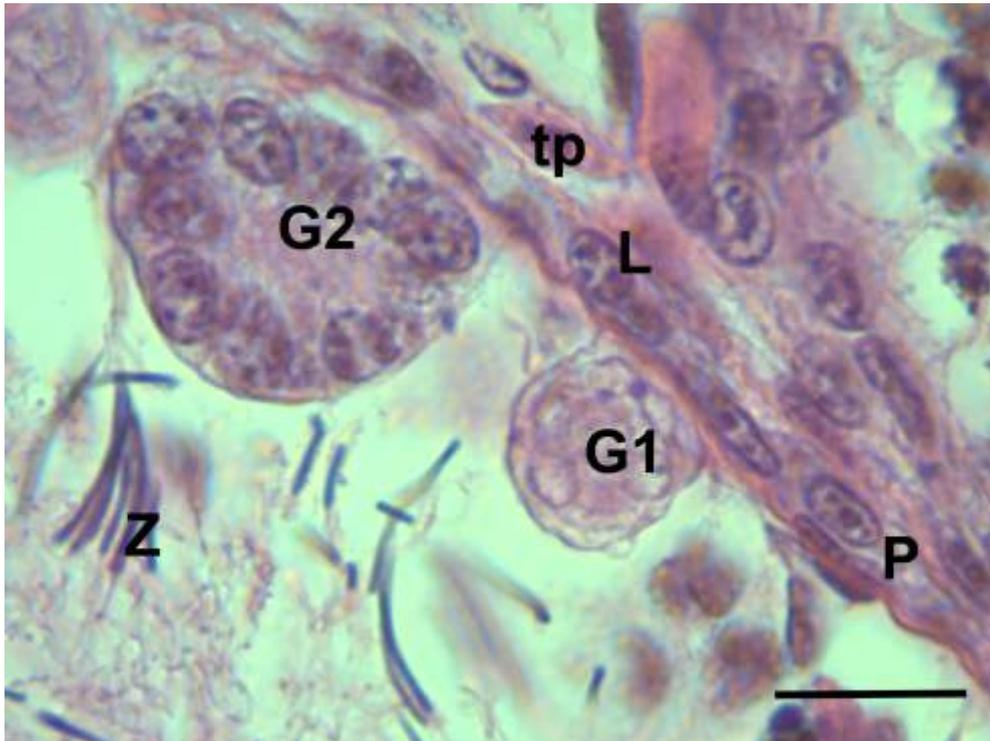


Figura 7. Corte histológico del testículo de *O. americanus*. G1, espermatogonias 1; G2, espermatogonias 2; L, células de Leydig; P, células peritubulares; tp, túnica propia; Z, espermatozoides. HE. Barra: 20 μ m.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Córdoba, Argentina, por el apoyo económico brindado. A Claudia Bregonzio por facilitar el microscopio Leica para obtener las fotografías de los cortes histológicos. A Cristian Lager por su predisposición que permitió lograr las fotografías del aspecto macroscópico de las gónadas. A la Técnica de Laboratorio Ana Chalabe por realizar los preparaciones histológicas. A la Secretaría de Ambiente de la provincia de Córdoba, dependiente del Ministerio de Agua, Ambiente y Energía del Gobierno de la Provincia de Córdoba por la autorización correspondiente para la captura de los ejemplares analizados. A dos revisores anónimos por las oportunas sugerencias realizadas que permitieron mejorar el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Miguel, X.; Legorreta, G. & Casas-Andreu, G. 2009. Reproducción *ex situ* en *Ambystoma granulosum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 25: 443-454.
- 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-Numero Especial. Cambios de uso de la tierra. Causas, consecuencias y mitigación*: 3-14.
- Asenjo, A.; Ting, K. S. & Pino, J. 2011. Morfometría de testículos y células germinales de *Allobates femoralis* (Boulenger 1883) (Dendrobatidae: Anura: Amphibia). *The Biologist*

- (Lima), 9: 167-175.
- Báo, S. N.; Dalton, G. C. & de Oliveira, S. F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): Ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. *Journal of Morphology*, 207: 303-314.
- Barrio, A. & Chieri, P. R. 1970. Relaciones cariosistémicas de los Ceratophryidae de la Argentina (Amphibia, Anura). *Physis*, 30: 321-329.
- Beebee, T. J. C. & Griffiths, R.A. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125: 271-285.
- Blaustein, A. R.; Romansic, J. M.; Kiesecker, J. M. & Hatch, A. C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions*, 9: 123-140.
- Carezzano, F. J. & Cabrera, M. R. 2010. Morfohistología del testículo de *Physalaemus biligonigerus* (Amphibia, Leiuperidae) en un ecosistema agrícola. *Boletín de la Asociación Herpetológica*, 21: 39-42.
- Cei, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano. Nuova Serie, Monographia 2*: 1-609.
- Duellman, W. E. & Trueb, L. 1994. *Biology of Amphibians*. McGraw Hill, New York.
- Ferreira, A.; dos Santos Rosa, A. & Mehanna, M. 2009. Organização celular dos testículos em Hylidae e Leptodactylidae, no Pantanal (Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 31: 447-452.
- Ferreira, A.; Mehanna, M. & Prados, C. P. A. 2008. Morphologic and morphometric analysis of testis of *Pseudis limellum* (Cope, 1862) (Anura, Hylidae) during the reproductive cycle in the Pantanal, Brazil. *Biocell*, 32: 185-194.
- Gorgas, J. & Tassile, J. 2003. *Recursos naturales de la Provincia de Córdoba: Los suelos, nivel de reconocimiento 1:500.000*. Agencia Córdoba Ambiente S. E., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Manfredi.
- Jamieson, B. G. M. 2003. *Reproductive Biology and Phylogeny of Anura*. Science Publishers, Inc. Enfield (NH), USA Plymouth, UK.
- Kiesecker, J. M.; Blaustein, A. R. & Belden, L. K. 2001. Complex causes of amphibian decline. *Nature*, 410: 681-684.
- 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. Volumen 9, Capítulo 3*. Surrey Beatty & Sons Pty. Ltd., Chipping Norton, Australia.
- Lips, K.; Reaser, J. K. & Young, B. E. 1999. *El monitoreo de Anfíbios en América Latina. Un manual para coordinar esfuerzos*. The Nature Conservancy.
- McCallum, M. 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology*, 41: 483-491.
- Norris, D. O. & Lopez, K. H. 2011. *Hormones and reproduction of vertebrates. Volume 2: Amphibians*. Academic Press, London, UK.
- Oliveira, E.F.; Feio, R. N. & Matta, S. L. P. 2007. Aspectos reprodutivos de *Dendropsophus minutus* (Peters, 1872) no município de Viçosa, Minas Gerais. *Revista Ceres*, 54: 230-238.
- Oliveira, C. & Zieri, R. 2005. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22: 454-460.
- Oliveira, C.; Zanetoni, C. & Zieri, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Revista Chilena de Anatomía*, 20: 263-268.
- Pounds, J. A. & Crump, M. L. 1994.

- Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 8: 72-85.
- Rastogi, R. K. 1976. Seasonal cycle in Anuran (Amphibia). Testis: The endocrine and environmental controls. *Bolletino di zoologia*, 43: 151-172.
- Rastogi, R. K.; Bagnara, J. T.; Iela, L. & Krasovich, M. A. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: A light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*, 197: 277-302.
- Roelants, K., Gower, D. J.; Wilkinson, M.; Loader, S.; Biju, S. D.; Guillaume, K.; Moriau, L. & Bossuyt, F. 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 887-892.
- Salas, N. & Martino, A. L. 2009. Patrones de configuraciones meióticas en poblaciones de *Odontophrynus cordobae* y *O. americanus* (Anura: Cycloramphidae), en el área central de Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics*, 19: 27-32.
- Santos, L. R. S. & Oliveira, C. 2007. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24: 64-70.
- Santos, L. R. S. & Oliveira, C. 2008. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, 39: 1266-1270.
- Stuart, S.; Chanson, J. S.; Cox, N. A.; Young, B. E.; Rodrigues, A. S. L.; Fishman, D. L. & Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.
- Wake, D. & Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 11466-11473.

Received April 21, 2013.
Accepted May 30, 2013.