



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias
Área: Reproducción animal



Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO
DE IMPLANTACIÓN EN
LAGOSTOMUS MAXIMUS:**

**UN MAMÍFERO CON POLIOVULACIÓN
Y REABSORCIÓN SELECTIVA**

Autor

Vet. Mariela Giacchino

Director

Dr. Alfredo Daniel Vitullo

**Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos,
Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD),
Universidad Maimónides**

2017

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Alfredo Vitullo por haberme dado la posibilidad de ser su becaria y darme la libertad de trabajo.
- A la Universidad Maimónides, al CEBBAD y la Fundación Científica Felipe Fiorellino por haber brindado todos los insumos, instalaciones y equipos necesarios para esta tesis que sin ellos no hubiese sido posible realizarla.
- Al CONICET por haberme otorgado la beca que me permitió desarrollar esta Tesis.
- Al ECAS y al Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires por su colaboración para la captura de animales.
- A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (UBA) por la formación académica que me ha brindado durante muchos años, por la posibilidad de estar defendiendo en ella mi tesis doctoral y por sus servicios a terceros brindados para el desarrollo de este trabajo.
- Al CIDME, al Vet. Sergio Ferraris y Vet. Fernando Lange por la colaboración durante estos años.
- A la Cátedra de Química Biológica, en especial al Dr. Pablo Rodríguez y la Dra. Elizabeth Breininger por haberme permitido realizar una pasantía y trabajar juntos.
- Dra. Victoria Lux Lantos y Lic. Marianne Bizzozzero del IByME por la colaboración para realizar los RIA.
- Vet. Pablo Torres por ayudarme con el equipo del CASA y Vet. Carolina por asesorarme en la medición de las citocinas.
- Al Laboratorio Burnet por haber donado hormonas.
- A la Fundación de Historia Natural Azara por su ayuda económica en reuniones científicas y por su colaboración.
- A los ingenieros Pablo Sambuco y Diego Alonso por la ayuda en el diseño y fabricación del electroeyaculador para vizcacha.

- A la Dra. Constanza Gariboldi y el Dr. Pablo Inserra por la ayuda incondicional durante este trabajo.
- Alejandra, Santiago, Cortasa, Belén, Noe, Nico y Alejandro por estos años compartidos.
- A Juan por brindarme su tiempo y conocimientos.
- En lo personal agradezco a Pablo, mis padres, mis hermanos, cuñados y sobrinos por el acompañamiento incondicional. A Lis, Sole, Mili, Emi y Lau por haberme ayudado a terminar esta etapa y haber estado en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

1. ABREVIATURAS	Página 1
2. RESÚMENES	Página 8
2.1 Resumen en idioma español	Página 9
2.2 Resumen en idioma inglés	Página 10
3. INTRODUCCIÓN	Página 11
3.1 Desarrollo embrionario	Página 12
3.1.1 Período de peri-implantación	Página 12
3.1.2 Período de implantación	Página 14
3.1.3 Principales factores que intervienen en el proceso de implantación	Página 18
3.1.3.1 Factor inhibidor de leucemia (LIF)	Página 18
3.1.3.2 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Página 19
3.1.3.3 Óxido Nítrico (NO)	Página 19
3.1.3.4 Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	Página 20
3.1.3.5 Ciclooxygenasa (Cox)	Página 20
3.2 Inmunología de la gestación	Página 20
3.2.1 La inmunidad innata	Página 21
3.2.2 La inmunidad adaptativa	Página 22
3.2.3 Inmunología durante la gestación	Página 25
3.3 El modelo en estudio: <i>Lagostomus maximus</i>	Página 30
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	Página 38
4.1 Hipótesis	Página 39
4.2 Objetivos generales	Página 39
4.3 Objetivos específicos	Página 40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	Página 41
5.1 Descripción general	Página 42

5.1.1	Ética	Página	42
5.1.2	Captura y alojamiento de los animales	Página	42
5.1.3	Eutanasia y recolección de las muestras	Página	43
5.2	Enfoques experimentales	Página	43
5.2.1	Grupos de trabajo	Página	43
5.2.2	Análisis macroscópico e histológico de las muestras	Página	44
5.3	Microscopía electrónica	Página	45
5.3.1	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	Página	45
5.3.2	Microscopía electrónica de transmisión (MET)	Página	45
5.4	Tratamientos con E ₂ o P ₄	Página	46
5.5	Marcación de los sitios de implantación con Azul de Tripán	Página	47
5.6	Ecografías y videoendoscopías	Página	48
5.7	Angiografías del tracto reproductivo de las hembras	Página	48
5.8	Moldeado de la vasculatura del tracto reproductivo con látex	Página	49
5.9	Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	Página	49
5.9.1	Procesamiento histológico de los tejidos	Página	49
5.9.2	Inmunohistoquímica (IHQ)	Página	49
5.9.3	Inmunofluorescencia (IF) con microscopía confocal	Página	52
5.10	Tunel (Terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP Nick End Labelling)	Página	52
5.11	Radioinmunoensayo (RIA)	Página	53
5.11.1	Obtención y preparación de muestras para RIA	Página	53
5.11.2	Radioinmunoensayo (RIA) propiamente dicho	Página	54
5.12	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de LIF	Página	55
5.12.1	Extracción de proteínas de los cuerno uterinos	Página	55
5.12.2	ELISA de LIF	Página	55
5.13	Diseño y fabricación de un electroeyaculador exclusivo para vizcacha	Página	56
5.14	Estudio del pene de <i>L. maximus</i>	Página	56
5.15	Estudio de parámetros microscópicos de espermatozoides de <i>L. maximus</i>	Página	57

5.16	Análisis seminal computarizado de la movilidad de los espermatozoides	Página	57
5.17	Electroforesis: fraccionamiento de las proteínas plasmáticas	Página	58
5.18	ELISA de IFN- γ e IL-10	Página	59
5.18.1	Obtención de los homogenatos para medir citocinas	Página	59
5.18.2	ELISA de IFN- γ	Página	59
5.18.3	ELISA de IL-10	Página	60
5.19	ELISA de IL-8	Página	60
5.19.1	Obtención de los homogenatos	Página	60
5.19.2	ELISA propiamente dicho	Página	61
5.20	Tratamiento de hembras con inyección de plasma seminal (IM)	Página	61
5.21	Análisis estadístico	Página	62
5.22	Análisis de imágenes	Página	63
6.	RESULTADOS	Página	64
6.1	Análisis macroscópico e histológico del tracto reproductor de la hembra de <i>L. maximus</i>	Página	65
6.1.1	Análisis macroscópico e histológico de la hembra pre-púber	Página	65
6.1.2	Análisis macroscópico e histológico de la hembra adulta no preñada	Página	65
6.1.2.1	Tratamientos con estrógeno (E ₂) o progesterona (P ₄)	Página	71
6.1.3	Análisis macroscópico e histológico de la hembra adulta preñada	Página	73
6.1.4	Análisis macroscópico e histológico de la hembra adulta en lactancia	Página	75
6.2	Análisis macroscópico e histológico de la placenta de <i>L. maximus</i>	Página	77
6.2.1	Análisis estructural y subestructural de las “perlas” de la placenta de <i>L. maximus</i>	Página	81
6.3	Implantación de <i>L. maximus</i>	Página	89
6.3.1	Marcación de los sitios de implantación con Azul de Tripán	Página	89
6.3.2	Factores angiogénicos que participan en la implantación	Página	90
6.3.3	Rol de la apoptosis en la reabsorción embrionaria selectiva de <i>L. maximus</i>	Página	93

6.4 Estudio de la irrigación del tracto reproductivo de la hembra adulta de <i>L. maximus</i>	Página	95
6.4.1 Angiografías del tracto reproductivo de las hembras en diferentes estadios reproductivos	Página	95
6.4.2 Moldeado de la vasculatura del tracto reproductivo de la hembra adulta con látex	Página	97
6.4.3 Medición de las hormonas esteroideas (E ₂ y P ₄) en las diferentes secciones uterinas y vesículas embrionarias	Página	100
6.5 Inmunología de la gestación de <i>L. maximus</i>	Página	103
6.6 Análisis reproductivo del macho <i>L. maximus</i>	Página	107
6.6.1 Diseño y fabricación de un electroeyaculador exclusivo para vizcacha	Página	107
6.6.2 Estudio macroscópico e histológico del pene de <i>L. maximus</i>	Página	110
6.6.3 Estudio de los espermatozoides de <i>L. maximus</i>	Página	113
6.6.3.1 Análisis de parámetros microscópicos de los espermatozoides	Página	113
6.6.3.2 Análisis seminal computarizado de la movilidad de los espermatozoides	Página	114
6.6.4 Evaluación de la participación del plasma seminal en la decidualización	Página	116
6.6.4.1 Inseminación de hembras con macerados de próstata y conductos deferentes	Página	116
6.6.4.2 Componente del plasma seminal: IL-8	Página	118
6.7 Inducción de la ovulación por plasma seminal en <i>L. maximus</i>	Página	119
7. DISCUSIÓN	Página	123
7.1 Morfohistología del tracto reproductivo y de la placenta de <i>L. maximus</i>	Página	124
7.2 Proceso de reabsorción embrionaria selectivo	Página	128
7.3 Modulación de la inmunología de la gestación de <i>L. maximus</i>	Página	130
7.4 Mecanismo de ovulación: ¿espontánea o inducida?	Página	131
8. CONCLUSIONES	Página	134
9. BIBLIOGRAFÍA	Página	137

10. ANEXOS

Página 152

10.1 Registro del peso de las placentas y peso y medida de los fetos

Página 153

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fecundación y desarrollo embriológico pre- y peri-implantación	Página 13
FIGURA 2. Etapas del proceso de implantación de un blastocisto	Página 16
FIGURA 3. Estrategias de implantación en diferentes especies	Página 17
FIGURA 4. Clasificación del patrón de citocinas Th1 y Th2	Página 23
FIGURA 5. Respuesta inmunológica frente a la preñez	Página 26
FIGURA 6. Influencias hormonales en la respuesta Th1 y Th2	Página 27
FIGURA 7. Mecanismo de regulación inmunológica durante la gestación	Página 29
FIGURA 8. Modelo en estudio <i>L. maximus</i>	Página 30
FIGURA 9. Diagrama del útero y vagina de la vizcacha	Página 31
FIGURA 10. Macroscopía e histología del ovario de la vizcacha	Página 32
FIGURA 11. Histología de la placenta de <i>L. maximus</i>	Página 35
FIGURA 12. Nivel hormonal de P4 en la preñez de la vizcacha	Página 36
FIGURA 13. Nivel hormonal de 17 β -Estradiol en la preñez de la vizcacha	Página 37
FIGURA 14. Esquema del tratamiento con E2 o P4 para la remodelación uterina	Página 47
FIGURA 15. Esquema del tratamiento para inducción e inseminación de la vizcacha	Página 61
FIGURA 16. Tratamiento de hembras con inyección de plasma seminal (IM)	Página 62
FIGURA 17. Aparato reproductor de la hembra pre-púber	Página 66
FIGURA 18. Endoscopía en hembra de <i>L. maximus</i> no preñada	Página 67
FIGURA 19. Aparato reproductor de la hembra no preñada	Página 68
FIGURA 20. Vagina y cuerno uterino de la hembra no preñada	Página 70
FIGURA 21. Microscopía electrónica de transmisión del oviducto	Página 71

FIGURA 22. Endoscopía de animales tratados con hormonas	Página 72
FIGURA 23. Histología del tracto reproductor de animales tratados con hormonas	Página 73
FIGURA 24. Cuerno uterino de hembra preñada	Página 74
FIGURA 25. Cuerno uterino de la hembra preñada temprana	Página 76
FIGURA 26. Aparato reproductor de hembra en anestro	Página 77
FIGURA 27. Macroscopía de la placenta	Página 78
FIGURA 28. Microscopía óptica de las placentas de <i>L. maximus</i>	Página 80
FIGURA 29. Apoptosis en la placenta de preñez intermedia y a término	Página 81
FIGURA 30. Ecografías y eco-doppler en <i>L. maximus</i>	Página 82
FIGURA 31. Endoscopía de la hembra con preñez intermedia mayor a 90 días	Página 83
FIGURA 32. Endoscopía de la hembra con preñez a término	Página 84
FIGURA 33. Microscopía óptica de estructuras perladas	Página 86
FIGURA 34. Microscopía electrónica de barrido de las estructuras perladas	Página 87
FIGURA 35. Microscopía electrónica de transmisión de las estructuras perladas	Página 88
FIGURA 36. Marcación de los sitios de implantación con azul de prusia	Página 89
FIGURA 37. IHQ – IF de LIF en los cuernos uterinos	Página 90
FIGURA 38. IF de VEGF en los cuernos uterinos con preñez temprana	Página 92
FIGURA 39. IHQ – IF de COX ₂ en los cuernos uterinos con preñez temprana	Página 93
FIGURA 40. Apoptosis en las vesículas embrionarias	Página 94
FIGURA 41. Angiografías en <i>L. maximus</i> en diferentes estadios reproductivos	Página 96
FIGURA 42. Irrigación del tracto reproductor de la hembra no preñada	Página 98
FIGURA 43. Irrigación del cuerno uterino con preñez temprana	Página 99
FIGURA 44. Irrigación del cuerno uterino preñado	Página 100
FIGURA 45. Proteinogramas séricos de las vizcachas	Página 103
FIGURA 46. Nivel de IFN- γ en los sectores del cuerno uterino	Página 104
FIGURA 47. Nivel de IFN- γ en las vesículas embrionarias	Página 105
FIGURA 48. Nivel de IL-10 en los sectores del cuerno uterino	Página 106
FIGURA 49. Nivel de IL-10 en las vesículas embrionarias	Página 106
FIGURA 50. Electroestimulador para <i>L. maximus</i>	Página 108
FIGURA 51. Dispositivo para estímulo de temperatura	Página 109

FIGURA 52. Electroestimulación del macho de <i>L. maximus</i>	Página	109
FIGURA 53. Macroscopía del pene de <i>L. maximus</i>	Página	111
FIGURA 54. Análisis histológico del pene de <i>L. maximus</i>	Página	112
FIGURA 55. Microscopía electrónica de barrido del pene	Página	113
FIGURA 56. Vitalidad	Página	114
FIGURA 57. Análisis computarizado de los espermatozoides	Página	115
FIGURA 58. Muestras pre-centrifugadas de los espermatozoides	Página	115
FIGURA 59. Muestras post-centrifugadas de los espermatozoides	Página	116
FIGURA 60. Histología de los cuernos uterinos tratados con macerados de próstata y conductos deferentes	Página	117
FIGURA 61. Histología de los ovarios de vizcachas inducidas	Página	118
FIGURA 62. Macroscopía de los ovarios de animales tratados con plasma seminal (IM)	Página	120
FIGURA 63. Lavado de oviducto de animales tratados con plasma seminal (IM)	Página	121
FIGURA 64. Histología del ovario de animales tratados con plasma seminal	Página	122

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Actividades mediadas por las citocinas producidas por células Th1 y Th2	Página	24
TABLA 2. Anticuerpos primarios utilizados para IHQ e IF	Página	51
TABLA 3. Anticuerpos secundarios utilizados para IHQ e IF	Página	51
TABLA 4. Morfometría de los espermatozoides de <i>L. maximus</i>	Página	58
TABLA 5. Concentración de hormonas esteroideas (E ₂ y P ₄) en placenta de <i>L. maximus</i>	Página	79
TABLA 6. Elisa de LIF en cuernos uterinos de hembras preñadas	Página	91
TABLA 7. Concentración de hormonas esteroideas (E ₂ y P ₄) en los ovarios de los distintos estadios reproductivos de <i>L. maximus</i>	Página	101
TABLA 8. Concentración de hormonas esteroideas (E ₂ y P ₄) en las secciones uterinas de los diferentes ovarios de los distintos estadios reproductivos	Página	102
TABLA 9. Concentración de hormonas esteroideas (E ₂ y P ₄) en las vesículas embrionarias de preñez temprana	Página	102

1. ABREVIATURAS

%: Porcentaje

°C: Grado centígrado

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µm: Micrómetro

µm²: Micrómetro cuadrado

ABC: Avidina-avidina-peroxidasa

Ac.: Anticuerpo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud media de desplazamiento lateral de cabeza

AMe: Antimesometrial

BCF: Frecuencia de batido

BSA: Albúmina de suero bovino

CD: Célula dentrítica

CEBBAD: Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico

CICUAE: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación

CICUAL: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

CIDME: Centro de Investigación y Desarrollo en Medicina Experimental

CL: Cuerpo lúteo

CLA: Cuerpo lúteo accesorio

cm: Centímetro

COX: Ciclooxygenasa

COX₁: Ciclooxygenasa 1

COX₂: Ciclooxygenasa 2

cpm: Cuentas por minuto

D: Decidua

DAB: 3,3'diaminobencidina

DIC: Microscopía diferencial-interferencial combinada

dl: Decilitro

DNAsa: Desoxirribonucleasa

dpc: Días post-coito

DS: Desvío estándar

E: Días de vida del embrión

Emx: Vesícula embrionaria

E2: 17- β estradiol

ECAS: Estación de Cría de Animales Silvestres

eCG: Gonadotrofina Coriónica Equina

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

En: Endodermo embrionario

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial

f: Frecuencia

FasL: Fas ligando

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FSH: Hormona folículo estimulante

FV: Vaso sanguíneo fetal

g: Gramo

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GPB: Buffer fosfosalino de gelatina

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

HEV: Vénulas de endotelio alto

HHG: Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal

HRP: Peroxidasa de rábano

hs: Horas

HyE: Hematoxilina y eosina

Hz: Hercios

ICM: Macizo celular interno

IF: Inmunofluorescencia

IFN- α : Interferón alfa

IFN- γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IgG: Inmunoglobulina G

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

IM: Intramuscular

IV: Intravenoso

Jak: Janus quinasas

kg: Kilogramos

KV: Kilovoltio

LAB: Laberinto

LB: Linfocitos B

LE: Epitelio luminal

LH: Hormona luteinizante

LIF: Factor inhibidor de leucemia

LIN: Índice de linealidad

LT: Linfocito T

m³: Metro cúbico

M: Molar

mA: Miliampere

MCP: Muerte celular programada

Me: Mesometrial

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MET: Microscopía electrónica de transmisión

mg: Miligramo

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MHz: Megahercio

ml: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

n: Número de animales

N°: Número

NaCl: Cloruro de sodio

ng: Nanogramo

NIH: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos

NK: Célula natural killer

NKT: Célula natural killer T

NKu: Célula natural killer uterina

nm: Nanómetro

NO: Óxido nítrico

P4: Progesterona

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBS: Buffer fosfato salino

pg: Picogramo

PGs: Prostaglandinas

pH: Potencial hidrógeno

PIBF: Factor bloqueador inducido por progesterona

PKC: Proteína cinasa C

PRL: Prolactina

r: Coeficiente de correlación

RER: Retículo endoplasmático rugoso

RIA: Radioinmunoensayo

RIPA: Ensayo de radioinmunoprecipitación

r.p.m: Revoluciones por minuto

S: Estroma

s: Segundos

S1: Sección del cuerno uterino más cercana al cérvix

S2: Sección intermedia del cuerno uterino

S3: Sección del cuerno uterino más cercana al ovario

SA: Sociedad Anónima

SD: Desvío estándar

SFB: Suero fetal bovino

Sp: Espermatozoides

SPC: Secado a punto crítico

STAT: Proteína de transductores de señal y activadores de la transcripción

STR: Índice de rectitud

T: Trofoblasto

T CD4+: Linfocito T colaborador

T CD8+: Linfocito T citotóxico

TdT: Deoxinucleotidil-transferasa terminal

TE: Trofoectodermo

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta

Th1: Linfocito T helper 1

Th0: Linfocito T helper precursor

Th2: Linfocito T helper 2

Th17: Linfocito T helper 17

TMB: Tetrametilbencidina

TNF: Factor de necrosis tumoral

Tris HCl: Trisaminometano hidrocloreuro

TRS: Trophospongium

U: Unidades

UI: Unidades internacionales

VAP: Velocidad promedio

VCL: Velocidad curvilínea

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

VSL: Velocidad rectilínea

p/v: Relación peso sobre volumen

WOB: Índice de oscilación

Zp: Zona pelúcida

2. RESÚMENES

2.1 RESUMEN EN IDIOMA ESPAÑOL

“Caracterización del proceso de implantación en *Lagostomus maximus*: un mamífero con poliovulación y reabsorción embrionaria selectiva”.

L. maximus presenta características reproductivas inusuales en los mamíferos euterios como su elevada tasa de ovulación y un proceso de reabsorción embrionaria selectiva durante la primera mitad de la preñez. A pesar de tener una alta tasa ovulatoria, sólo 8 a 12 oocitos son fecundados e implantados y el embrión más cercano al cérvix en cada cuerno uterino presenta un desarrollo normal; el resto sufre reabsorción. Una gestación exitosa requiere un balance inmunológico Th1/Th2 inclinado hacia la actividad Th2; la prevalencia de Th1 se asocia con reabsorción fetal. En animales domésticos, el 80% de las pérdidas embrionarias ocurre durante el período de peri-implantación. La insuficiencia de progesterona (P4) en circulación uterina podría generar una considerable pérdida de embriones. El objetivo de este trabajo fue analizar las posibles causas y mecanismos del inusual proceso de reabsorción embrionaria selectiva que presenta *L. maximus* y su vinculación con la respuesta inmunológica. En *L. maximus* la decidualización y la reabsorción se presentan como dos procesos que suceden de manera diferida y en sentido inverso a lo largo del cuerno uterino. El sector uterino más cercano al cérvix presentó mayor concentración de P4. El único embrión que se gesta a término mostró mayores niveles de P4 y estrógeno (E2). La presencia de mayores niveles hormonales se debería a que la arteria uterina, rama de la arteria ilíaca, tiene un trayecto ascendente. Durante la preñez se encontraron niveles bajos de IL-10 con marcada presencia de IFN- γ , indicando una respuesta Th1 activa. La reabsorción embrionaria estaría generada por apoptosis, seguida de necrosis. Los niveles de P4 podrían no ser suficientes para generar la inmunoprotección fetal. Ante el descenso de P4 durante la gestación, se daría la secreción de citocinas de Th1 perjudiciales para el feto; al producirse la pseudoovulación durante la preñez, los cuerpos luteos accesorios producen un nuevo aumento de P4 salvando el único feto más cercano al cérvix. En *L. maximus* las alteraciones hormonales durante la preñez darían cambios en el sistema inmunológico generando como resultado final la reabsorción embrionaria selectiva. Por último, el hallazgo de espículas peneanas en *L. maximus* permitió establecer el probable carácter de ovulador inducido.

Palabras claves: *L. maximus*; reabsorción embrionaria; implantación; respuesta inmunológica.

2.2 RESUMEN EN IDIOMA INGLÉS

"Characterization of implantation in *Lagostomus maximus*: a mammal with polyovulation and selective embryo resorption"

Among Eutherian mammals, *L. maximus* shows many unusual reproductive traits such as a high ovulation rate and a process of selective embryo resorption that occurs during the first half of gestation. Despite the high ovulatory rate, a few 8 to 12 oocytes are fertilized and implanted, and just the embryos nearest to the cervix develop normally to term; the remaining embryos are resorbed. A balance between immunological Th1/Th2 processes biased in favor of Th2 activity is needed for a successful gestation; prevalence of Th1 processes is associated with fetal miscarriage. In domestic animals, 80% of embryo loss occurs at the peri-implantation period. Insufficient levels of uterine progesterone (P4) may induce a considerable embryo loss. The aim of this investigation was to analyze the possible causes and mechanisms involved in the unusual embryo resorption process shown in *L. maximus* and its relationship with immune response. In *L. maximus* decidualization and embryo resorption are found as two processes that occur in a deferred and reversed way along the uterine horn. The uterine area nearest the cervix showed the higher P4 concentration. The only embryo that is gestated to term showed the highest levels of P4 and estradiol (E2). This presence of high hormonal levels has its origin in the ascending trajectory of the uterine artery, a branch of iliac artery. During pregnancy, low levels of IL-10 were found with a marked presence of IFN- γ indicating an active Th1 immune response. Embryo resorption would be originated through apoptosis followed by necrosis, P4 levels being insufficient to trigger the immunoprotection of the embryo. The decrease of P4 during gestation would be responsible of embryo-harmful Th1 cytokine release. When pseudo ovulation takes place at mid-gestation, the formation of secondary CL induces a new rise of P4 which helps to rescue the only surviving foetus from resorption. In *L. maximus*, hormonal alterations during pregnancy induce changes in the immune system that generate the selective embryo resorption. Finally, the finding of penile spikes in males led to establish *L. maximus* as an ovulatory-induced species.

Palabras claves: *L. maximus*; embryo resorption, implantation, immune response.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 EL DESARROLLO EMBRIONARIO

La fecundación en los mamíferos comprende la migración del espermatozoide a través del tracto reproductor de la hembra, donde adquiere la capacidad de fecundar el oocito (Chang, 1951), y la interacción entre el oocito y el espermatozoide en el oviducto.

El desarrollo embrionario temprano (Figura 1) se inicia tras la fecundación en el oviducto. El espermatozoide atraviesa el cumulus oophorus que rodea al oocito recientemente ovulado, luego penetra la zona pelúcida (Zp) y se fusiona con la membrana plasmática del oocito. Durante la fusión de membranas, el oocito es activado y sufre cambios que dan inicio al desarrollo embriológico: finaliza la meiosis, se produce la exocitosis de los gránulos corticales que previenen la fecundación por parte de otros espermatozoides, y se forman los pronúcleos femenino y masculino que contienen el material genético aportado por el oocito y el espermatozoide, respectivamente. Los pronúcleos se aponen en el centro del oocito fecundado, conformando la primera placa metafásica del desarrollo, y dando inicio a la primera división celular del cigoto (Runft y col., 2002; Whitaker, 2006).

La etapa del desarrollo embrionario medio, abarca desde el clivaje a dos células y continúa con sucesivas divisiones celulares mitóticas. Incluye la formación de la mórula y la compactación (Maro y Pickering, 1984).

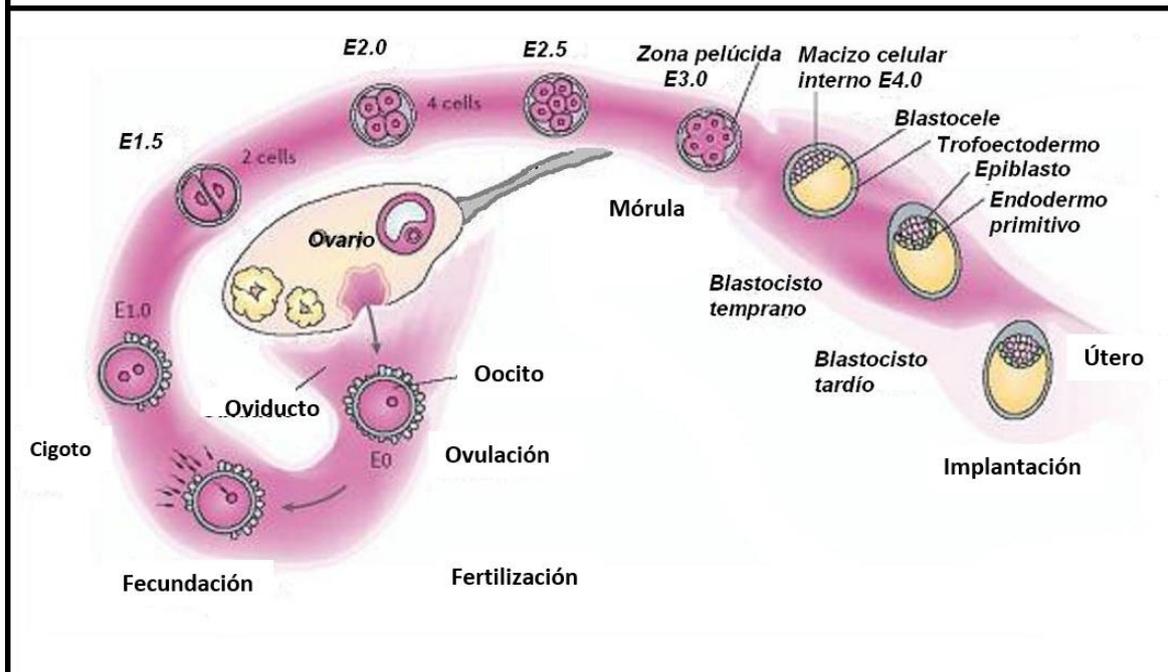
El desarrollo embrionario tardío o pre-implantatorio abarca desde la cavitación hasta la formación de un blastocisto expandido con dos poblaciones celulares diferenciadas: el macizo celular interno (ICM), que dará origen al embrión propiamente dicho y parte de sus membranas extraembrionarias, y el trofoectodermo (TE), que dará lugar a las estructuras extraembrionarias (Gardner, 1968).

3.1.1 Período de peri-implantación

El desarrollo pre-implantatorio de los embriones de los mamíferos comprende el período que va desde la formación del cigoto hasta la implantación del embrión en el útero. Antes de la implantación, el blastocisto escapa de la Zp y se diferencia para producir el epiblasto y el endodermo primitivo. En esta etapa, el blastocisto se une al revestimiento uterino para iniciar el proceso de implantación.

Para que la gestación se establezca, debe ocurrir la implantación embrionaria, la placentación y la tolerancia inmunológica de la hembra gestante para que no haya un rechazo a los antígenos extraños del feto (Espinosa, 2011).

FIGURA 1. FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIOLÓGICO PRE- Y PERI- IMPLANTACIÓN.



En el oviducto sucede la fecundación; el oocito fecundado sufre una serie de divisiones mitóticas hasta formar un agregado celular compacto de alrededor de 16 células, denominado mórula. Las células más periféricas de la mórula se polarizan y generan líquido que se acumula en el espacio intercelular provocando la formación de una cavidad, el blastocele, y transformando la mórula en blastocisto. La acumulación de líquido en el blastocele provocará finalmente la ruptura de la zona pelúcida permitiendo la eclosión del blastocisto que se adhiere a la pared uterina y se implanta. E: días de vida del embrión.

La receptividad endometrial se define como el período de “ventana de implantación”, tiempo durante el cual el endometrio se encuentra preparado para que el blastocisto se implante.

En los roedores, la primera respuesta del endometrio al blastocisto es el aumento de la permeabilidad capilar en el lugar en que se producirá la invasión.

La preparación de un útero receptivo, previo a la implantación, se consigue mediante efectos secuenciales de las hormonas esteroideas que desempeñan un papel fundamental. En el ratón y la rata la progesterona ovárica (P4) y el estrógeno (E2) son necesarios para la receptividad uterina (Psychoyos, 1973); en cambio, en los hámsters está regulada sólo por la P4 ovárica (Prasad y col., 1960). Estas hormonas promueven cambios morfológicos en el endometrio secretor, estimulan las glándulas endometriales y la mucosa uterina. Esta última se vuelve edematosa, hay infiltración leucocitaria, decidualiza, se torna más vascularizada y se favorecen los eventos posteriores como la invasión del blastocisto.

La P4 es una hormona esteroidea, con numerosas funciones biológicas, principalmente ligadas a eventos reproductivos; es esencial para la implantación y el mantenimiento de la preñez en todos los mamíferos.

Estudios recientes han revelado que las hormonas esteroideas producen modulaciones en la expresión de diferentes citocinas, factores de transcripción, factores de crecimiento, quimioquinas y moléculas de adhesión que participan en el proceso de implantación. Muchas moléculas de señalización actúan de manera integrativa y cronológica y son producidas localmente en el endometrio junto a las hormonas ováricas. Éstas sirven como factores autócrinos para la especificidad de la receptividad uterina, desempeñando un papel esencial en la preparación del endometrio para una futura implantación.

Las funciones de las citocinas durante la preñez temprana de los mamíferos es actualmente un área de intensa investigación. Muchas proteínas participan en el mantenimiento del cuerpo lúteo (CL), adhesión fetal e invasión, implantación, crecimiento y diferenciación fetal y placentaria. Sus funciones exactas y su importancia en el proceso de implantación aún no están claramente descifradas. La presencia local de una cantidad suficiente parece ser necesaria para la supervivencia embrionaria (Nasu y col., 1999). La implantación implica numerosas vías de señalización, la integración de estímulos y respuestas que exigen sincronización, muchas de ellas son ahora objeto de estudio. A pesar de los grandes avances que se han realizado durante los últimos años, el campo aún se enfrenta a muchos desafíos importantes. En animales domésticos, el 80% de las pérdidas embrionarias ocurre durante este período. Por esto, es de suma importancia entender las variadas señales que regulan la implantación.

3.1.2 Período de implantación

La implantación es un paso crítico donde se requiere una sincronización entre el tejido materno y el embrionario, para el establecimiento de una preñez exitosa (Guzeloglu-Kayisli y col., 2007). Este proceso dinámico comienza con la fijación del blastocisto en el útero y termina con la formación de la placenta definitiva. Intervienen principalmente dos elementos: el endometrio receptivo y el blastocisto competente. Su propósito principal es asegurar que las células trofoblásticas se anclen firmemente en el estroma endometrial. El diálogo materno-embrionario durante este período es crucial para el desarrollo del nuevo individuo.

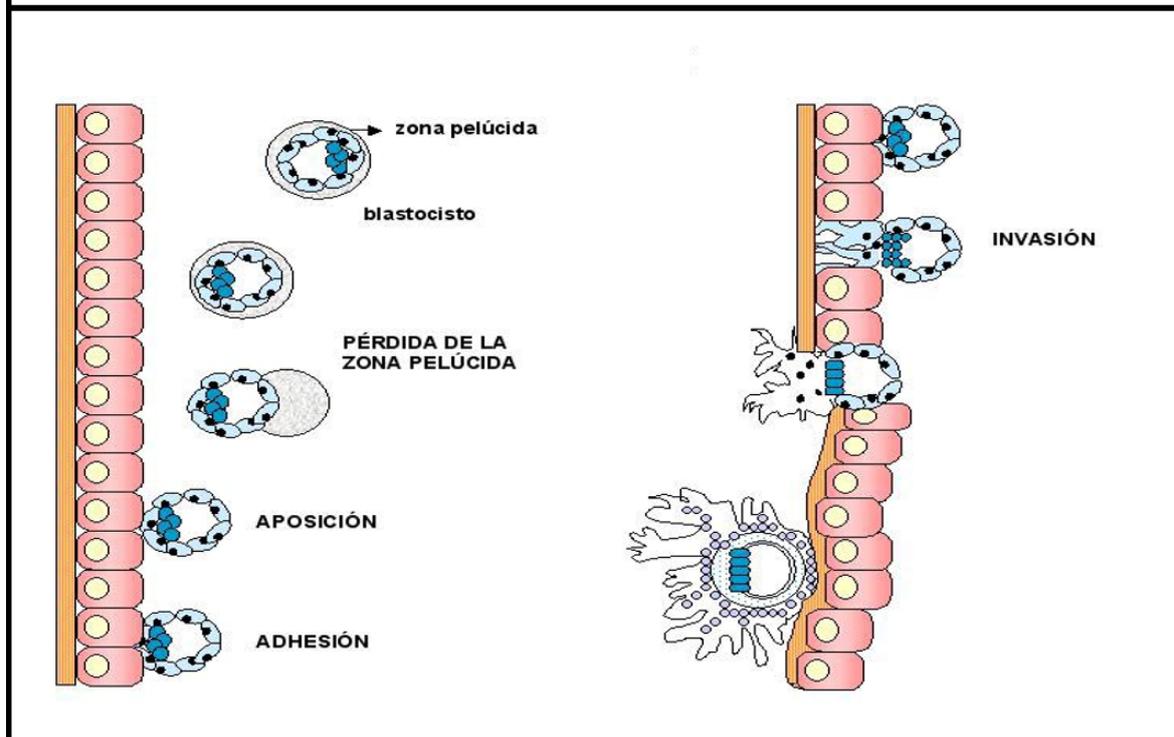
Si bien los procesos que tienen lugar entre la fecundación y el inicio de la implantación son similares entre los mamíferos, hay diferencias entre los mecanismos de implantación (Ginsburg y col., 1990). El tiempo implicado en el desarrollo pre-implantatorio varía de acuerdo a las especies. La implantación en la vizcacha ocurre a partir del día 18 post-coito

(dpc) (Roberts y Weir, 1973). Esto indica un período prolongado de permanencia de los embriones en el oviducto/útero previo a la implantación. Dentro del grupo de los Histricomorfos sería la especie con mayor período entre la fecundación y la implantación. Si se compara con el requerido por el ratón que es de 4,5 dpc y con otras especies de roedores, parecería prolongado. Sin embargo, si se lo compara con algunos animales domésticos no es tal. En el caso de los caninos la implantación ocurre el día 18 post-fecundación, durante este período se generan cambios endometriales como el edema. El retardo en la implantación se da porque los oocitos fecundados permanecen en oviducto hasta el estadio de mórula y pasan al útero entre el día 8 a 12. Luego, quedan flotando 3 días en el cuerno uterino y otros 3 días migran por el mismo hasta que ocurre la implantación. En el caso del equino la implantación ocurre el día 16 post-fecundación aproximadamente; previamente también realiza una migración por todo el cuerno uterino. Posiblemente estos fenómenos estén relacionados con la preparación del endometrio al reconocimiento del embrión para generar una respuesta inmune que impida su rechazo.

La implantación del blastocisto en el útero receptivo de mamíferos (Figura 2) es un proceso progresivo, que incluye diferentes etapas: ruptura de la Zp y liberación del blastocisto, pre-contacto del trofoblasto del blastocisto con el epitelio uterino y una aposición seguida de adhesión. Finalmente se inicia la invasión del estroma endometrial y se induce la decidualización (Bazer y col., 2009).

Para poder implantarse en el útero es necesario que el blastocisto se libere de la Zp; es por ello que la acumulación progresiva de líquido en el blastocelo produce un aumento sostenido de la presión interna que promoverá la ruptura de la Zp y la consiguiente liberación del blastocisto (Perona y Wassarman, 1986). Durante el estadio de aposición, las membranas plasmáticas de las células trofoblásticas y de las células epiteliales uterinas se encuentran yuxtapuestas, unidas por filamentos submembranosos permitiendo un contacto inestable. La adhesión es el resultado de los cambios moleculares en la superficie del trofoblasto y del endometrio para generar un contacto más estable. Las células del trofoblasto migran hacia el tejido uterino con la finalidad de invadirlo e implantarse en él. La invasión del trofoblasto asegura el anclaje de la placenta dentro del epitelio uterino, que a su vez le garantiza al feto los requerimientos necesarios para su nutrición y desarrollo. La invasión es debida a la producción de proteasas unidas a la membrana del trofoblasto o secretadas al espacio extracelular, que degradan la matriz extracelular.

FIGURA 2. ETAPAS DEL PROCESO DE IMPLANTACIÓN DE UN BLASTOCISTO.



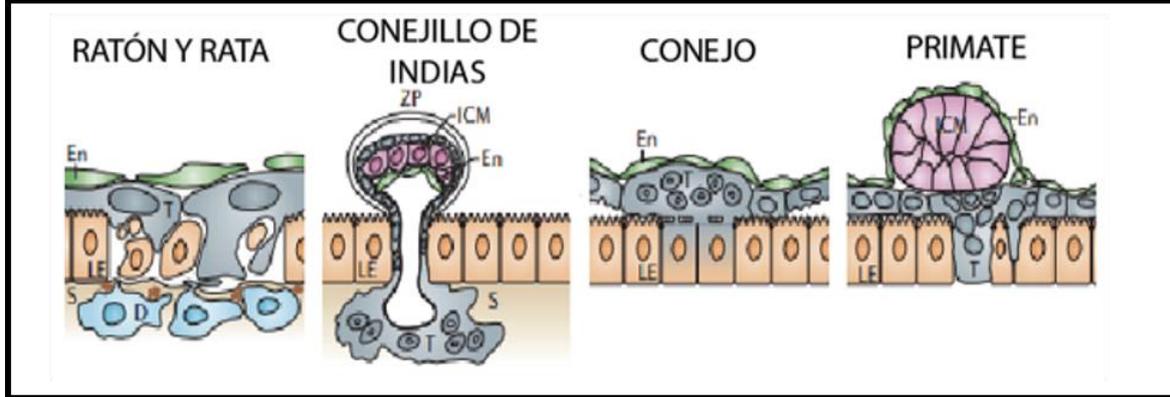
Se muestra la pérdida de la zona pelúcida, luego se da la aposición con el epitelio uterino seguido por una adhesión al mismo y una invasión. Tomado de National Institutes of Health (2001).

Estudios ultraestructurales han descrito que existen diferentes modelos de invasión en los mamíferos, según el tipo de penetración que se realice en el epitelio endometrial (Figura 3). Las células del trofoblasto pueden romper el epitelio luminal uterino, fusionarse con él o trasvasar entre las células uterinas alcanzando el estroma subyacente.

En el ratón y la rata, la adhesión del blastocisto al epitelio luminal se desencadena por apoptosis de las células endometriales, localmente en el sitio de unión, facilitando la penetración de las células trofoblásticas a través de la capa del epitelio luminal en el estroma. En el conejillo de indias, el trofoblasto sincicial produce protuberancias focales a través de la Zp y penetra en las células epiteliales atravesando la membrana basal e ingresando al estroma originando una placenta epitelio-corial. En el conejo, las células trofoblásticas se fusionan con el epitelio luminal.

En los primates, el trofoblasto se introduce en el útero penetrando la lámina basal estableciendo una placentación hemo-corial, donde la sangre materna está en contacto directo con el trofoblasto. Se conoce que en la vizcacha, el degú y el puerco-espín los blastocistos se ubican debajo del epitelio uterino.

FIGURA 3. ESTRATEGIAS DE IMPLANTACIÓN EN DIFERENTES ESPECIES.



En ratón y rata la adhesión del blastocisto al epitelio uterino se desencadena por apoptosis. En el conejillo de indias se genera produciendo protuberancias focales de la zona pelúcida. En el conejo se produce por fusión del epitelio uterino con las células trofoblásticas. En primates el trofoblasto se introduce en el útero. En: Endodermo embrionario. LE: Epitelio luminal. S: Estroma. T: Trofoblasto. Zp: Zona pelúcida. ICM: Macizo celular interno. D: Decidua. Adaptado de Carson (2000).

La decidualización, transformación del endometrio en decidua, es un requisito previo esencial para la implantación normal del blastocisto. Ante fallas en este proceso en el endometrio gestante, se originan desórdenes en la preñez con infertilidad, abortos recurrentes o disfunción útero-placentaria. El grado de decidualización está correlacionado con el grado de invasión del trofoblasto en las distintas especies. La decidua comienza a formarse cuando el blastocisto se implanta en el epitelio uterino, las células del trofoblasto penetran las capas del útero conectando con las células del estroma endometrial. Durante este proceso se producen cambios morfológicos y fenotípicos, se dan cambios en las glándulas epiteliales y ocurre remodelación vascular. Hay una proliferación de las células del estroma, se diferencian en células más especializadas, denominadas células deciduales, que se caracterizan por ser de mayor tamaño, multinucleadas y poliploides. Los cambios en el estroma están regulados por la P₄ (Loke y King, 1996). Bajo los efectos de esta hormona, la zona decidual primaria desaparecería y se formaría la zona decidual secundaria, formada por las células decidualizadas con capacidad funcional activa; estas células secretan citocinas, factores de crecimiento, hormonas y proteasas. Estos cambios ocurren en el sitio donde el blastocisto se va a implantar. Las células deciduales estromales son el principal componente celular de la decidua y forman parte de la denominada interfase materno-fetal. El aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis también son necesarias para la implantación exitosa, la decidualización y la placentación. En este proceso intervienen diversos factores angiogénicos como el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

(VEGF), el Óxido Nítrico (NO), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) y la ciclooxigenasa (COX).

El primer signo macroscópico identificable de la implantación en todas las especies estudiadas, con excepción de los humanos, es el aumento en la permeabilidad vascular endometrial localizada en áreas adyacentes al blastocisto (Psychoyos, 1973) que conduce al desarrollo de un endometrio receptivo.

3.1.3 Principales factores que intervienen en el proceso de implantación

3.1.3.1 Factor inhibidor de leucemia (LIF)

En muchas especies de mamíferos, incluido el hombre, la expresión de esta citocina uterina es coincidente con el inicio de la implantación. En ratones, LIF es esencial para este proceso y se demostró que sólo se requiere para inducir la receptividad uterina que permite la implantación del embrión y la decidualización. LIF no interviene en el desarrollo embrionario ni en el mantenimiento de la preñez (Chen y col., 2000).

El útero LIF-nulo o con una baja expresión de esta citocina conlleva a una falla en la implantación del blastocisto y genera una decidualización defectuosa (Fouladi-Nashta y col., 2005). Los roedores con delección del gen de LIF presentan infertilidad por fallas en la implantación que pueden ser revertidas con la administración de LIF exógeno (Borthwick y col., 2003; Hu y col., 2007).

Los patrones de la expresión de LIF en el endometrio de ratón y humano difieren ligeramente. En el ratón se detectan dos picos de expresión (Shen y Leder, 1992), el primero ocurre en la ovulación y el segundo alrededor del inicio de la implantación donde se limita la expresión de LIF al epitelio de las glándulas endometriales (Chen y col., 2000). En el humano, se ha encontrado un pico de expresión alrededor del tiempo de ovulación en el epitelio luminal y glandular. Esto difiere con el ratón que se limita al epitelio glandular. En ambas especies, si ocurre la fecundación, se establece la expresión de LIF en el epitelio luminal y glandular con una expresión transitoria (Cullinan y col. 1996).

La hormona que regula la expresión de LIF depende de la especie en estudio. En el ratón se expresa al cuarto día de gestación, con el aumento del E₂. Mientras que en el conejo se ha demostrado que la producción de LIF es estimulada por la P₄, siendo esta hormona necesaria para la implantación del blastocisto de esta especie.

3.1.3.2 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos como extensiones de vasos existentes; es esencial para la implantación normal y la placentación. La neovascularización extensa del endometrio también tiene lugar tras la transformación decidua en respuesta a la implantación embrionaria. VEGF es producido por el estroma endometrial, como fuente de actividad angiogénica que contribuye a la expansión de los vasos sanguíneos del estroma.

Es un potente mitógeno, regulador primario de los factores de crecimiento para los procesos de vasculogénesis y angiogénesis (Dey y col., 2004). VEGF es producido en el endometrio cuando éste ha sido invadido por el blastocisto, se detecta en todo el estroma endometrial, y durante la vascularización de la decidua se expresa en la parte basal. En los sitios de expresión se evidencian áreas de formación de nueva vasculatura (Shweiki y col., 1993). La hipoxia regula la producción de VEGF que induce la proliferación celular endotelial, favorece la migración celular y el crecimiento de las células endoteliales, modula el crecimiento y remodelación vascular que provoca el incremento de la permeabilidad vascular en el endometrio durante el proceso de la implantación, teniendo un papel importante en fases iniciales de esta etapa. La expresión de sus receptores en células endoteliales está regulada por el E₂ fundamentalmente y por la P₄ en menor proporción. La alteración del gen de VEGF en roedores da como resultado la muerte fetal intrauterina en la mitad de la gestación, con formación de vasos aberrantes (Hoozemans y col., 2004). Una disminución de sus niveles durante el desarrollo del embrión puede conducir a una disminución de la angiogénesis con consecuencias letales.

3.1.3.3 Óxido Nítrico (NO)

Tiene un papel importante en la señalización celular en muchos sistemas fisiológicos, incluyendo la reproducción. Ha sido demostrada su participación durante la gestación de los mamíferos (Novaro y col., 1997; Gagioti y col., 2000), en el proceso de la implantación. Su concentración es proporcional al número de trofoblastos a implantarse. El E₂ y la P₄ modulan la generación del NO en el útero (Dong y col., 1996). A su vez, VEGF regula la producción de NO, lo que indica que existe una retro-alimentación positiva entre estos dos factores (Hood y col., 1998). Se lo relaciona con la posibilidad de participar en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis y en los mecanismos citotóxicos involucrados en la intensa fagocitosis de células maternas lesionadas que se producen durante el proceso de implantación (Gagioti y col., 2000).

3.1.3.4 Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)

Participa de importantes eventos como la regulación del crecimiento embrionario normal y la implantación. Controla la extensión de la decidualización, la remodelación vascular del endometrio y el crecimiento muscular uterino preparándolo para el parto (Cerro y Pintar, 1997). Las proteínas de unión a IGF están presentes en el útero durante la gestación. Se expresa en el endometrio uterino, en el límite decidual, en la vasculatura decidual y en el miometrio durante la preñez.

3.1.3.5 Ciclooxigenasa (COX)

Es una enzima que convierte el ácido araquidónico en prostaglandinas (PGs) y presenta dos isoformas, Cox1 y Cox2. Ambas isoformas son esenciales para la implantación y la decidualización. Tiene una expresión transitoria en las células epiteliales y estromales en el sitio de aposición del blastocisto, lo que sugiere la asociación con el inicio de la decidualización (Chakraborty y col., 1996; Lim y col., 1999). En ratones, las hembras con deficiencia en Cox1 son fértiles, mientras que las hembras con deficiencia de Cox2 presentan múltiples fallas reproductivas en la ovulación, en la recepción de fertilización, en la implantación y en la decidualización (Lim y col., 1997).

3.2 INMUNOLOGÍA DE LA GESTACIÓN

El sistema inmunológico está capacitado para reconocer lo propio de lo no propio. Actualmente, se conoce que durante la preñez se generan modificaciones fisiológicas en la inmunidad innata y adaptativa que le permiten al embrión desarrollarse sin ser agredido por la respuesta inmune de la madre. Estos cambios que se manifiestan en el sistema inmune son consecuencia de los cambios hormonales durante la preñez.

Las citocinas, esenciales en la implantación del embrión, también lo son en el proceso de tolerancia inmunológica. Este proceso se controla por la integración de mecanismos promovidos por los diferentes tipos celulares presentes en la interfase materno-fetal que incluye: las células del trofoblasto, las células deciduales y los linfocitos T.

3.2.1 La inmunidad innata

La decidua está compuesta por una variedad de leucocitos pertenecientes principalmente a la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos, células natural killer uterinas –Nku- y células dendríticas). Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular con numerosas funciones fisiológicas reproductivas. Participan en el proceso de la implantación y en la tolerancia inmunológica durante la preñez. Junto a otras proteínas secretorias, hormonas, enzimas, células inmunitarias y otros factores, regulan importantes pasos de la invasión e implantación del trofoblasto. Actualmente se sabe que existe un “diálogo” molecular de tipo autócrino y parácrino entre las citocinas de origen embrionario y endometrial durante el denominado “período ventana” de la implantación. El sitio donde con mayor probabilidad tiene lugar el reconocimiento inmune del trofoblasto es la decidua. Los leucocitos de la misma consisten principalmente en células NKu (65-70%) y monocitos/macrófagos (15-20%).

Las células natural killer (NK) son linfocitos efectores que actúan produciendo citocinas. Se encuentran principalmente en el estroma de los órganos y en el interior de los folículos linfoides. Son activadas por varias interleuquinas (IL): IL-2, IL-15, IL-12 e IL-18. En particular, las IL-12 e IL-18 son liberadas por monocitos, macrófagos y células dendríticas e inducen la activación de las células NK. Durante el primer trimestre de la preñez, hasta el 40% de las células de la decidua son leucocitos, predominando NKu. Estos desempeñarían un papel crucial en la gestación ya que poseen propiedades reguladoras de la invasión fisiológica del trofoblasto en la decidua. En humanos está comprobado que interactúan con las células trofoblásticas controlando la vascularización y la invasión de la placenta. La muerte de las células NKu puede asociarse con una caída de P₄ (King, 2000); esto sugiere que su supervivencia está regulada hormonalmente, lo que no parecería ser un efecto directo de la P₄ ya que los leucocitos uterinos no presentan receptor de dicha hormona (Inoue y col., 1996; King y col., 1996; Stewart y col., 1998). En ratones, la ausencia de estas células conduce al fracaso del desarrollo embrionario.

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígenos más eficientes del organismo y las encargadas de activar los linfocitos T. Son alrededor del 1 al 2% de los leucocitos deciduales. Se ha comprobado que en la pared uterina del ratón aumentan la expresión de moléculas esenciales, necesarias para la interacción del embrión con el epitelio uterino, siendo indispensables para una implantación exitosa (Dekel y col., 2010). Esta población celular es modificada por las variaciones de los niveles hormonales durante la preñez.

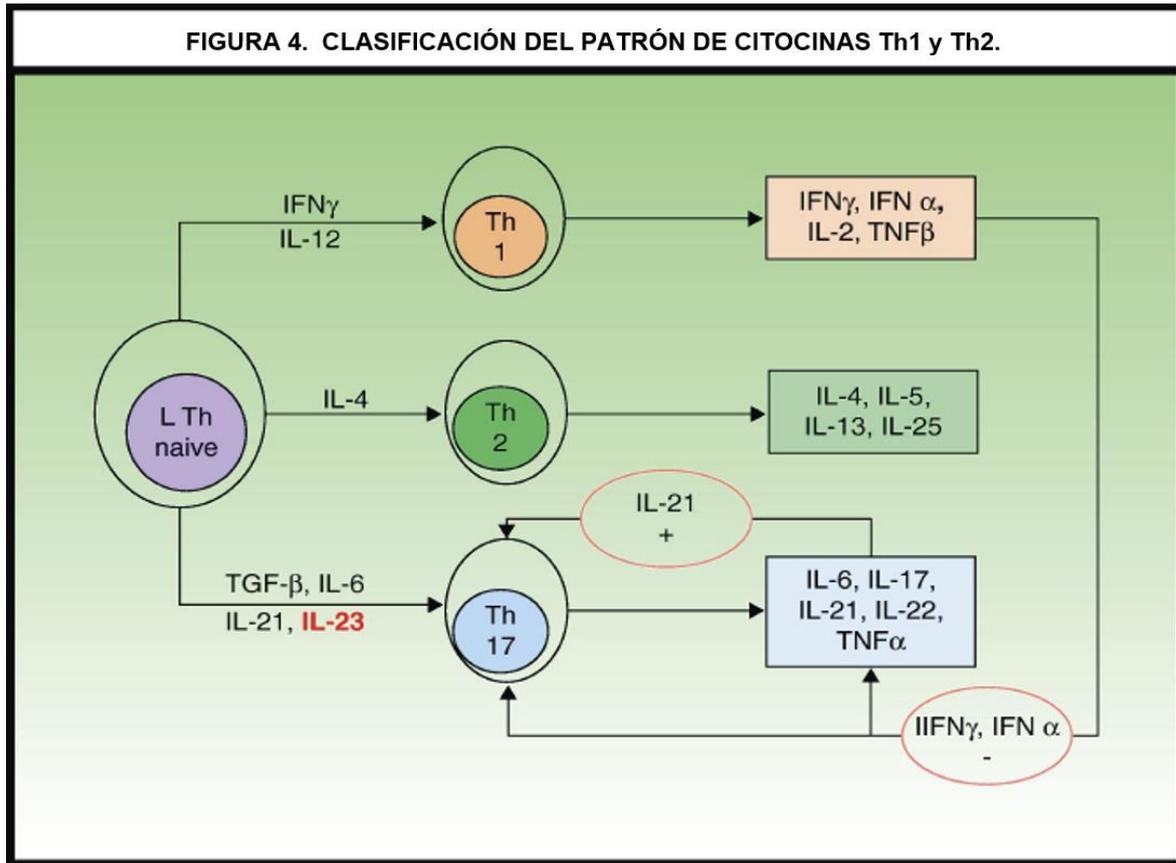
Los macrófagos se encuentran en el útero en mayor proporción durante la fase lútea en comparación a la fase secretora. Durante la preñez, constituyen entre un 20% a 30% de los

leucocitos de la decidua y su número permanece constante durante la gestación. Cooperan con las células del trofoblasto durante la implantación, participan en la remodelación de los vasos sanguíneos del útero, degradan la matriz extracelular y regulan la apoptosis.

3.2.2 La inmunidad adaptativa

El endometrio presenta una población leucocitaria compuesta principalmente por linfocitos T y macrófagos. La activación de los linfocitos T vírgenes determina la producción de células efectoras que comprenden, básicamente, dos diferentes subpoblaciones linfocitarias: células T CD8+ y T CD4+. A su vez, los linfocitos T helper (CD4+) pueden diferenciarse principalmente a dos subtipos de poblaciones con acciones distintas, células efectoras Th1 y las Th2. Ambas se desarrollan del mismo precursor Th0 CD4+ y el patrón de diferenciación es determinado por los estímulos presentes localmente durante la fase temprana del inicio de la respuesta inmune (Figura 4). En función del tipo de citocinas más prevalentes en el medio en el que se produce y las concentraciones hormonales, particularmente del E₂ y la P₄, se define el patrón de diferenciación de las células T (Piccinni y col., 1995; Miyaura e Iwata, 2002). La generación de respuestas Th1 y Th2 suele ser mutuamente excluyente. Los linfocitos Th17 son un tipo de células efectoras diferenciadas a partir de LT cooperadores que producen principalmente IL-17. Su principal función es el reclutamiento de los neutrófilos en un tejido afectado. Dado que para que ocurra una implantación exitosa se requiere de un proceso inflamatorio, se considera importante su presencia en la decidua. Sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva puede generar reabsorciones embrionarias (Saito y col., 2010).

FIGURA 4. CLASIFICACIÓN DEL PATRÓN DE CITOCINAS Th1 y Th2.



Los linfocitos vírgenes son activados y expresan un panel de citocinas que inducen el tipo de respuesta inmune de los linfocitos T helper CD4+. Tomado de Cuesta-Montero y Belinchón (2011).

Los linfocitos Th1 producen mayormente citocinas que favorecen la respuesta inmune celular y la respuesta a patógenos intracelulares (Tabla 1). Inducen varias acciones citotóxicas e inflamatorias mediadas por la acción de IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, Interferón gamma (INF- γ) y el Factor de necrosis tumoral (TNF- α). Son responsables de las reacciones inflamatorias de la inmunidad celular, la hipersensibilidad retardada, lesión tisular en las enfermedades infecciones y autoinmunes. Las células del trofoblasto tienen receptores de baja afinidad para las citocinas del perfil Th1. Las citocinas pro-inflamatorias disparan la activación de la cascada de coagulación generando vasculitis, infartos y deterioro placentario temprano. Éstas inhiben el desarrollo embrionario y el crecimiento del trofoblasto dando alteraciones en la invasión trofoblástica.

TABLA 1. ACTIVIDADES MEDIADAS POR LAS CITOCINAS PRODUCIDAS POR CÉLULAS Th1 y Th2.

CITOCINA	PRODUCIDA POR:	PRINCIPALES FUNCIONES
PERFIL Th1		
IL-12	Células Th1, T CD8+ y T CD4+ activadas	<ul style="list-style-type: none"> • Media la expansión clonal de linfocitos T activados • Estimula la producción de células NK
Interferón- γ	Células Th1, T CD8 citotóxicas, NK, macrófagos y células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> • Activa al macrófago y a las NK • Favorece la diferenciación de T CD4+ en perfil Th1
TNF- α	Células Th1, T CD8 citotóxicas, NK, células B, macrófagos y células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> • Induce una respuesta inflamatoria local y sistémica, actuando sobre diferentes tipos celulares
PERFIL Th2		
IL-4	Células Th2, mastocitos, NKT	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece la diferenciación de T CD4+ en perfil Th2 • Estimula la proliferación y diferenciación del linfocito B a plasmocito secretor de anticuerpos • Estimula la producción de mastocitos y eosinófilos
IL-5	Células Th2	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la producción y activación de eosinófilos • Estimula la producción de anticuerpos IgA
IL-6	Células Th2, macrófagos y células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> • Induce respuesta inflamatoria local y sistémica • Estimula la proliferación y diferenciación del linfocito B a plasmocito secretor de anticuerpos
IL-9	Células Th2	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la proliferación y diferenciación de los precursores de los mastocitos
IL-10	Células Th2, macrófagos, LB, LT reguladores	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece la diferenciación de T CD4+ en perfil Th2 • Estimula la proliferación y diferenciación del linfocito B a plasmocito secretor de anticuerpos • Inhibe la activación del macrófago
IL-13	Células Th2	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece la diferenciación de T CD4+ en perfil Th2 • Favorece la producción de anticuerpos IgE • Estimula la producción de mastocitos y eosinófilos

Adaptado de Vermeulen (2005).

El interferón gamma (INF- γ) es una citocina típica de la respuesta celular secretado por las NK en el útero. Es la principal citocina producida por la Th1. Interviene en la remodelación de las arterias deciduales siendo necesario para el éxito de la implantación. En ratón regula la producción de VEGF por parte de las NK. En el humano está estudiado que se produce sólo al final de la preñez, pero a niveles muy bajos. El IFN- γ se encuentra incrementado en mujeres que abortan en más de una oportunidad (Vives y col., 1999). Las cantidades excesivas del mismo en conjunto con IL-1 y TNF- α llevan a la apoptosis del trofoblasto (Ashkar y col., 2010), ocasionando abortos espontáneos. En un ambiente inflamatorio, los macrófagos secretan altas concentraciones de IL-12 que estimula la secreción de IFN- γ por las NK, lo que lleva a inhibir la angiogénesis.

El TNF- α es una citocina pro-inflamatoria producida por las células NK, los monocitos, los macrófagos y el trofoblasto. Promueve la apoptosis, la quimiotaxis de los macrófagos y el desarrollo de la respuesta Th1.

IL-12 es una citocina producida por macrófagos y células dendríticas activadas. Induce la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en un perfil Th1.

Los linfocitos Th2 producen citocinas que están involucradas en la regulación de la respuesta inmune humoral, antiparasitaria y alérgica e inhibe la respuesta Th1 (Tabla 1). Producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y el Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Bajas concentraciones de las citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 y LIF en el tejido endometrial y en la decidua pueden ocasionar fallas en la implantación ocasionando abortos recurrentes.

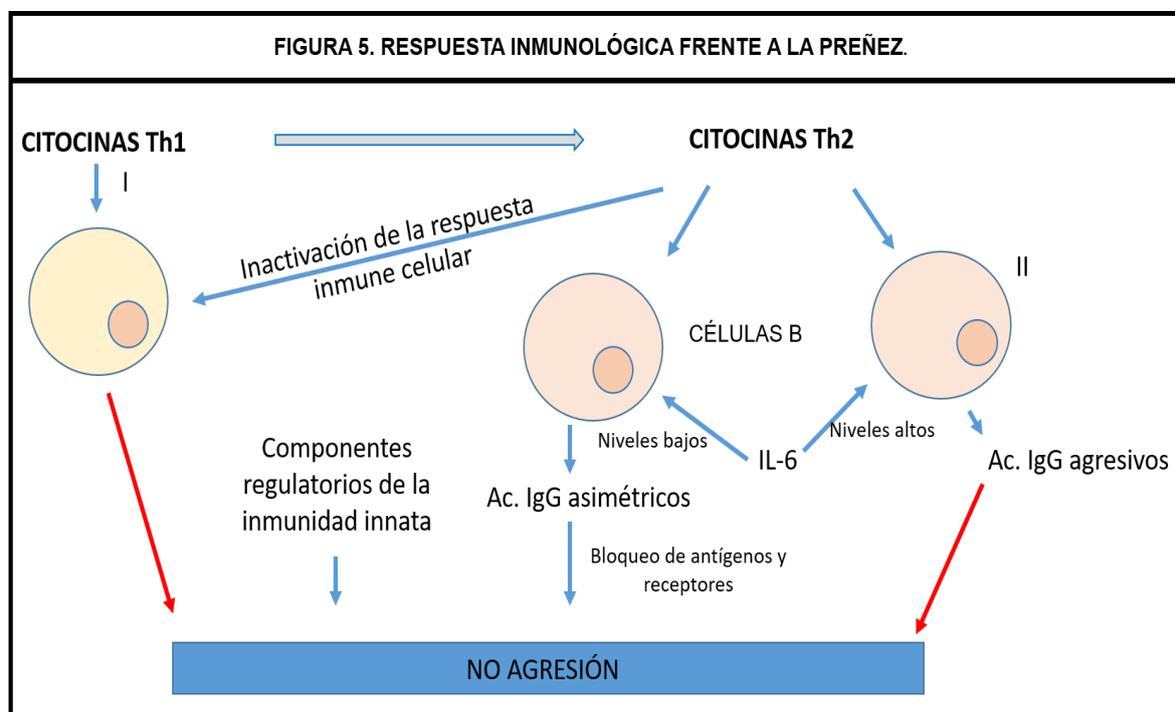
IL-4 es secretada por linfocitos infiltrados en el endometrio y estimula la producción de LIF. Induce la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th2.

IL-10 es una citocina antiinflamatoria de producción local. Impide el rechazo inflamatorio de las células Th1 contra la unidad fetoplacentaria (Ashkar y col., 2000). Se considera una de las citocinas más importante para el mantenimiento de la preñez. Está implicada en la inmuno-modulación y en la tolerancia inmune fetal. El déficit de IL-10 en la decidua en diferentes estadios de la preñez contribuye a gestaciones patológicas, durante el primer trimestre se asocia con abortos y en las mujeres se vincula con la preeclampsia.

3.2.3 Inmunidad durante la gestación

En el caso de producirse la fecundación, la respuesta humoral favorecerá el no rechazo fetal, mientras que si estuviera aumentada la respuesta citotóxica causaría la muerte embrionaria (Reinhard y col., 1998; Poole y Claman, 2004). Para una gestación exitosa se ha postulado que se requiere un balance Th1/Th2 fuertemente inclinado hacia la actividad

Th2 probablemente por los cambios hormonales (Holmes y col., 2003). Se ha estudiado que una prevalencia de la respuesta Th1 sobre la Th2 se asocia con tasas mayores de reabsorciones fetales y fallos en la implantación. Las citocinas asociadas a una respuesta Th2, contribuyen a la implantación del embrión, al desarrollo de la placenta y a la supervivencia del feto hasta la gestación a término (Dealtry y col. 2000). En roedores se evidenció que la preñez exitosa está asociada con el predominio de citocinas antiinflamatorias en el microambiente uterino de Th2, IL-4 e IL-10 (Hanna y col., 2000; Hunt, 2000). Mientras que si predominan las Th1 como IFN- γ y TNF- α afectarían la preñez dando reabsorciones embrionarias (Figura 5).



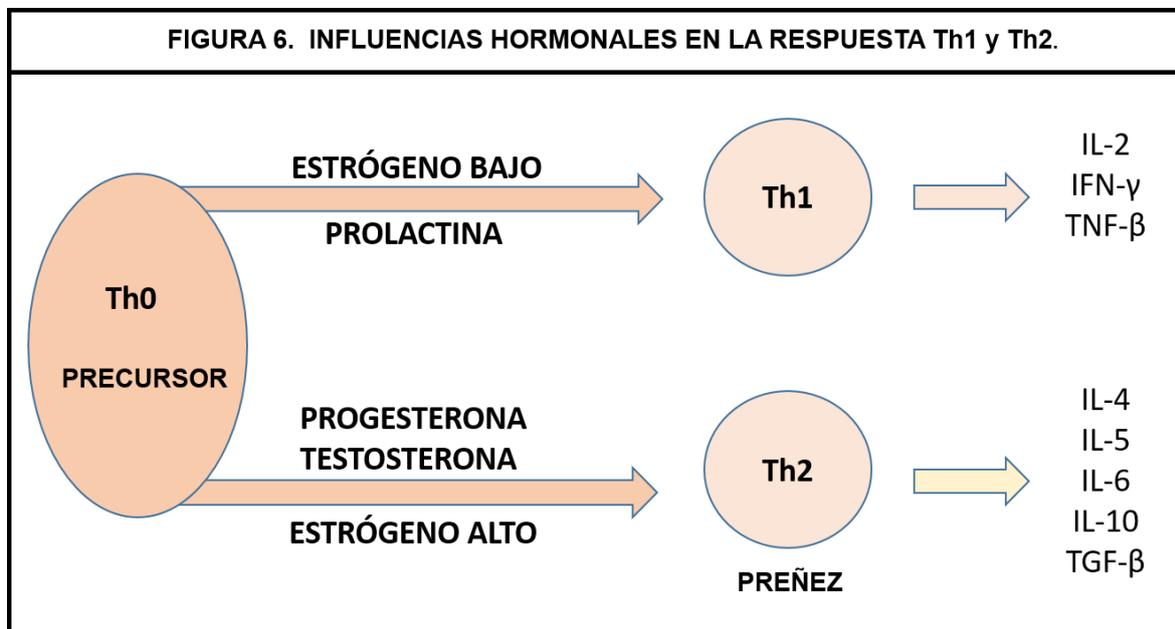
La preñez exitosa está asociada con el predominio de citocinas antiinflamatorias Th2. Mientras que si predominan las Th1 afectarían la preñez. Vías regulatorias: \rightarrow componentes activos, \rightarrow componentes inactivos o no secretados. La activación de las vías I y II son perjudiciales para una preñez exitosa.

Los componentes del plasma seminal influyen en la expresión de citocinas de las células endometriales; activan elementos de la inmunidad innata en el estroma endometrial y en la cavidad uterina. Estos últimos activados son la fuente más importante de citocinas Th1.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso necesario durante la implantación embrionaria en humanos, roedores y lagomorfos. Este evento se requiere para la homeostasis celular, la remodelación tisular y el desarrollo placentario. Sin embargo,

requiere de regulación dado que una tasa excesiva de apoptosis puede conducir a la reabsorción embrionaria. Las citocinas inflamatorias son capaces de activar los genes Fas/FasL, desencadenando la apoptosis, mientras que las citocinas antiinflamatorias protegen al trofoblasto de la apoptosis.

Mor y col. (2006) han postulado una regulación endócrina del sistema inmunológico que se produciría durante la gestación. Su hipótesis es que si durante la diferenciación del precursor de Th0 existen bajos niveles de E₂ y altos niveles de Prolactina (PRL), se favorece la diferenciación de la línea Th1, mientras que si, como ocurre en la gestación, esta maduración del Th0 se produce en presencia de altos niveles de E₂ y P₄, se favorece la línea Th2, beneficioso para el mantenimiento de la preñez, ya que no se produce el rechazo materno-fetal (Figura 6).



Las hormonas esteroideas sexuales inducen el desarrollo de una subclase e inhiben el desarrollo de otra. El estrógeno tiene un efecto dual dependiente de la concentración. La progesterona y la testosterona favorecen la expansión de las células Th2. Adaptado de De León Nava y Morales Montor (2006).

El E₂ estimula la producción de anticuerpos, reduce el número y la actividad de las células NK, aumenta el número y la actividad de los granulocitos, macrófagos y aumenta la respuesta Th2.

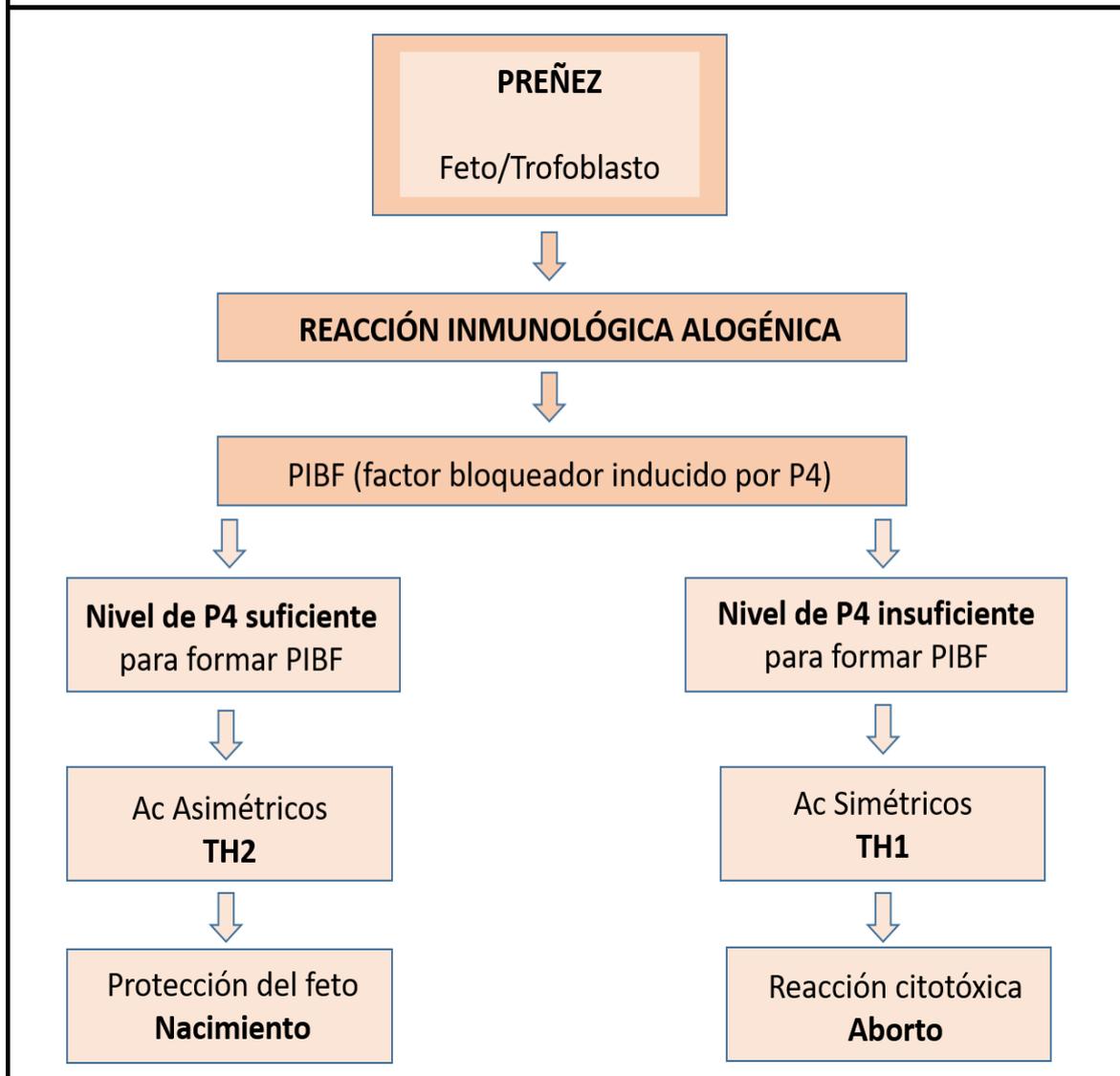
Hay inmuno-moduladores que protegen al feto durante la preñez, como la P₄. Ésta afecta el balance Th1/Th2 durante la misma, evento indispensable para contrarrestar el rechazo inmunológico materno. La producción de citocinas podría ser influenciada por esta hormona interactuando de forma parácrina sobre la polaridad de los linfocitos circulantes. A su vez, la

P4 ejerce efectos inmunosupresores durante la gestación al favorecer la secreción de citocinas de tipo Th2 por los linfocitos T, contribuyendo en la tolerancia inmunológica que permite la supervivencia del feto al evitar el rechazo de la placenta, que es considerada como un alo-injerto dentro del útero (Peltier, 2003). El enlace entre el sistema inmunológico y la P4 es a través de receptores para esta hormona que se encuentran en células mononucleares, en linfocitos T de sangre periférica en mujeres gestantes y en NK circulantes. La insuficiencia de las concentraciones de P4 en circulación uterina podría generar una considerable pérdida de embriones. La P4 inhibe la activación y la proliferación linfocitaria, aumenta la apoptosis de los linfocitos T y B, inhibe la generación y la actividad de las células killer, induce la producción del factor bloqueador inducido por progesterona (PIBF), inhibe la producción de anticuerpos y reduce la respuesta Th1. Szekeres-Bartho y col. (2005) señalaron que la proteína PIBF, que se sintetiza por acción de la P4 en linfocitos de mujeres gestantes, disminuye el número de macrófagos, IL-8, induce la producción de citocinas Th2 y regula los efectos inmunológicos de la P4 con actividad principalmente inmunosupresora. PIBF permite la fosforilación del receptor de IL-4 y de la proteína kinasa C (PKC), con activación subsecuente de la vía de señalización Jak/STAT, induciendo genes que no sólo afectan a la respuesta inmune, sino que también podrían participar en la invasión del trofoblasto. Así mismo, PIBF bloquea la acción de la fosfolipasa A2, evitando así la liberación del ácido araquidónico y la producción de prostaglandinas y/o leucotrienos, lo que conduce a disminuir la IL-12 por los linfocitos periféricos de mujeres gestantes dependiente de esta vía (Srivastava y col., 2007). Las concentraciones bajas de P4 no gatillan la producción de PIBF y se producen citocinas Th1, que inducirán el rechazo inmunológico del embrión (Druckmann y Druckmann, 2005) (Figura 7).

Por lo expuesto anteriormente, es indudable la interrelación del sistema endocrino con el sistema inmunológico. Las alteraciones hormonales tienen como consecuencia alteraciones inmunológicas (Barañaño, 2009) que pueden ocasionar abortos a repetición. Una asociación de la disminución de IL-10 con pronunciada presencia de IFN- γ puede alterar la inmunidad local que finalmente conduce a un resultado adverso de la preñez (Plevyak y col., 2002).

En los últimos años se ha planteado un nuevo desafío, estudiar qué sucede localmente en el útero. Dado que la mayoría de las investigaciones se efectuaron en la circulación materna no debe asumirse que los eventos circulatorios tengan, necesariamente, una asociación con los que ocurren en la decidua.

FIGURA 7. MECANISMO DE REGULACIÓN INMUNOLÓGICA DURANTE LA GESTACIÓN.

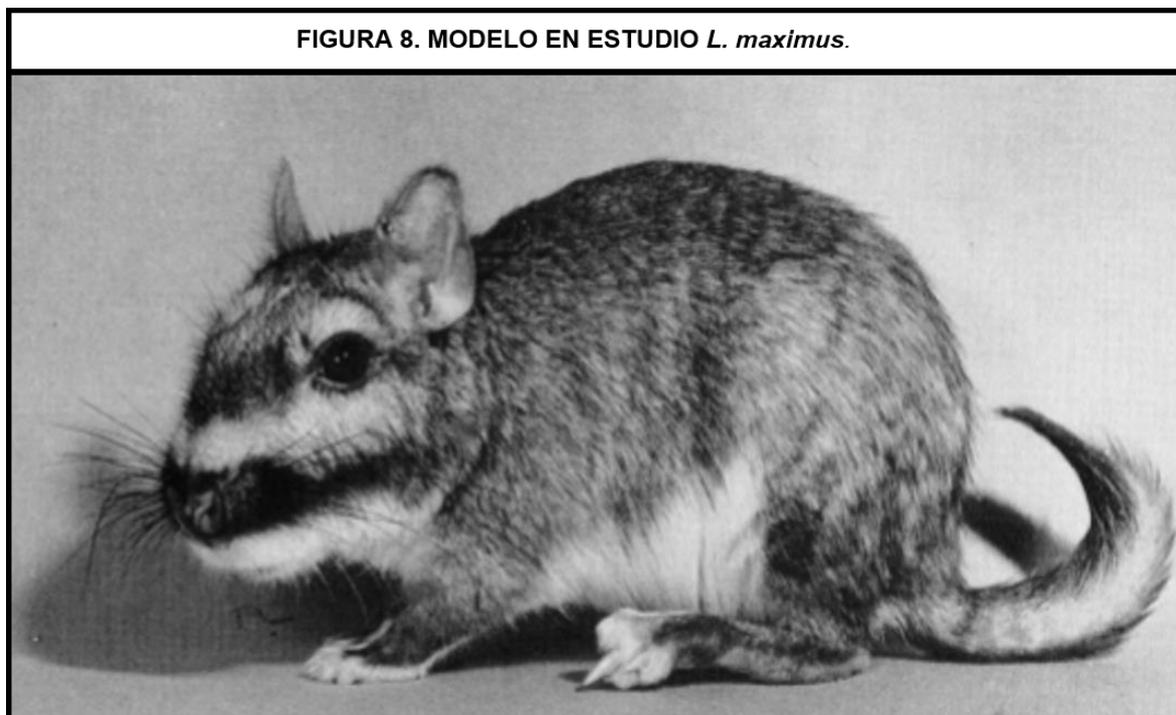


Se postula que en presencia de niveles altos de P4 se produce PIBF con la consecuente generación de citoquinas Th2 que favorece el no rechazo fetal, mientras que las bajas concentraciones de P4 no gatillan la producción de PIBF y se producen citoquinas Th1, que inducirán el rechazo inmunológico hacia el embrión. PIBF: Factor bloqueador inducido por progesterona. P4: Progesterona. Ac: Anticuerpo. Adaptado de Druckmann y Druckmann (2005).

3.3 EL MODELO EN ESTUDIO: *Lagostomus maximus*.

La vizcacha de las llanuras, *Lagostomus maximus* (Figura 8), es un roedor caviomorfo que pertenece al suborden Hystricognatha. Es miembro de la familia Chinchillidae (Weir, 1970; Jackson y col., 1996) junto a otros dos géneros: *Chinchilla* (chinchilla) y *Lagidium* (vizcacha de montaña).

L. maximus es autóctono de la región pampeana de Argentina, y su distribución se extiende hasta Bolivia y Paraguay (Cabrera y Yepes, 1960; Cabrera, 1961; Weir, 1970). En el área de distribución se han descrito tres subespecies: *L. maximus maximus*, *L. maximus inmollis* y *L. maximus petidilens* (Llanos y Crespo, 1952; Jackson y col., 1996).



Vizcacha de las llanuras. Adaptado de Llanos y Crespo (1952).

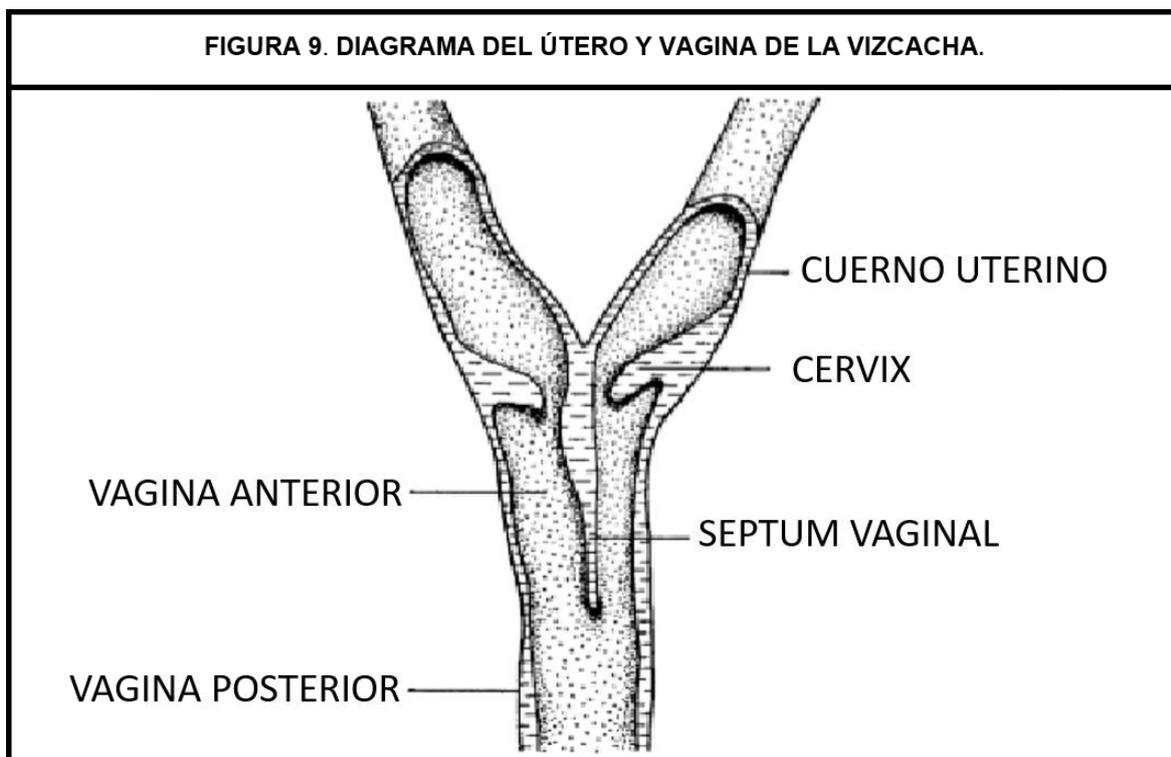
Los individuos de esta especie son animales de hábitos nocturnos, coloniales, con actividad todo el año (Branch y col., 1993). Habitan en cuevas, denominadas “vizcacheras”, que constituyen extensos sistemas de madrigueras que ellos mismos construyen. En las mismas, se puede encontrar de uno a tres machos adultos, hembras adultas y crías en crecimiento (Llanos y Crespo, 1952; Weir, 1970; Jackson y col., 1996). Esta especie tiene

una sobrevida de 7 a 8 años. Las hembras presentan un peso corporal promedio de alrededor de 4 kg, mientras que los machos llegan a los 6 kg (Llanos y Crespo, 1952).

L. maximus presenta características reproductivas poco frecuentes en los mamíferos euterios, tales como su elevada tasa de ovulación y un proceso de reabsorción embrionaria selectiva.

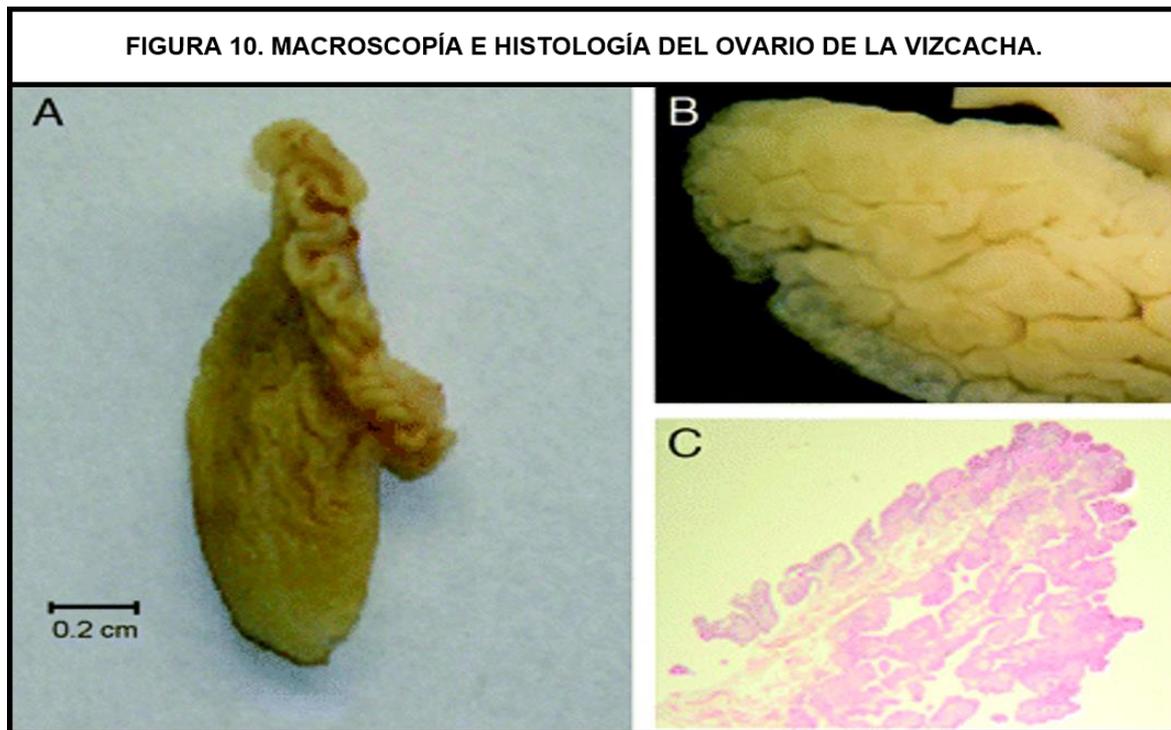
En la década del '70, Weir (1971a, b) realizó los primeros estudios sobre la reproducción de las vizcachas hembras y describió las características anatómicas e histológicas del tracto reproductivo. La especie presenta en la región distal del cérvix un tabique longitudinal que permite identificar una vagina anterior con presencia de este tabique y una vagina posterior carente de esta estructura (Figura 9). Weir (1971a) sugirió que la presencia de dicha estructura es una característica primitiva dado que es rudimentario en otros mamíferos placentarios y en el tracto reproductivo de los marsupiales se presenta una estructura análoga (Owen, 1839).

El útero es bicornue; no se observan diferencias morfológicas ni histológicas a lo largo de ambos cuernos uterinos (Roberts y Weir, 1973); tampoco se describieron diferencias en la irrigación sanguínea (Weir, 1971a) que puedan explicar la reabsorción embrionaria.



Se destaca la localización del septum vaginal, dividiendo la vagina en una región anterior, con la presencia de esta estructura, y una porción posterior carente de esta estructura. Adaptado de Weir (1971a).

Otra de las observaciones importantes realizadas por Weir (1971b) sobre las características reproductivas de la vizcacha, fue la morfología atípica que presenta el ovario de la hembra adulta. Tiene una forma aplanada y en su superficie presenta invaginaciones profundas que involucran al epitelio germinal y a la túnica albugínea y se extienden hasta la región medular del órgano (Figura 10).



Vista macroscópica del ovario adulto de *L. maximus*. B) Detalle de la superficie ovárica con invaginaciones profundas. C) Histología del ovario de la vizcacha. Las invaginaciones involucran a la túnica albugínea y al epitelio germinal. Tomado de Jensen y col. (2006).

El oviducto de la vizcacha es un órgano tubular, delgado y muy tortuoso (Flamini y col., 2014). Se reconocen tres segmentos: el infundíbulo, la ampolla y el istmo. La pared tiene tres túnicas: la mucosa, la muscular y la serosa. La mucosa presenta un epitelio cilíndrico simple con células ciliadas y células secretoras, cuyas proporciones varían en relación al estadio reproductivo de la hembra. Las características particulares anatómicas del oviducto son la corta longitud de sus fimbrias, no cubren la superficie ovárica a pesar de la ausencia de la bolsa ovárica, y la ausencia de una porción intrauterina.

El ciclo estral de la vizcacha tiene una duración media de 45 días, considerando su inicio desde que se perfora la membrana de oclusión vaginal (Weir, 1971a). No hay un estro post-parto a menos que ocurra la muerte de las crías (Llanos y Crespo, 1952).

Las hembras de esta especie muestran la mayor tasa ovulatoria descrita para mamíferos hasta el momento, con un promedio de más de 150 óvulos, que puede llegar hasta 800, liberados en un mismo ciclo estral (Weir, 1971a, b; Jackson col., 1996; Willis, 2012). Esta ovulación masiva fue atribuida por Weir (1971a) a la morfología altamente invaginada del ovario, que incrementa en gran medida el epitelio germinal de superficie, y al pequeño tamaño de los folículos pre-ovulatorios que alcanzan apenas los 300 μm , siendo uno de los más pequeños conocidos para mamíferos (Espinosa y col., 2011).

En la mayoría de los mamíferos, la masa germinal está sujeta a una eliminación masiva por medio de la apoptosis que promueve una reducción de la reserva germinal de entre el 60 y el 85% al nacimiento como se ha observado en rata (Hirschfield, 1991), en ratón (Flaws y col. 2001) y en humano (Baker, 1963; Forabosco y col. 1991). Esto se debe a un balance en favor de la expresión de los genes pro-apoptóticos. Sin embargo, *L. maximus* no está sujeto a la eliminación masiva característica de los mamíferos, presentando porcentajes de apoptosis muy bajos, en comparación a lo descrito para otros mamíferos. Estudios recientes, desarrollados en nuestro laboratorio, han mostrado que los mecanismos moleculares que subyacen a la ovulación masiva residen en una regulación particular de la apoptosis folicular (Jensen y col., 2006; Leopardo y col., 2011). Se ha encontrado una sobre-expresión del gen anti-apoptótico *BCL-2* en todos los estadios foliculares del ovario adulto de la vizcacha, combinado con bajos niveles o ausencia de detección del gen pro-apoptótico *BAX* (Jensen y col., 2006). De este modo, el ovario fetal de *L. maximus* manifiesta un crecimiento sostenido de la masa germinal sin eliminación, que se mantiene durante la vida reproductiva (Jensen y col., 2006; Leopardo y col., 2011). Estas observaciones, en conjunto, sostienen la idea que el mecanismo eliminatorio de células germinales es ejecutado a través de la poliovulación masiva durante la vida adulta (Willis, 2012). La calidad y viabilidad de los oocitos liberados en cada ciclo ovulatorio es extremadamente baja, con altas tasas de alteraciones morfológicas y activación partenogenética espontánea (Willis, 2012). La gran mayoría de los oocitos son ovulados desnudos (sin células del cúmulo) y transitan libremente en oviductos y cuernos, en un proceso que se extiende por más de tres días; no obstante, se ha observado que en este lapso una pequeña población es ovulada como complejo cúmulo-oocito, proponiéndose a ésta como una eu-ovulación apta para la fecundación, en medio de la eliminación masiva de oocitos inviables (Willis, 2012). Si bien la ovulación en mamíferos puede ocurrir espontáneamente como en la mayoría de los roedores, primates y otros órdenes, o inducida por la cópula como en el conejo y el gato, se ha sugerido que la vizcacha podría representar un estadio intermedio de ovulación espontánea / inducida (Rowlands y Weir, 1974), apoyando la idea de que la eu-ovulación puede ser inducida por el coito en medio de una masiva liberación de oocitos inviables que ocurre de manera espontánea (Willis, 2012).

El período reproductivo activo de *L. maximus* se extiende entre los meses de marzo y septiembre, aunque se han registrado picos de menor actividad reproductiva cercanos al mes de noviembre (Llanos y Crespo, 1952; Weir, 1970; Branch y col., 1993). La principal época de apareamientos ocurre entre los meses de marzo y abril. La especie presenta un período gestacional prolongado, inusualmente largo para roedores, de alrededor de 154 días (Weir, 1971b). Dentro de los caviomorfos, la guagua loba (*Dinomys branickii*) es la única especie que muestra una gestación aún más larga que supera los 260 días en promedio (Saavedra Rodríguez, 2014).

A pesar de tener una alta tasa ovulatoria, la tasa de fecundación es baja. Entre 8 y 12 oocitos son fecundados e implantados alrededor del día 18 post-coito (Weir, 1971a). Este proceso de implantación en la vizcacha ocurre del lado antimesometrial de manera intersticial (Roberts y Weir, 1973; Leopardo y Vitullo, 2017). Luego, durante la primera mitad del desarrollo post-implantación se produce una reabsorción embrionaria selectiva. Alrededor del día 35 post-implantación, los embriones implantados en las secciones anteriores de los cuernos uterinos muestran detención en su desarrollo (Weir, 1971a). El proceso avanza hasta los 70 días de gestación. En este momento, el embrión implantado más cercano al cérvix en cada cuerno uterino presenta un desarrollo embrionario normal, el resto de los embriones implantados presentan reabsorción completa o parcial (Weir, 1971a). Sólo dos crías llegan a término (Weir, 1971b), siendo éste el tamaño de su camada.

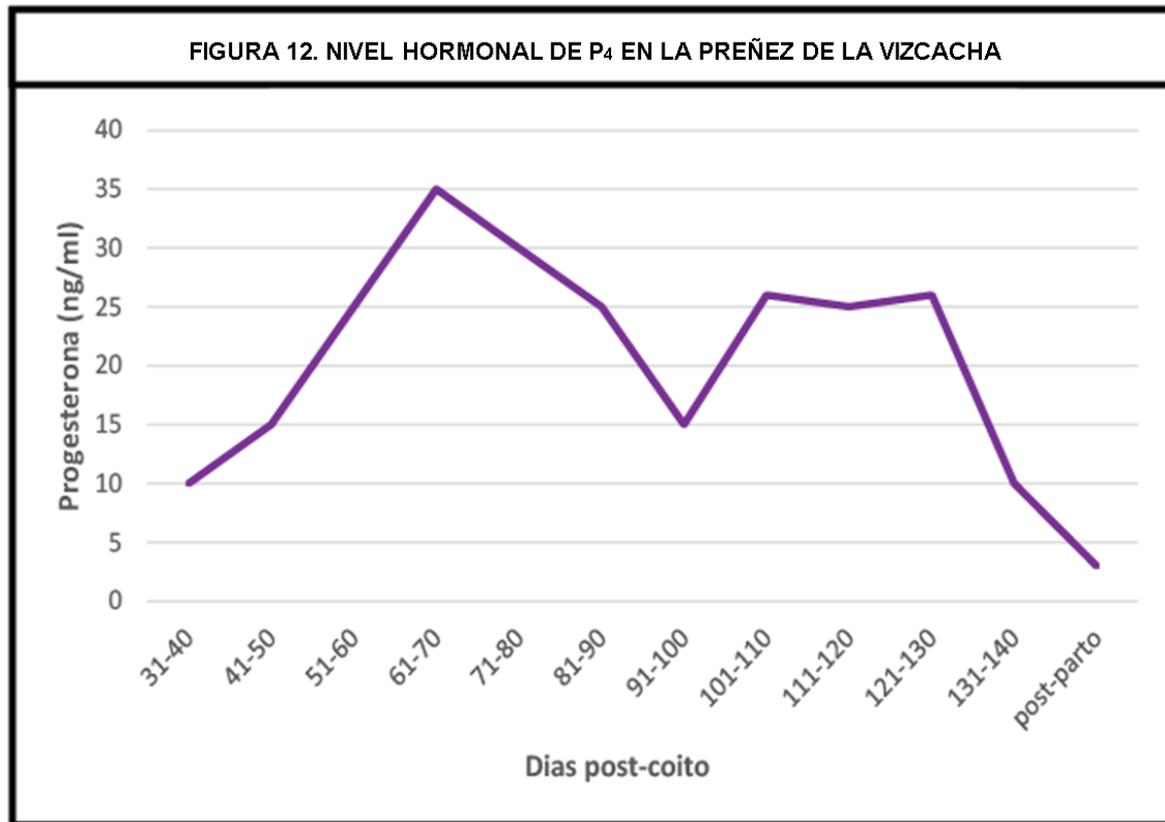
En el transcurso de este proceso de eliminación selectiva de embriones implantados, tiene lugar en el ovario un proceso de reclutamiento y crecimiento folicular masivo que culmina en la formación de numerosos cuerpos lúteos secundarios (Jensen y col., 2008). El cuerpo lúteo persiste durante toda la gestación y parece ser necesario para el mantenimiento de la preñez (Weir, 1971). Jensen y col. (2008) plantearon la hipótesis que la generación de estos nuevos cuerpos lúteos en la mitad de la gestación permite re-establecer las concentraciones de P4 necesarias para rescatar a los embriones aún no afectados por el proceso de reabsorción embrionaria, y suplir un posible defecto hormonal placentario. *L. maximus* comparte características placentarias con diversos histricomorfos. Presenta una placenta corioalantoidea lobulada, con subplacenta y establece una barrera hemo-monocorial (Flamini y col., 2011) (Figura 11). Sin embargo, no ha sido aún estudiada la funcionalidad de la placenta y la capacidad de producir niveles de P4 suficientes para sostener la gestación a término.



Se visualiza el laberinto (LAB) y Trophospongium (TRS). Se muestra un vaso sanguíneo fetal (FV). IHQ positiva a Vimentina. Barra 100 μ m. Tomado de Flamini y col. (2011).

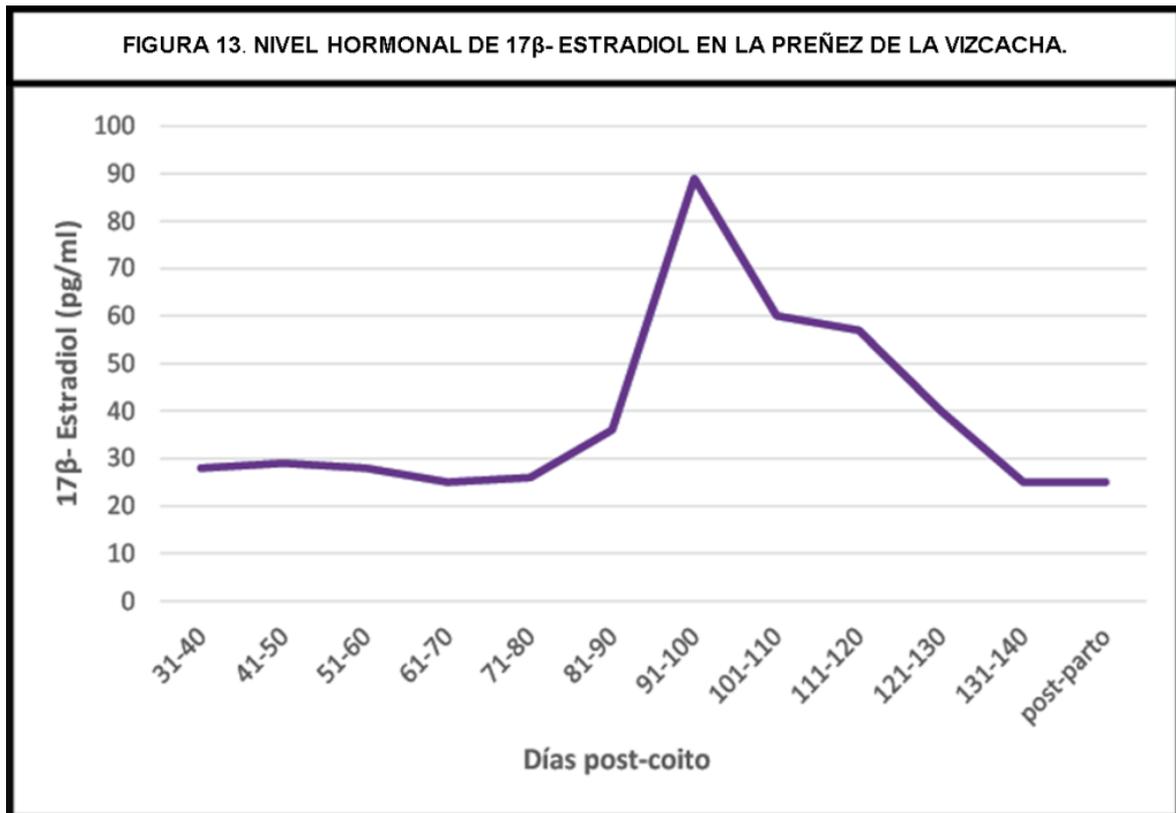
Heap y col. (1981) realizaron un estudio de los niveles de P₄ durante la gestación, donde compararon diferentes roedores histricomorfos. En base a sus resultados, la vizcacha y el degú presentan niveles máximos de P₄ sérica (50 a 60 ng/ml) considerablemente menores en comparación con las otras especies estudiadas (la casiguara, 250 ng/ml; el cui, 250 ng/ml y el cobayo, 200 ng/ml). Se conoce que en roedores la P₄ aumenta durante la gestación temprana y permanece elevada y constante hasta el final de la gestación descendiendo al momento en que se desencadena el parto (Leavitt y Blaha, 1970; Challis y col., 1971; Barkley y col., 1979). Un estudio reciente realizado en nuestro grupo sobre hembras preñadas de *L. maximus* muestra que la P₄ tiene dos picos de máxima concentración durante la gestación. Al inicio de la gestación, los CL primarios secretan P₄ produciendo un incremento sostenido, de esta hormona hasta el día 70 en que alcanza un pico de concentración máxima para luego descender progresivamente hasta los 90/100 días de gestación (Fraunhofer y col., 2017) (Figura 12). La caída de la concentración de P₄ promueve una reactivación del eje hipotalámico-hipófisis-gonadal (HHG) que conlleva a la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que promueve el reclutamiento folicular con formación de folículos pre-ovulatorios en mitad de la gestación y un aumento en los niveles séricos de E₂ (Figura 13) (Charif y col., 2016). La formación de folículos pre-ovulatorios desencadena un proceso “pseudo-ovulatorio” debido a que, en general, no ocurre liberación de los oocitos, sino que los mismos permanecen retenidos dentro de los folículos que luteinizan y forman CL secundarios (Jensen y col., 2008; Willis, 2012; Fraunhofer y col., 2017).

Los cuerpos lúteos secundarios producen una recuperación de los niveles de P₄ que se mantendrán durante el resto de la gestación para descender nuevamente en el momento del parto.



La progesterona mostró dos picos con el nivel más alto a los 61-70 días post-coito. Adaptado de Fraunhofer y col. (2017).

Actualmente no se han encontrado reportes que describan el proceso de reabsorción embrionaria selectiva que ocurre durante la gestación de la vizcacha. Este modelo con características reproductivas excepcionales representa un modelo único para estudiar pérdidas embrionarias tempranas como un proceso fisiológico dentro de la gestación.



El estrógeno mostró un incremento en el día 91-100 días post-coito. Adaptado de Fraunhofer y col. (2017).

4. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Las relaciones entre el embrión y el útero comienzan con la implantación, un proceso del cual dependerá el éxito de la continuidad de la gestación. Una falla en la misma puede ocasionar abortos tempranos (Dekel y col., 2010). Muchos de los componentes inmunológicos juegan un papel crítico en este proceso.

En base a los antecedentes expuestos previamente se plantea que:

La reabsorción embrionaria selectiva post-implantación en *Lagostomus maximus* transcurre por la preparación del tejido uterino mediante procesos de carácter inflamatorio que involucran respuestas de tipo Th1 y Th2. Se postula que la respuesta Th1 se desencadenaría por la liberación masiva de óvulos desnudos e inviábiles que transitan libremente desde el oviducto hacia los cuernos uterinos. Esta respuesta inflamatoria persistiría en las partes proximales de los cuernos uterinos, impidiendo el desarrollo fetal y causando la reabsorción embrionaria selectiva. En la región distal de los cuernos uterinos, tendría lugar una respuesta de tipo Th2, inducida por el plasma seminal, que generaría un sitio de implantación fisiológico y modularía el efecto de la respuesta Th1 en esta región; permitiendo de este modo que los embriones más cercanos al cérvix completen su desarrollo y lleguen a término.

4.2 OBJETIVOS GENERALES

Para corroborar o rechazar dicha hipótesis se propuso como objetivo general de esta tesis caracterizar el proceso de implantación en *Lagostomus maximus*, generar nuevo conocimiento sobre el proceso de reabsorción embrionaria selectiva característico de esta especie y poder relacionar ambos sucesos.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar histológicamente el cuerno uterino de *L. maximus* en sus diferentes estadios reproductivos.
2. Estudiar el proceso de decidualización en el útero de *L. maximus*.
3. Relacionar el proceso de decidualización con un posible evento inflamatorio.
4. Investigar la respuesta inmunológica de *L. maximus* en el período peri-implantación y post-implantación temprana.
5. Vincular las respuestas inmunológicas en el período de implantación con el proceso de reabsorción embrionaria selectiva.
6. Analizar el aporte del plasma seminal al proceso de decidualización.
7. Evaluar la capacitación inmunológica del estroma uterino de *L. maximus*.
8. Relacionar el aporte del plasma seminal con el proceso de implantación y la reabsorción embrionaria.

5. MATERIALES y MÉTODOS

5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

5.1.1 Ética

El presente trabajo fue desarrollado en el Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides. Los protocolos experimentales desarrollados fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, por resolución N°2014/5 y por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE), Universidad Maimónides. La manipulación y sacrificio de los animales fue realizada acorde con los estándares internacionales de uso de animales de experimentación, provistos por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) (NIH, 1985; CCAC, 2003). Los protocolos experimentales fueron diseñados para optimizar las muestras y minimizar el número de los animales utilizados.

5.1.2 Captura y alojamiento de los animales

Se capturaron vizcachas hembras (n= 168) y machos (n= 26) de una población natural establecida en la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS), Villa Elisa, Buenos Aires. El número anual de animales capturados fue autorizado por el Ministerio de Asuntos Agrarios, Dirección de Flora y Fauna Silvestre de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. El trabajo a campo se realizó teniendo en cuenta el período reproductivo de la especie en estudio. Las vizcachas fueron atrapadas empleando trampas de captura viva localizadas en las salidas de las vizcacheras. La edad de los animales fue determinada según su tamaño y peso corporal, y por el peso seco del cristalino, de acuerdo a lo descrito por Jackson (1986). Los animales fueron trasladados a las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Medicina Experimental (CIDME), Universidad Maimónides, mantenidos hasta el momento de la eutanasia en jaulas de 1m³ con cubículo oscuro, para simular la vida subterránea, y alimentados con una dieta de vegetales, frutas y agua *ad libitum*. El cuarto para mantenimiento de los animales fue acondicionado con un sistema de extracción de aire y condiciones lumínicas de 12 horas de luz tenue y 12 horas de luz azul (luz de luna).

5.1.3 Eutanasia y recolección de las muestras

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intramuscular de 10 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Holliday Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) y 1 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Laboratorios Richmond, Buenos Aires, Argentina). Mediante punción cardíaca se tomaron muestras de sangre que fueron preservadas en tubos heparinizados para determinaciones serológicas. Posteriormente, los animales fueron sacrificados mediante inyección intracardíaca de 0,2 ml/kg de Euthanyle (pentobarbital sódico y difenilhidantoína sódica, Brouwer S.A., Buenos Aires, Argentina). Al momento de recolectar los tejidos se observó si las hembras estaban preñadas o no; en caso de estarlo se registró el número de embriones implantados por cuerno uterino. En las hembras con preñez temprana las vesículas embrionarias (Em1, Em2, Em3) fueron removidas de cada una de las secciones del cuerno uterino (S1, S2, S3). Se consideró la S1 la más cercana al cérvix y S3 la más próxima al ovario) denominándolas, etc. Las mismas se clasificaron en viables o en proceso de reabsorción. Se registraron los pesos y las mediciones de las vesículas embrionarias, los fetos y las placentas. En las hembras se removieron los ovarios, los cuernos uterinos, las placentas y las vesículas embrionarias. En los machos se removieron los testículos con su epidídimo y el pene. De acuerdo con los requerimientos técnicos, algunas muestras fueron fijadas en una solución fría de formol al 10% (Biopack) para posteriores estudios histológicos, de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. En el resto de los casos, fueron inmediatamente congelados con hielo seco y luego preservados a -80°C para realizar las mediciones hormonales y de citocinas.

5.2 ENFOQUES EXPERIMENTALES

5.2.1 Grupos de trabajo

Para lograr la obtención de animales representativos de los diferentes estadios reproductivos, las capturas fueron planificadas teniendo en cuenta el ciclo reproductivo natural de la vizcacha, previamente descrito por Llanos y Crespo (1952) y la experiencia de trabajo de nuestro grupo sobre el animal en estudio (Jensen y col., 2006; Jensen y col., 2008; Dorfman y col., 2011; Leopardo y col., 2011; González y col., 2012; Dorfman y col., 2013; Halperin y col., 2013; Inserra y col., 2014; Charif y col., 2016; Leopardo y Vitullo, 2017; Fraunhoffer y col., 2017). Se utilizaron vizcachas no preñadas y preñadas. Las no

preñadas (n=64) fueron capturadas en el mes de marzo y se les observaron los ovarios al momento de la eutanasia para evaluar la presencia de estigmas ovulatorios. Las hembras preñadas (n=93) fueron capturadas a lo largo de la temporada gestacional principal que abarca de abril a agosto. La edad gestacional se estimó según el mes de captura y el estado de desarrollo fetal (peso y longitud fetal en hembras con preñez media y tardía -Leopardo y col., 2011-). Las hembras con preñez temprana (n=43) fueron capturadas en abril, los animales con preñez media (n=26) en julio y con preñez tardía (n=24) en agosto.

5.2.2 Análisis macroscópico e histológico de las muestras

Se utilizaron distintos tejidos de vizcachas en diferentes estadios reproductivos.

- ✓ Cuernos uterinos de hembras pre-púberes, crías nacidas en cautiverio de 30 días de edad aproximadamente (n=5).
- ✓ Cuernos uterinos de hembras adultas no preñadas (n=10).
- ✓ Cuernos uterinos de hembras adultas en etapa no reproductiva, anestro, lactancia (n=6).
- ✓ Cuernos uterinos de hembras adultas con preñez temprana (20-70 días dpc; n=12), y sus vesículas embrionarias. Estas muestras fueron subdivididas en peri-implantatorias y post-implantación, con o sin reabsorciones embrionarias.
- ✓ Placentas pertenecientes a gestaciones intermedias (70-120 días dpc; n=12) y a término (120-154 días dpc; n=10).
- ✓ Membranas extraembrionarias (n=6).
- ✓ Oviductos de hembras adultas (n=5).
- ✓ Pene de macho adulto (n=2).

Todas las muestras fueron observadas macroscópicamente en fresco y luego fueron fijadas en formol al 10% por 24 horas, con excepción de las placentas de gestación intermedia y a término que por su gran tamaño requirieron 48 horas de fijación. Las muestras fijadas se procesaron para su inclusión en parafina y se realizó su análisis histológico. Se hicieron cortes longitudinales y transversales de 5-6 μm de espesor. Los cuernos fueron seccionados en 3 partes denominándolas S1 (la más próxima al cérvix), S2 (sección media) y S3 (la más próxima al ovario). Luego se realizaron tinciones de HyE (Hematoxilina-Eosina), PAS (Ácido Periódico Schiff) y Tricrómico de Masson para todos los tejidos que fueron procesados y se realizó la Tinción de von Kossa en placentas pertenecientes a preñez intermedia y a término, para la detección de microcalcificaciones y la tinción de Azul de Prusia para marcar el pigmento hemosiderina en cuernos en anestro (lactancia). Se analizaron cuernos uterinos y placentas en diferentes estadios de la gestación con la finalidad de detectar su posible

participación en el proceso de reabsorción embrionaria. Los datos registrados, de la placenta y los fetos, se analizaron estadísticamente mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson; se evaluó si existía una asociación lineal entre el peso de la placenta y el peso fetal y entre el peso de la placenta y el tamaño del feto.

En todos los casos, los ovarios fueron removidos para una exploración macroscópica en búsqueda de estigmas que denoten el estado ovulatorio del animal. Inmediatamente luego de la exploración, los ovarios fueron fijados en formol 10% para análisis histológicos o congelados a -80°C para la medición de las hormonas esteroideas por radioinmunoensayo.

5.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

5.3.1 Microscopía electrónica de barrido (M.E.B)

Se tomaron 5 muestras de hembras preñadas, con estadio gestacional intermedio (90-120 días; n=2) y gestación a término (120-154 días; n=3), abarcando la mayor cantidad de tejido para la visualización con microscopio electrónico de barrido. Todas las muestras se fijaron en formol al 4% por 24 horas y se les realizó la deshidratación del tejido con pasajes de alcoholes ascendentes (25%, 50%, 75% y 100%). Se las dejó en 100% para realizar el secado a punto crítico (SPC), proceso recomendado para muestras blandas y muy hidratadas, en un equipo EMS 850 Critical Point Drier de Electron Microscopy Sciences. Se realizaron dos pasajes por anhídrido carbónico, se llevó a 5°C, y se deshidrató llevándolo a 40°C. Las muestras se montaron en portaobjetos con base metálica de acero. Se metalizaron con el equipo SC7620 Mini SputterCoater de Thermo VG Scientific, para hacer conductiva la muestra. Se introdujeron en un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL Serie 30 a 20 KV para ser observadas y se registraron imágenes.

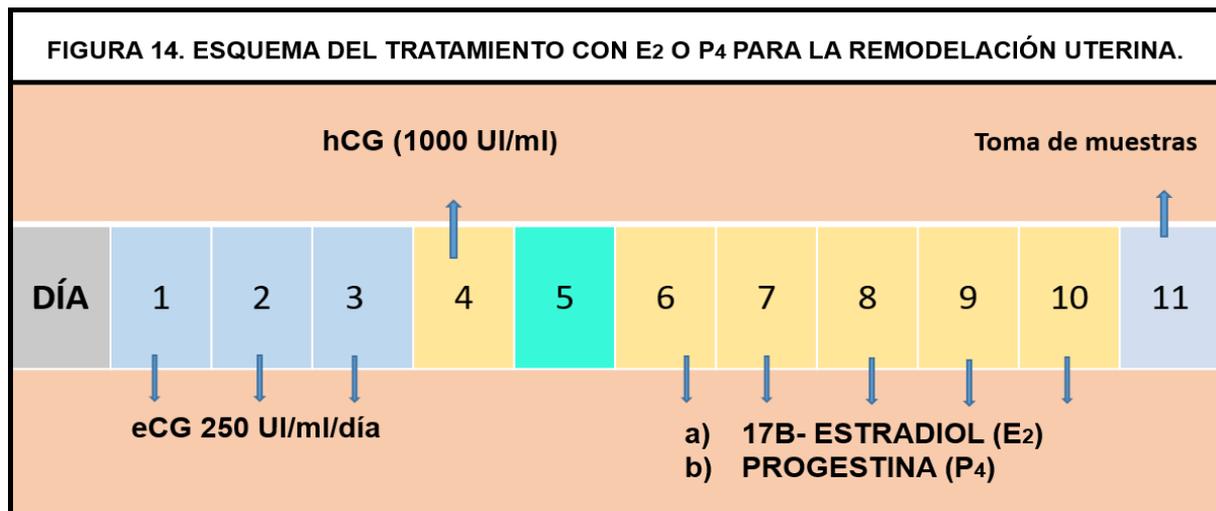
5.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (M.E.T)

Para preparar las grillas para microscopía de transmisión, se obtuvieron las muestras de oviductos de hembras no preñadas (n=5) y tejidos de membranas extraembrionarias de hembras preñadas en dos estadios gestacionales, (n=2, preñez intermedia; n=3, preñez a término). Una vez removido el tejido, se procedió a recortar individualmente cada una de ellas para fijarlas en glutaraldehído al 3% por 24 hs y luego se pasaron a PBS 1X por dos

días. Se realizó una segunda fijación, con tetróxido de osmio al 1% durante 60 minutos a 0°C y se continuó con dos lavados de 15 minutos con agua destilada. La tercera fijación fue con acetato de uranilo al 5% “overnight” y luego se realizaron dos lavados de 15 minutos con agua destilada. Se procedió a la deshidratación del material en alcoholes ascendentes (70°, 96°, 100°) seguido de dos cambios de acetona durante 10 minutos. Se realizó la inclusión en resina “Durcupam” la cual se polimerizó a 60°C durante 72 horas. Una vez polimerizada la resina se realizaron cortes ultrafinos de 50 nm de espesor por medio de un Ultramicrotomo (Reichert Jung Ultracut E); finalmente, los cortes se montaron en grillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión, TEM Zeiss EM 109T.

5.4 TRATAMIENTOS CON E2 Y P4

Se realizaron en vizcachas no preñadas tratamientos con administración exógena de hormonas (E2 o P4) para evaluar la remodelación de los cuernos uterinos (Wood y col., 2007), ya que al ser animales silvestres es muy difícil determinar el estadio del ciclo estral en el que se encuentran al capturarlos. Los preparados histológicos de estos animales también fueron utilizados para inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF). A los animales tratados se les realizó endoscopía para evaluar *in situ* los cambios en los cuernos uterinos. Los productos hormonales utilizados fueron 17B Estradiol (Laboratorios Burnet S.A., Buenos Aires, Argentina) y Modificador Plus hembras Progestina (Laboratorios Burnet S.A., Buenos Aires, Argentina) ambos fueron aplicados por vía intramuscular (IM). Previamente se realizó una sincronización e inducción de la ovulación con los productos Novormon y Ovusyn (hCG). Todos los animales fueron tratados 3 días consecutivos con 1ml de NOVORMON 5000 Syntex Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) liofilizada IM; al 4to día se aplicó una única dosis de 1ml OVUSYN IM, de acuerdo a lo descripto por Willis (2012). El 5to día fue de descanso y a partir del 6to día se aplicó a un grupo 17B Estradiol (1mg/kg/día; n=5) y a otro Modificador Plus hembras Progestina (5mg/kg/día; n=5), por 5 días consecutivos. Al día 11 se sacrificaron y se tomaron las muestras (Figura 14). El grupo control (n=3) fue sometido a la sincronización y a la inducción de la ovulación, sin aplicación de otra hormona exógena.



Hembras no preñadas fueron tratadas durante 3 días consecutivos con una dosis diaria de 250 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG). Al cuarto día, se administró una dosis de 1000UI de gonadotropina coriónica humana (hCG). Luego del 5to día de reposo, los animales fueron tratados con estrógeno (E2) o progesterona (P4).

5.5 MARCACIÓN DE LOS SITIOS DE IMPLANTACIÓN CON AZUL DE TRIPÁN

Los sitios de implantación se visualizaron con la marcación de Azul de Tripán (Biopack). Se utilizó como marcador del grado de permeabilidad vascular (Chakraborty y col., 1996), que a su vez indica la respuesta de decidualización. El procedimiento se realizó en vizcachas hembras adultas con preñez temprana (n=6) previamente anestesiadas. Dado que en vizcacha la vena coccígea lateral tiene escaso caudal sanguíneo, se modificó la técnica de Psychoyos (1973) para esta especie. Posiblemente, estos animales tengan anatómicamente una estrategia de defensa contra la depredación como la empleada por algunos grupos de vertebrados (Arnold, 1984) que al tener escaso caudal que irriga su cola pueda perderla en parte. Por lo cual se inyectó 5 ml de Azul de Tripán al 0,4% (p/v) intravenoso (IV) realizando una incidencia más craneal para visualizar el recorrido venoso. Se esperó 15 minutos para sacrificar a los animales y extraer los cuernos uterinos para ser analizados en fresco, buscando las bandas azuladas que muestran los sitios de implantación.

5.6 ECOGRAFÍAS Y VIDEOENDOSCOPIAS

Se realizaron ecografías en hembras adultas de *L. maximus* para poder clasificarlas según su estadio reproductivo (no preñado o preñado). Se utilizó una plataforma ecográfica veterinaria compacta MYLAB tm 30 VET GOLD esaote, con transductor lineal ESAOTE - Modelo LA 523 f: 10 MHz-. Todos los animales fueron previamente anestesiados con ketamina (10mg/kg) y xilacina (1mg/kg). Las videoendoscopías se realizaron vía transvaginal con una fibra óptica Dyonics 30 Degree 4mm Arthroscope (Hernández Divers, 2004), una cámara Karl Storz Telecam DX II 202330/20, digitalizadora AVID technology IDX video, fuente de luz halógena Karl Storz endoscope. Tanto las ecografías como las videoendoscopías se realizaron en hembras no preñadas (n=5) para observar su tracto reproductivo *in situ e in vivo* y en preñadas con gestación intermedia (n=8) y a término (n=5) con el objetivo de evaluar el curso de una gestación exitosa y comprobar la vitalidad de los fetos.

5.7 ANGIOGRAFÍAS DEL TRACTO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS

Para evaluar la irrigación del tracto reproductivo se realizaron angiografías de hembras adultas de *L. maximus*: no preñadas (n=6), preñadas en estadio temprano (n=4) y preñadas en gestación intermedia (n=4). Todos los animales fueron anestesiados para la realización de esta técnica.

Se utilizó un Sistema de Rayos X con brazo C móvil, intensificador de imágenes marca Toshiba, potencia 125 KV y 500 mA. Se utilizó el programa MIA para tomar las imágenes y estas fueron luego procesadas en formato Dicom. Se aplicó como contraste solución inyectable de Triyosom (Ácido Amidotrizoico - Berlimed, Madrid, España). El contraste fue inyectado en un primer momento en hembras no preñadas, utilizando un catéter el cual se fijó con una sutura en la aorta abdominal, luego se repitió en otro animal colocándolo en la misma arteria pero a la altura de las arterias renales y finalmente en otro se realizó colocando el catéter 1cm por encima de la bifurcación de la arteria aorta abdominal en arterias ilíacas. En cada posición se inyectó el contraste y se evaluó si se marcaba la irrigación uterina. En el resto de los estadios se inyectó el contraste 1cm por encima de la bifurcación de la arteria abdominal en arterias ilíacas.

5.8 MOLDEADO DE LA VASCULATURA DEL TRACTO REPRODUCTIVO CON LÁTEX

Después del estudio de las angiografías, los animales fueron sacrificados para hacer un moldeado vascular de su tracto reproductivo. Además, se añadieron animales con preñez a término (n=4) para el estudio vascular. Todos los animales (n=18) fueron inyectados con heparina (IM) en el momento de la anestesia. El lavado vascular se realizó con solución fisiológica intraventricular. Después del lavado del circuito vascular, se inyectó látex con un colorante rojizo a través de la aorta abdominal por encima de la bifurcación de las ramas ilíacas para moldear la vasculatura del tracto reproductivo de las hembras. Se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas para solidificar el latex y se fijó 48 horas en formol al 10% para visualizar en detalle el recorrido vascular (Rezende y col., 2013).

5.9 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

5.9.1 Procesamiento histológico de los tejidos

Luego de su remoción, los cuernos uterinos fueron divididos en secciones (S1, S2 y S3), fijadas en formol 10% por 48 hs. Posteriormente, se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol (70%, 80%, 95% y 100%), xilol y fueron incluídas en parafina. Se hicieron cortes de 5µm de espesor.

5.9.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

En cortes de cuernos uterinos de hembras con preñez temprana (20 - 70 días de gestación, n=8) se realizó IHQ para LIF, VEGF, eNOS y COX2. Se utilizaron como controles cuernos uterinos no preñados. En el caso de LIF, además, se utilizaron cortes de los cuernos uterinos de animales no preñados que habían sido sometidos previamente a tratamientos hormonales (P4 o E2). Las secciones fueron desparafinadas con xilol y rehidratadas mediante una serie de concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 70%, 50%), agua destilada y PBS 0,1M. Para la recuperación antigénica, los cortes fueron incubados en buffer citrato (citrato de sodio 10mM con Tritón al 2%; pH 6) durante 20 minutos a 100°C,

seguido de 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida, incubando los cortes en una solución de Peróxido de Hidrógeno al 2% y metanol por 20 minutos. Se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS X1.

Por último, la inhibición de la IgG endógena se realizó incubando los cortes con una solución al 10% de suero normal de la especie en la que fue desarrollado el anticuerpo secundario a emplear en PBS 0,1M con Tween 20 0,2% (pH 7,4), durante una hora a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas overnight a 4°C con una solución del anticuerpo primario de interés en PBS 1M (pH 7,4) y el suero normal empleado en el bloqueo al 1%. La Tabla 2 detalla los anticuerpos primarios empleados y la dilución utilizada de cada uno de ellos. Todos los anticuerpos utilizados fueron policlonales y con amplia reacción cruzada entre especies. La especificidad de los mismos fue corroborada en secciones histológicas adyacentes por omisión del anticuerpo primario. La inmunorreactividad fue desarrollada incubando las secciones con anticuerpos secundarios biotinilados (Tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente, y amplificada por incubación con el complejo avidina-avidina-peroxidasa (ABC Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, California, Estados Unidos) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con agitación en PBS 1X de 10 minutos y se los dejó en agua destilada hasta revelar. La reacción fue visualizada con 3,3'diaminobencidina (DAB) (DAB kit, Vector Laboratories, California, Estados Unidos) que produce una marca de color marrón. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas mediante incubación con una serie de concentraciones crecientes de etanol (70%, 95% y 100%) y se realizó una contratinción con hematoxilina. Se realizó el montaje con Bálsamo de Canadá.

TABLA 2. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA IHQ e IF.		
MARCA	ANTICUERPO	DILUCIÓN DE USO
Abcam9 (Massachussetts, Estados Unidos)	eNOS ab5589 (conejo)	IHQ: 1/100
	COX₂ ab15191 (conejo)	IHQ/IF: 1/200
Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Texas, Estados Unidos)	LIF (N-18); sc-1336 (cabra)	IHQ/IF: 1/200
	VEGF (P-20); sc-1836 (cabra)	IHQ: 1/100 IF: 1/50

IHQ: Inmunohistoquímica. IF: Inmunofluorescencia. eNOS: Óxido Nítrico endotelial. COX₂: Ciclooxygenasa 2. LIF: Factor inhibidor de leukemia. VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

TABLA 3. ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA IHQ e IF.		
MARCA	ANTICUERPO	DILUCIÓN DE USO
Vector Laboratories (California, Estados Unidos)	Anti IgG de conejo HRP; PK-6101	IHQ: 1/500
	Anti IgG de cabra HRP; PK-6105	IHQ: 1/500
Invitrogen, Life Technologies (New York, Estados Unidos)	Alexa Fluor 488 anti IgG de conejo; A-21441	IF: 1/500
	Alexa Fluor 488 anti IgG de cabra; A-11055	IF: 1/500

IHQ: Inmunohistoquímica. IF: Inmunofluorescencia. Anti: Anticuerpo. Ig: Inmunoglobulina. HRP: Peroxidasa de rábano.

5.9.3 Inmunofluorescencia (IF) con microscopía confocal

Se realizaron IF de LIF, VEGF y COX2 en las tres secciones de los cuernos uterinos con preñez temprana (S1, S2 y S3). El ensayo se realizó siguiendo el mismo protocolo que para las IHQ, omitiendo el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena.

Para la inhibición de la IgG endógena, se usó una solución de SFB (Suero fetal bovino) 10% + BSA (Albúmina de suero bovino) 15% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se hicieron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno en agitación. A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo primario, overnight a 4°C y posteriormente se hicieron 3 lavados de PBS 1X de 10 minutos cada uno. Luego se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, conjugado con un fluorocromo (FITC) durante 1 hora en cámara húmeda y oscura. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos en agitación. Se empleó el medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, California, Estados Unidos). Las muestras así tratadas se visualizaron bajo microscopio láser Nikon C1 Plus (Nikon Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon Corp., Tokio, Japón) y el software EZ-C1 (EZ-C1 Software v3.9, Nikon Ltd., Londres, Reino Unido). Los controles negativos de todas las muestras se realizaron en paralelo con el experimental, dado que cada preparado contaba con dos cortes, omitiendo el anticuerpo primario.

5.10 TUNEL (Terminal deoxytransferase-mediated bio-dUTP Nick End Labelling)

Se analizó la fragmentación/ integridad del ADN nuclear mediante la técnica de TUNEL, un método para teñir *in situ* ADN nuclear fragmentado; en cortes histológicos de cuernos con preñez temprana (n=12) y placenta de preñez intermedia (n=5) y preñez a término (n=5). Es una herramienta útil para la identificación *in situ* de la muerte celular programada (MCP). El método se basa en la unión específica de la deoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) al extremo 3'-OH del ADN fragmentado y la subsiguiente unión de un polímero de polideoxinucleótidos. Para la determinación, las secciones a analizar fueron desparafinadas mediante tres pasajes por xileno de 15 minutos cada uno e hidratadas en un gradiente decreciente de alcoholes (100%, 96%, 80%, 70% y 50%) de 10 minutos cada uno. Luego, las secciones se incubaron con una solución de proteinasa K (20 µg/ml, Proteinase K Fungal, Invitrogen) en TRIS-HCl (10mM; pH 7,4) por 20 minutos a 37°C para permeabilizar

las membranas celulares. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de TUNEL (*in situ* Cell Death Detection Kit, POD, Roche) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

En paralelo, se realizó un control positivo de la técnica, que se trató de igual manera a lo descrito pero fue incubado, previamente a la reacción de TUNEL, con una solución de desoxirribonucleasa (DNAsa) (10U/ml, DNase I, Invitrogen), MgCl₂ (10mM) y BSA (1mg/ml, Albumin Bovine Serum, Fraction V, Sigma Aldrich Inc.) en TRIS-HCl (50mM; pH 7,5) por 60 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de degradar el ADN. Luego de la incubación, los vidrios se volvieron a lavar y se realizó TUNEL. A su vez, se realizó un corte control negativo de la técnica, el cual fue incubado en idénticas condiciones a las descritas anteriormente pero no fue agregada la enzima catalizadora de la reacción de TUNEL.

Todas las muestras se visualizaron bajo microscopio Olympus BX40 con cámara fotográfica para capturar las imágenes.

5.11 RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

5.11.1 Obtención y preparación de muestras para RIA

Se utilizaron cuernos uterinos de hembras no preñadas no ovulando (n=6), no preñadas ovulando (n=4) y con preñez temprana (n=6). Los mismos se diseccionaron en S1, S2 y S3. Las vesículas embrionarias fueron removidas de los cuernos uterinos gestantes y se clasificaron en Em1, Em2 y Em3. Se utilizaron placentas de preñez intermedia de hembra no ovulando (n=6) y de hembra ovulando (n=4), y de preñez a término (n=4). Las mismas se separaron en decidua, laberinto y subplacenta.

Se trabajó con 40 mg de cada tejido que se homogeneizó con 900 µl de buffer Tris HCl (10mM; pH: 7,5) y posteriormente, los homogenatos fueron centrifugados a 800 g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes, que fueron preservados a -20°C. El contenido proteico de cada muestra fue determinado por el método de Bradford (1976).

Se utilizaron 450 µl del sobrenadante de la homogeneización de las muestras; se le agregaron 3 ml de éter etílico en tubos cónicos con tapa esmerilada, vortex 1 minuto, se colocó a -80°C por 30 minutos, se trasvasó la fase etérea a tubo de hemólisis, se evaporó en baño a 50°C y se agregó 3 ml de éter. Se repitió nuevamente el procedimiento y si quedó éter en los tubos cónicos se volvió a colocar en -80°C y se repitió la técnica nuevamente.

Los extractos secos se guardaron a -20°C hasta la determinación de P4 y E2 (Bianchi y col., 2004; Silveyra y col., 2007).

5.11.2 Radioinmunoensayo (RIA) propiamente dicho

El extracto seco se resuspendió en 1,2 ml en un buffer fosfosalino de gelatina (GPB; 0,075 M, azida sódica 0,02%, NaCl 154 mM y gelatina 0,1%; pH 7,0). Para la determinación de P4, a 100 µl de la muestra resuspendida se le agregó 200 µl de la solución anti-suero anti-progesterona (1:800 en GPB, #337 anti-progestone-1, Niswender, Colorado, USA) y 100 µl de progesterona tritiada (10,000 cpm/100 µl, New England Nuclear). La curva standard (rango: 12,5 – 6400 pg P4 en 500 µl de GPB) fue construída en base a una solución de stock de P4 de 1 µg/ml en etanol (Sigma-Aldrich). Controles máximos e inespecíficos se emplearon omitiendo la muestra y la solución anti-progesterona, respectivamente. Luego, todos los tubos se incubaron por 24 hs a 4°C. Posteriormente, se procedió a la separación de la hormona libre del complejo hormona-anticuerpo. La misma se logró por el agregado de 200µl de una suspensión de Carbón (0,5%) - Dextrano (0,05%) en GPB. Se agitó y se incubó 10 minutos a 4°C. Luego se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Finalmente, se tomaron 700 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1,5 mL de líquido centelleante (Optiphase Hisafe 3, PerkinElmer Inc., USA). Se registró la radiactividad de los viales con un contador beta (Beckman, USA). Todas las muestras fueron trabajadas por duplicado. La sensibilidad del ensayo fue de 0.4ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 7,1% y 12,15%, respectivamente.

Para la medición de E2, a 100 µl de la muestra resuspendida se le agregó 100 µl de la solución anti-suero anti-estradiol (1:12.500 en GPB, #244 anti-estradiol-6, Niswender, Colorado, USA) y 100 µl de estradiol tritiada (10,000 cpm/100 µl, New England Nuclear). La curva standard (rango: 1,75 – 900 pg E2 en 300 µl de GPB) fue construída en base a una solución de stock de E2 de 7,5 µg/ml en etanol (Sigma-Aldrich). Se realizó el mismo procedimiento descrito para P4. Finalmente, se tomaron 500 µl del sobrenadante (conteniendo el complejo hormona-anticuerpo) y se les agregó 1,5 mL de líquido centelleante (Optiphase Hisafe 3, PerkinElmer Inc., USA). Los resultados fueron expresados como la relación entre P4 o E2 obtenidos por RIA y el contenido proteico de cada muestra analizada.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados mediante una prueba de Kruskal Wallis para comparar los niveles de E2 y P4 ovárica en los diferentes estadios reproductivos. Esta misma prueba también se utilizó para comparar entre los diferentes estadios reproductivos las mismas secciones del cuerno uterino y cada región placentaria. Se utilizó una prueba de

Wilcoxon para los resultados de los niveles hormonales en las diferentes secciones del cuerno uterino y entre las tres partes de la placenta (decidua, subplacenta y laberinto).

5.12 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE LIF

5.12.1 Extracción de proteínas de los cuernos uterinos

Se realizó la extracción de proteínas de los cuernos uterinos con preñez temprana (20-70 días, n=6), que habían sido almacenadas desde su remoción a -80°C, mediante homogenización del tejido en Buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas en el momento de su utilización. Todo el procedimiento fue realizado en frío. Los homogenatos fueron traspasados a tubos eppendorf y centrifugados durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se separó el sobrenadante con las proteínas y se almacenó a -20°C. Se cuantificaron las proteínas extraídas mediante Método Bradford.

5.12.2 ELISA LIF

Se utilizó un kit ELISA Human LIF (Biosource LIF/ HILDA EASIA kit, KAC 1351, Europa). Se colocó en cada pocillo 100 µl de estándares propios del kit o muestras. Se agregó 50 µl de anti-LIF/HILDA conjugado. Se incubó 4 hs a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces y se adicionó 200 µl de cromógeno. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se colocó 50 µl de solución stop y se leyeron las absorbancias a 450 nm. Posteriormente se realizó un análisis estadístico con los resultados del Elisa, utilizando una prueba de Wilcoxon.

5.13 DISEÑO Y FABRICACIÓN DE UN ELECTROEYACULADOR EXCLUSIVO PARA VIZCACHA

Con el objetivo de obtener eyaculados de vizcacha se desarrolló un electroeyaculador para uso exclusivo en *L. maximus* que permite la recolección de semen de esta especie mediante el pre-establecimiento de estímulos eléctricos que pueden ser modificados por el operador en animales anestesiados. Este dispositivo consiste en una fuente generadora de energía eléctrica que emite impulsos eléctricos con determinada frecuencia, voltaje y corriente. Son conducidos por un vástago diseñado y fabricado exclusivamente para esta especie de modo tal que los electrodos contacten con las glándulas anexas.

Se estudiaron diferentes animales (n=10) para localizar las glándulas anexas, principalmente la próstata. Se realizaron mediciones de la distancia ano-próstata para conocer la longitud que debía tener el vástago para alcanzar las glándulas. Además se calculó el diámetro en base al orificio anal de las vizcachas. En las muestras obtenidas se evaluó movilidad por microscopía óptica en platina termostatazada y vitalidad por la técnica de eosina/nigrosina.

5.14 ESTUDIO DEL PENE DE LA VIZCACHA

Se realizó un análisis macroscópico del pene de *L. maximus* bajo lupa (n=2). A su vez, se fijaron muestras en formol al 10% para cortes histológicos y tinción de H/E (n=2) y para MEB (n=3). Para MEB se realizaron pasajes sucesivos de alcoholes con gradiente ascendente hasta llegar al 100. Se continuó con la realización del punto crítico utilizando el equipo EMS 850 (Critical point dryer) con pasajes sucesivos por anhídrido carbónico y deshidratando el tejido. Se varió la temperatura de 5°C a 40°C. Posteriormente a este proceso se realizó una metalización en el equipo SC7620 Mini Sputter Thermo VG Scientific. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido Philips XL Serie 30.

5.15 ESTUDIO DE PARÁMETROS MICROSCÓPICOS DE ESPERMATOZOIDES DE *L. maximus*

Se utilizaron machos adultos de vizcacha con pesos superiores a 4,5 Kg (n=10). Se les extrajeron testículos y epidídimos. Los órganos se mantuvieron en solución fisiológica a 38°C y luego las muestras de testículo y cabeza, cuerpo y cola de epidídimo fueron disgregadas en 1 mL de PBS y mantenidas a 38°C. De cada grupo se evaluó movilidad por microscopía óptica en platina termostatzada, vitalidad por la técnica de eosina/nigrosina y concentración en cámara de Neubauer. A los espermatozoides de cola de epidídimo también se les evaluó la integridad acrosomal por la técnica de azul tripán combinada con microscopía diferencial-interferencial (DIC). Luego de esta evaluación las muestras fueron centrifugadas, resuspendidas en 1 mL de PBS y reevaluadas.

5.16 ANÁLISIS SEMINAL COMPUTARIZADO DE LA MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES

Con la intención de poner a punto el uso de un sistema de análisis seminal computarizado de evaluación de la movilidad de los espermatozoides de vizcacha, de un modo sistemático y objetivo, se analizaron muestras de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo de macho adulto $\geq 5\text{Kg}$ (n=3), pre y post centrifugación. Los animales fueron anestesiados IM con ketamina (10mg/kg) y xilacina (1mg/kg) para extraerles testículos y epidídimos. Los órganos se mantuvieron en solución fisiológica a 38°C. Luego se separó la cola del epidídimo con la cual se trabajó. Se disgregó en 1 mL de PBS y se mantuvo a 38°C. Se evaluó movilidad por microscopía óptica en platina termostatzada, vitalidad por la técnica de eosina/nigrosina y concentración en cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración espermática a 3×10^7 sp/mL para realizar el estudio. A las muestras precentrifugadas se les realizó una incubación sobre la platina termostatzada durante 10 minutos. Para poner a punto el equipo y poder realizar el análisis seminal computarizado se tuvo en cuenta la morfometría de la cabeza del espermatozoide de vizcacha (Tabla 4) estudiada por Muscarsel Isla (2016) en su tesis doctoral. Se trabajó con una frecuencia de captura de 25 Hz, objetivo de 10x con contraste de fase negativo, un área de partículas de 8 a 30 μm^2 . Mediante una prueba piloto se determinaron estándares para clasificar las velocidades de

los espermatozoides. Estos fueron: inmóviles menos a 10 $\mu\text{m/s}$, lentos entre 10 y 25 $\mu\text{m/s}$, medios entre 25 y 45 $\mu\text{m/s}$ y rápidos mayor a 45 $\mu\text{m/s}$.

TABLA 4. MORFOMETRÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE <i>L. maximus</i> .		
	MEDIDAS (μm)	MEDIA \pm DS
	Largo cabeza	5.56 \pm 0.37
	Ancho cabeza	3.87 \pm 0.28
	Longitud pieza media	5.8 \pm 0.25
	Longitud pieza principal	31.31 \pm 1.28
	Longitud filum	4.38 \pm 1.22
	Longitud flagelo	41.49 \pm 1.39
	Longitud total	47.04 \pm 1.94

DS: Desvío estándar. Adaptado de Muscarsel Isla (2016).

5.17 ELECTROFORESIS: FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Con la finalidad de evaluar si la reabsorción embrionaria conlleva una respuesta sistémica en la vizcacha con gestación temprana, se extrajo sangre de animales en diferentes estadios reproductivos ($n=21$) correspondientes a vizcachas no preñadas ($n=4$), preñez temprana (20-70 días, $n=7$), preñez intermedia (70-120 días, $n=5$) y preñez a término (120-154 días, $n=5$). Las muestras de sangre fueron heparinizadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las alícuotas del suero fueron almacenadas a -20°C . Esto permitió hacer un proteinograma y comparar todos los grupos. Se tomó una alícuota del suero para realizar electroforesis de proteínas plasmáticas. Las muestras se sembraron sobre un soporte de acetato de celulosa y se sometieron a una corriente eléctrica

que provocó la migración a diferentes velocidades de las proteínas del suero según su punto isoeléctrico. Todas las proteínas quedaron cargadas negativamente. Para la corrida se utilizó una cuba de electroforesis en la que se colocó el buffer veronal (pH=8,6), se embebieron las tiras de papel y se conectó a una fuente de poder. Se colocó a modo de puente, sobre el centro del soporte. Se sembraron entre 20 a 25 µl del suero. Se corrió con una corriente constante de 150 voltios durante 45 minutos. Una vez corridas las muestras se procedió a colorear las tiras en la solución Amido Schwartz. Luego se continuó con la solución decolorante. Las tiras se colocaron en metanol y luego sobre un portaobjeto y se dejó a 80°C hasta su transparentización completa. Se efectuó la medición por densitometría. El densitómetro registró los datos de absorción de luz de cada banda de proteína, los transformó en un valor numérico de concentración y emitió un densitograma. Posteriormente se realizó un análisis de estadística descriptiva de todas las muestras estudiadas.

5.18 ELISA DE IFN- γ E IL-10

5.18.1 Obtención de los homogenatos para medir citocinas

Se obtuvieron homogenatos de cuernos uterinos de hembras no preñadas (n=4) y preñadas tempranas (20-70 días, n=15), las cuales fueron clasificadas en tres grupos: sin proceso de reabsorción embrionaria (n=5), con reabsorción embrionaria en desarrollo (n=6) y final de la preñez temprana (reabsorción finalizada, n=4). Todos los cuernos uterinos se dividieron en tres sectores (S1, S2 y S3) y a las preñadas además se les extrajo las vesículas embrionarias (Em1, Em2 y Em3) correspondientes a cada sector uterino. Luego de la homogenización, a cada una de las muestras se le agregó tres partes de solución fisiológica. Se centrifugaron dos veces a 1800 rpm, 10 minutos cada uno (Koncurat, 2003). Se guardaron los sobrenadantes a -20°C hasta la realización de las mediciones de las citocinas por técnica ELISA.

5.18.2 ELISA de IFN- γ

Se utilizó un kit ELISA Mouse IFN- γ (EM1001. Thermo Scientific). Se añadió 50 µl de estándares adquiridos con el kit o muestras a cada pocillo por duplicado. Se incubó a temperatura ambiente 2 horas. Se añadió 50 µl de reactivo de anticuerpo biotinilado. Se

incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces, se añadió 100 µl de solución preparada de estreptavidina-HRP, se incubó 30 minutos y se volvió a lavar tres veces. Se añadió 100 µl sustrato TMB a cada pocillo, se incubó en oscuridad por 30 minutos. Se agregó 100 µl de solución stop. Se midió la absorbancia en lector de placas a 450 nm y los valores se triplicaron para calcular las concentraciones IFN-γ (pg/ml). Los resultados se analizaron con la prueba Friedman.

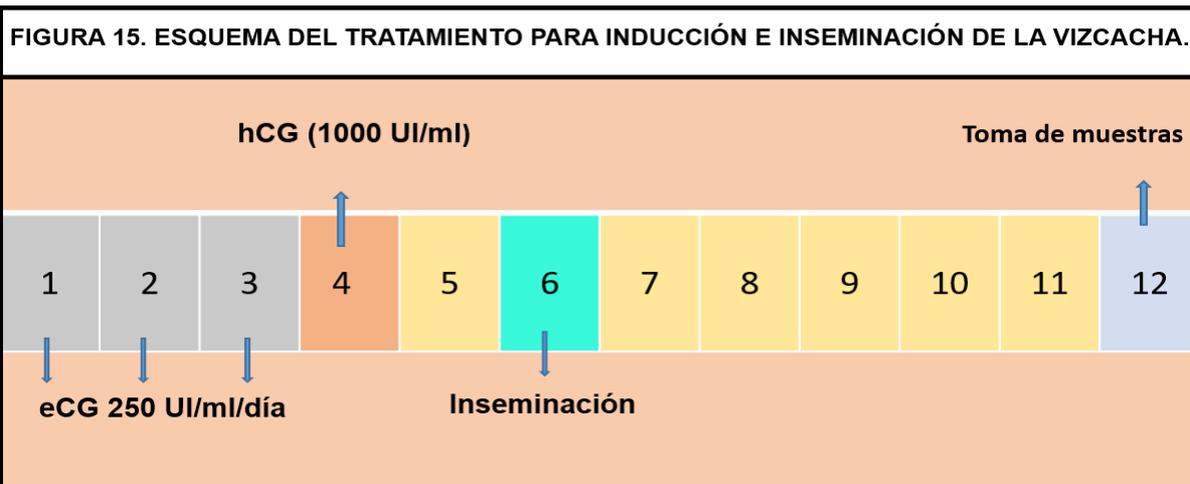
5.18.3 ELISA de IL-10

Se utilizó un kit ELISA Mouse IL-10 (KMC0101. Life Technologies). Se colocó 100 µl de estándares adquiridos con el kit o muestras en cada pocillo por duplicado. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó y se añadió 100 µl de anticuerpo biotinilado. Se incubó 1 hora a 37°C. Luego de lavar, se puso 100 µl de estreptavidina-HRP y se incubó 30 minutos. Se volvió a lavar y se agregó 100 µl de cromógeno, se incubó 30 minutos en oscuridad y luego se adicionó 100 µl de solución stop. Se midió la absorbancia en lector de placas a 450 nm y los valores se triplicaron para calcular las concentraciones IL-10 (pg/ml).

5.19 ELISA DE IL-8

5.19.1 Obtención de los homogenatos

Se obtuvieron macerados de próstata y conductos deferentes de machos adultos (n=10), los mismos fueron filtrados y centrifugados. Se conservó a -20° C los sobrenadantes. Posteriormente se utilizaron hembras adultas no preñadas (n=13). Un grupo de hembras fueron inseminadas con los macerados intracornual (n=7) y otro grupo de hembras fueron inducidas previo a la inseminación (n=3) con ecG y hCG. El grupo control (n=3) fue inducido y posteriormente se les inyectó solución fisiológica en el cuerno uterino. A los 6 días de la inseminación se sacrificaron los animales y se extrajeron los cuernos uterinos (Figura 15). Un cuerno uterino se fijó en formol 10% para análisis histológico junto a los ovarios y el otro cuerno uterino fue seccionado en S1, S2 y S3, a cada una de las secciones uterinas se le agregó tres partes de solución fisiológica y se las homogenizó. Se centrifugaron dos veces a 1800 rpm, 10 minutos cada uno (Koncurat, 2003). Se guardaron los sobrenadantes a -20°C hasta la realización de las mediciones de IL-8 por técnica ELISA.



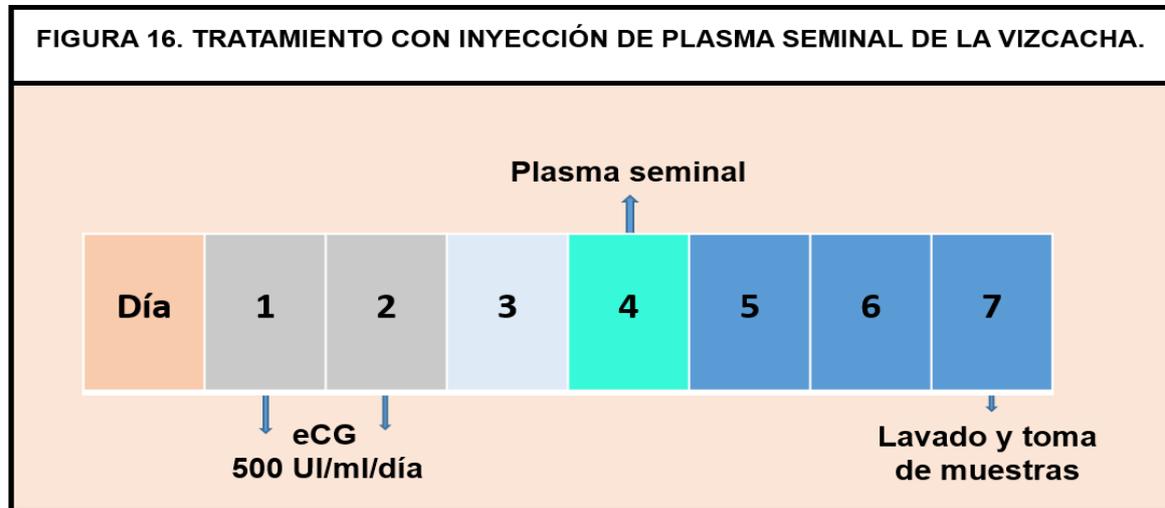
5.19.2 ELISA propiamente dicho.

Se utilizó un kit IL-8 EASIA (KAC1301- Biosource). Se colocó en cada pocillo 100 µl de estándares propios del kit o muestras. Se agregó 50 µl de anti-IL-8/HRP conjugado. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces y se adicionó 200 µl de cromógeno. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se colocó 50 µl de solución stop y se leyeron las absorbancias a 450 nm. Los niveles de IL-8 (pg/ml) se triplicaron y luego se analizaron los resultados con la prueba Friedman.

5.20 TRATAMIENTO DE HEMBRAS CON INYECCIÓN DE PLASMA SEMINAL (IM)

Con la finalidad de evaluar la participación de los componentes del plasma seminal en la ovulación de esta especie, se trataron hembras adultas (n=4) durante dos días con 1ml (IM) de NOVORMON 5000 Syntex eCG liofilizada, un día de descanso y luego se les inyectó plasma seminal IM al 4to día diluido en solución fisiológica. A las 72 hs post-aplicación IM los animales se sacrificaron (Figura 16) y se analizaron los ovarios macroscópicamente y bajo lupa para identificar signos de ovulación como puntos ovulatorios los cuales fueron registrados. Los ovarios fueron fijados en formol al 10% para su análisis histológico. Los cuernos y oviductos fueron seccionados y lavados por separado con solución fisiológica con BSA 4 mg/ml para identificar la eventual ovulación. El líquido de lavado se recuperó en una

placa de Petri y se visualizó bajo lupa y microscopio, evaluando presencia/ausencia de oocitos y sus características.



Hembras no preñadas fueron tratadas durante 2 días consecutivos con una dosis diaria de 500 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG). Al cuarto día, se administró plasma seminal de vizcachón. Luego de las 72 hs post-inyección, se lavaron los cuernos uterinos y oviductos. Se recolectaron los ovarios de todos los animales tratados.

Los controles (n=3) recibieron el mismo tratamiento, pero el día 4 se reemplazó el plasma seminal por solución fisiológica IM. Para realizar este experimento, previamente se obtuvieron muestras de semen de machos adultos por electroeyaculación (n=4). Cada una de las muestras se centrifugó, se aisló el sobrenadante al que se le agregó antibióticos (penicilina 20.000 UI/ml y estreptomycin 10 mg/ml) y se los guardó a -20°C. A estos mismos machos se les extrajo los epidídimos y se les evaluó los parámetros de los espermatozoides (movilidad, vitalidad y concentración espermática) para garantizar que se encuentren en actividad reproductiva.

5.21 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo empleando el InfoStat (Software Estadístico, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). En la

explicación de cada técnica empleada se ha mencionado el tipo de análisis estadístico utilizado, en caso de ser requerido para evaluar sus resultados. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0,05$.

5.22 ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes fueron capturadas con un microscopio óptico (BX40, Olympus Optical Corporation, Tokio, Japón), acoplado a una cámara digital (390CU 3.2 Megapixel CCD Camera, Micrometrics, España), empleando el software Micrometrics SE P4 (Standard Edition Premium 4, Micrometrics, España). Se utilizó el software de edición de imágenes Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems Inc., Ontario, Canadá) para el ajuste digital del brillo y contraste de las imágenes.

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS MACROSCÓPICO E HISTOLÓGICO DEL TRACTO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA DE *L. maximus*

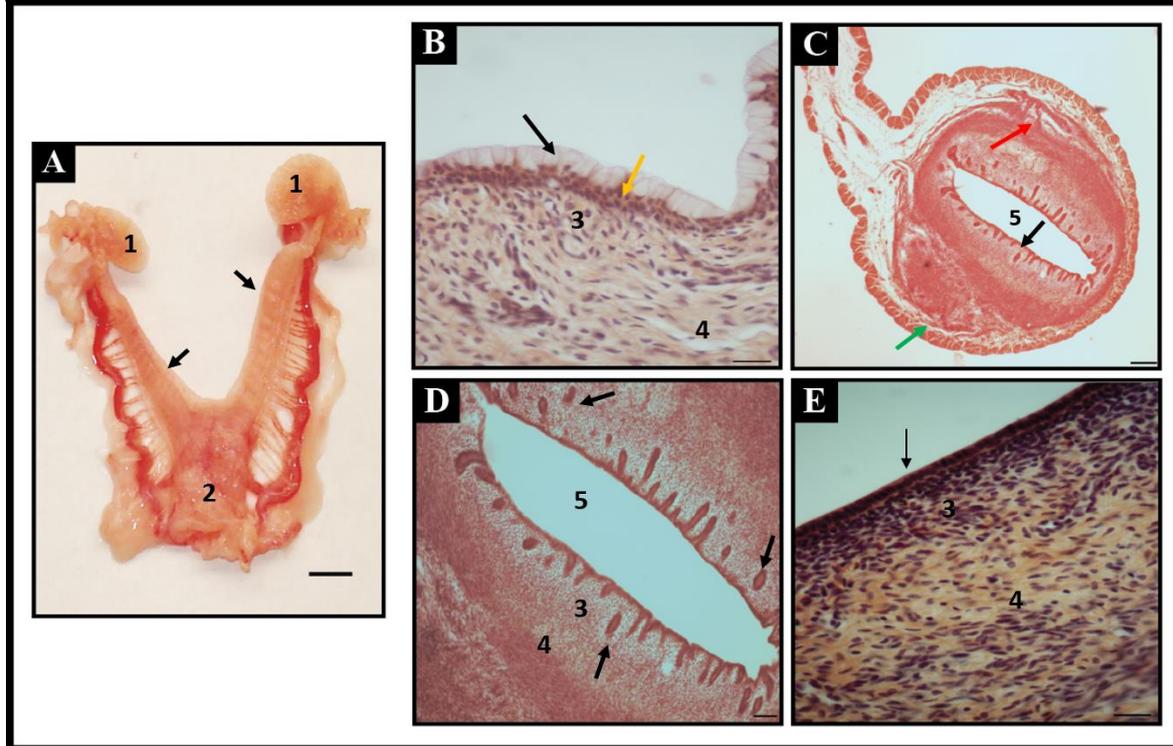
6.1.1 Análisis macroscópico e histológico de la hembra pre-púber

Los cuernos uterinos de las hembras pre-púberes (Figura 17) presentaron a su observación macroscópica un bandeo transversal que ya se visualizaba desde los 30 días de vida. Estas bandas transversales se correspondieron con pliegues observables desde el exterior, debido al escaso desarrollo del miometrio (Figura 17 A). En el análisis histológico reveló que la vagina presenta un epitelio pseudoestratificado con células mucosas (Figura 17 B). Los cuernos uterinos presentaron las 3 tunicas características (mucosa, muscular y serosa), pero poco desarrolladas (Figura 17 C). El epitelio uterino fue cilíndrico simple, con un estroma laxo y escasas glándulas endometriales. Éstas no presentaron secreción, mostrándose inactivas (Figura 17 D y E).

6.1.2 Análisis macroscópico e histológico de la hembra adulta no preñada

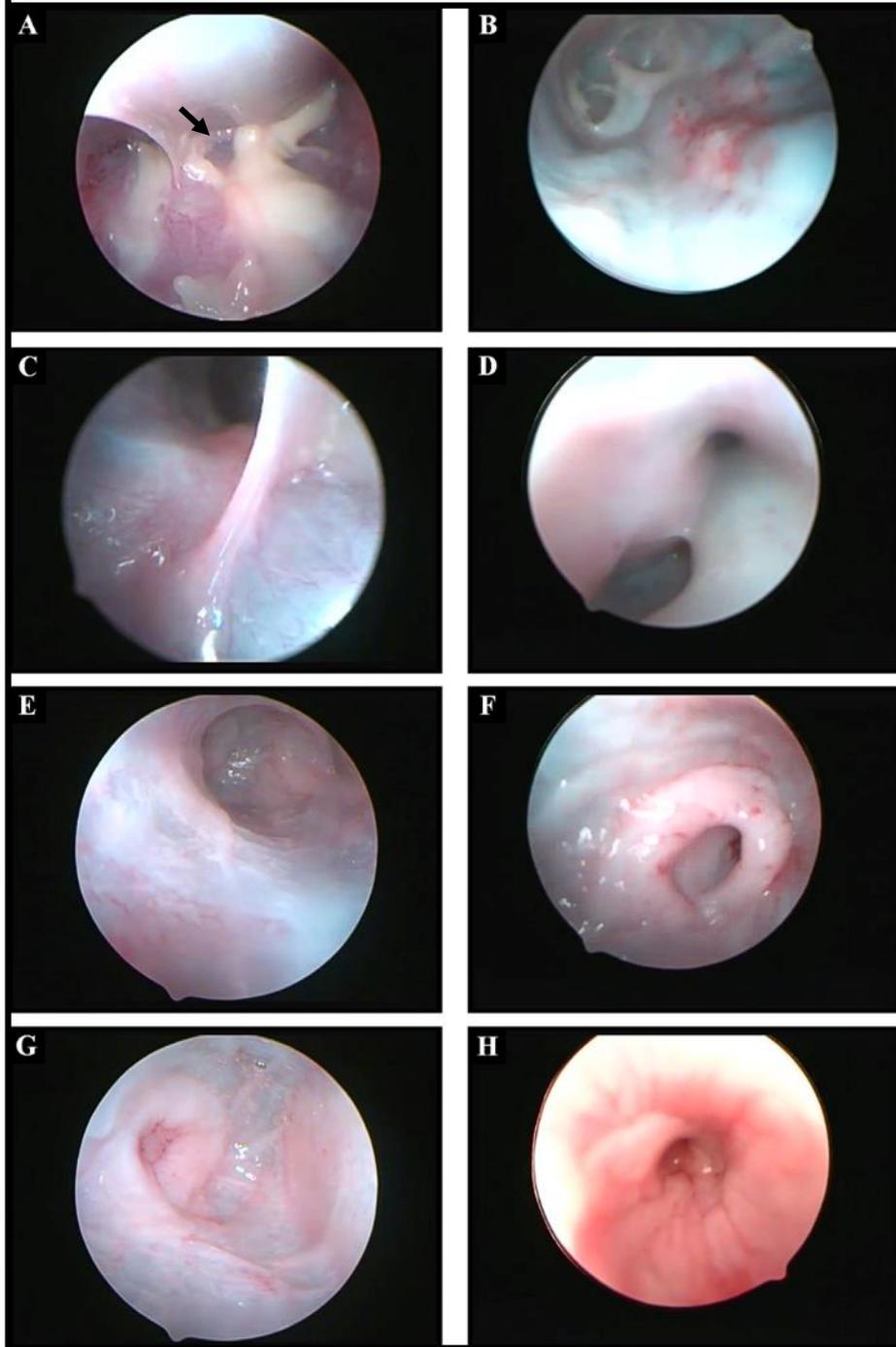
En hembras adultas no preñadas se visualizó el cuerno uterino desde la vagina hasta la unión útero-tubárica por videoendoscopia (Figura 18). Se detectaron pliegues transversales hiperémicos de la mucosa cornual que obstaculizaban la luz uterina. Se visualizó sobre el piso de la vagina secreción mucosa en forma de Y. La endoscopia permitió observar la vagina con sus dos regiones anatómicas (Weir, 1971a): craneal, con un rafe medial manifiesto y caudal, carente de esta estructura. La mucosa oviductual presentó disposición tortuosa con pliegues longitudinales.

FIGURA 17. APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA PRE-PÚBER.



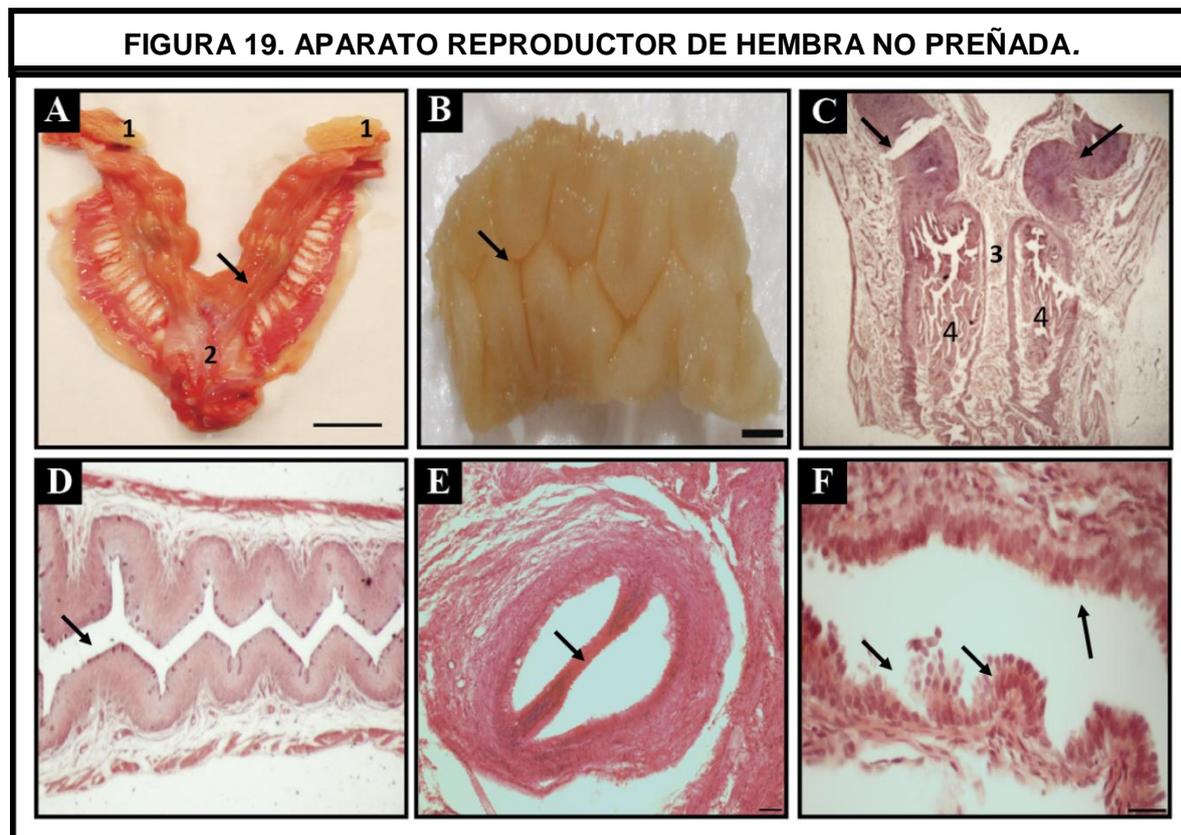
Aparato reproductor de la hembra pre-púber de *L. maximus*. Se observa bandas transversales en ambos cuernos uterinos (fechas). B) Epitelio vaginal: se muestra epitelio pseudoestratificado (↓) con células mucosas (flecha) (40x). C) Corte transversal de cuerno uterino. Se señala las tres tunicas: mucosa (↓), muscular (↓) y serosa (↓) (10x). D) Se muestra con más detalle el endometrio con escasas glándulas (flechas) (10x). E) Epitelio cilíndrico simple del cuerno uterino (flecha). El estroma apical presenta más celularidad (40x). Tinción Hematoxilina-Eosina. 1- ovario, 2- vagina, 3- estroma apical, 4- estroma basal, 5- luz uterina. Barra A: 0,5cm. Barra B y E: 20 µm. Barra C y D: 50 µm.

**FIGURA 18. ENDOSCOPIA EN HEMBRA DE *L. maximus*
NO PREÑADA.**



A) Se observa sobre el piso de la vagina caudal secreción mucosa en forma de "Y" invertida (flecha). B y C) Presencia de pseudotabique en vagina craneal de la vizcacha. D) Visualización del ingreso a ambos cuernos uterinos. E) Mucosa intracornual. F y G) Engrosamientos de la pared intracornual de *L. maximus* hacia la luz. H) Mucosa oviductual típica con múltiples pliegues longitudinales.

Macroscópicamente el cuerno uterino no preñado de *L. maximus* adulta presentó un bandeo longitudinal (Figura 19 A), que permite diferenciarlos de los cuernos pre-púberes donde el bandeo fue transversal. Esto evidencia el desarrollo muscular que presentaron estos cuernos uterinos. La pared uterina presentó diferencias de grosor: mayor desarrollo del sector más cercano al cérvix (Figura 19 B), disminuyendo de manera gradual hacia el ovario. Se observó la separación de ambos cuernos uterinos por medio de un septum vaginal en su región anterior (Figura 19 C). En cortes longitudinales del cuerno se observó luz uterina en forma de zig- zag (Figura 19 D). El oviducto, muy delgado y con disposición tortuosa, presentó una ampolla reducida y un istmo largo con muchos repliegues. Se detectaron tabiques dentro del oviducto que lo dividen en compartimentos (Figura 19 E). En la ampolla se han observado “células en clavo”, que tenían protrusión de sus núcleos hacia la luz y en algunas sólo se vio que su citoplasma emitía prolongaciones hacia la luz uterina (Figura 19 F).



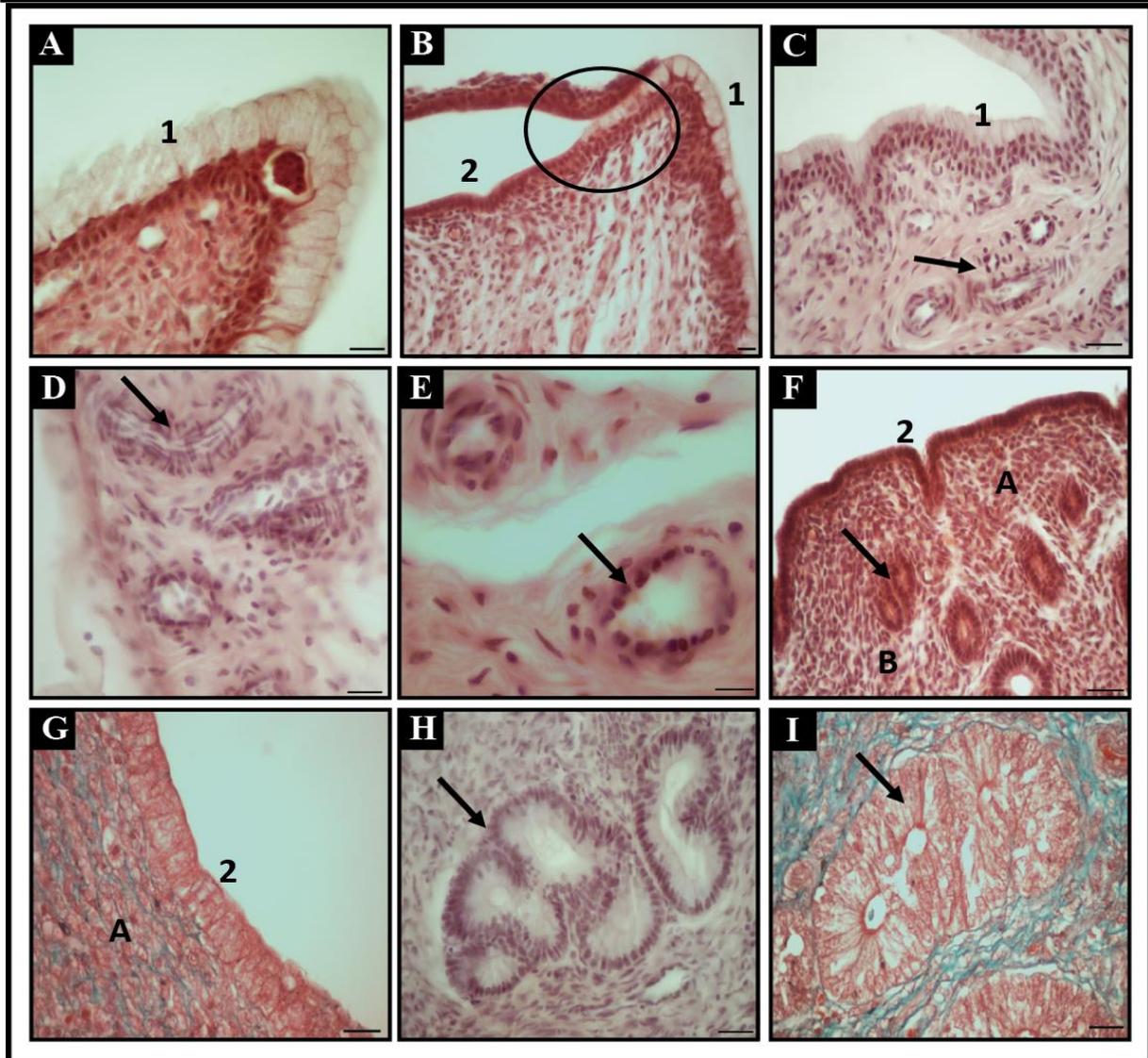
A) Aparato reproductor de la hembra no preñada, se visualiza el bandeo longitudinal (flecha). B) Corte longitudinal de la pared uterina del sector más cercano al cérvix. La luz uterina se presentó en zig-zag (flecha). C) Corte longitudinal de la vagina y el sector uterino S1 (flechas). Se muestra tabique en la región más craneal (1x). D) Corte longitudinal del cuerno uterino, se observa luz en zig-zag (flecha) (6.3x). E) Tabique (flecha) que divide en compartimentos dentro del oviducto (10x). F) Presencia de células “en clavo” en la ampolla (flechas) (40x). 1- ovario, 2- vagina, 3- septum vaginal, 4- vagina anterior. C-F Tinción de Hematoxilina-Eosina. Barra A: 1cm. Barra B: 0,25cm. Barra E: 50 μ m. Barra F: 20 μ m.

El cérvix no es muy marcado, parecería tener una continuidad directa con el cuerno uterino por medio de un repliegue de mucosa y submucosa con poco desarrollo muscular.

Histológicamente la vagina presentó: mucosa (epitelio estratificado con capa superficial de células mucosas, Figura 20 A-C), músculo liso y serosa (conjuntivo y mesotelio) en la región anterior con presencia de tabique y en la región caudal adventicia (conjuntivo), sin tabique. El cambio epitelial con el cornual se realiza bruscamente (Figura 20 B). Se identificaron a nivel vaginal, principalmente, vénulas de endotelio alto (HEV) que presentaron un epitelio cúbico simple. Si bien el endotelio de arteriolas fue típico, los núcleos de las células epiteliales y musculares se cruzaban (Figura 20 C-E). Estos hallazgos no fueron tan evidentes en los cuernos uterinos. En ellos se visualizaron las 3 túnicas características: mucosa (epitelio simple cilíndrico, Figura 20 F y G), muscular (capa externa longitudinal y capa interna circular) y serosa que presentó epitelio cúbico simple. El endometrio perteneciente a la región más cercana al cérvix presentó mayor densidad glandular. El estroma basal tuvo menor índice celular y glándulas de mayor tamaño que el estroma apical en el que hubo mayor índice de celularidad (Figura 20 H e I).

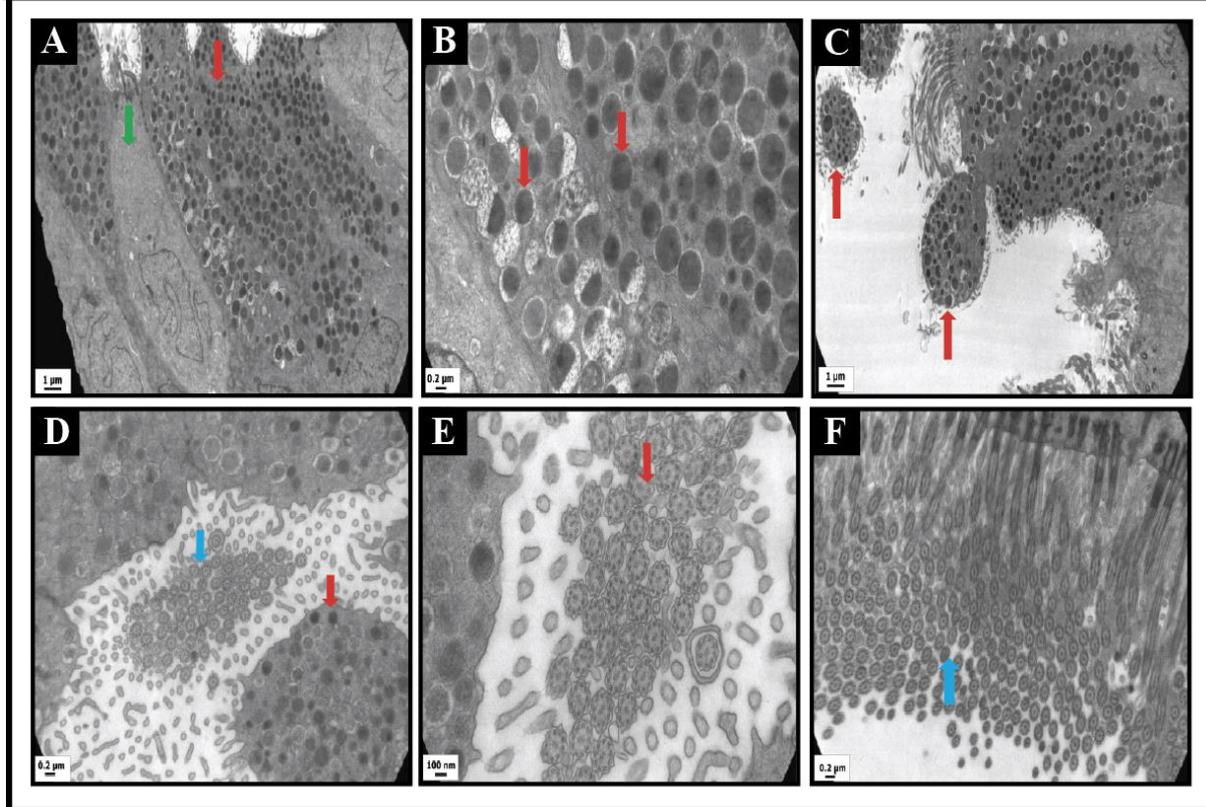
En la M.E.T se observaron células ciliadas y secretoras en el epitelio oviductal (Figura 21 A). Se visualizó intensa actividad secretora (Figura 21 B). Las células epiteliales secretoras presentaron abundantes gránulos de secreción en el citoplasma que eran liberados activamente hacia la luz del oviducto (Figura 21 C). El producto de secreción se eliminó junto a parte del citoplasma apical (Figura 21 D). Se vio en detalle la superficie apical de las células ciliadas (Figura 21 E y F).

FIGURA 20. VAGINA Y CUERNO UTERINO DE LA HEMBRA NO PREÑADA.



A) Epitelio vaginal con gran cantidad de células mucosas (1) (40x). B) Cambio de epitelio vaginal (1) a cuerno uterino; el círculo demarca la región de transición del epitelio (2) (40x). C-) Se muestran arteriolas con núcleos en cruz y vénulas de epitelio alto (40x) (flecha). D) Detalle de las arteriolas con núcleos cruzados (flecha) (100x). E) Detalle de vénula con epitelio alto (flecha) (100x). F) Epitelio cilíndrico simple del cuerno uterino con estroma apical (A) más celular que el basal (B) (flecha) (40x). G) Detalle del epitelio cornual (40x). H -I) Glándulas endometriales agrupadas (flecha) (40x). G e I- Tinción de Tricrómico de Masson, el resto de las fotos presenta Tinción de Hematoxilina-Eosina. Barra A, C y F-I: 20 μ m. Barra B, D-E: 10 μ m.

FIGURA 21. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DEL OVIDUCTO



A) Visualización intercalada de células secretoras (↓) y no secretoras (↓). B) Gránulos de secreción (↓). C) Desprendimiento de las células secretoras oviductuales hacia la luz (↓). D) Se observó cilias en el centro de la foto (↓). Se visualizó desprendimiento del citoplasma con gránulos de secreción (↓). E) Detalle de las cilias de las células oviductuales con típica estructura de 2 + 9 (↓). F) Superficie apical ciliada (↓). Barra A y C: 1 μm. Barra B, D y F: 0,2 μm. Barra E: 100 nm.

6.1.2.1 Tratamientos con estrógeno (E2) o progesterona (P4)

La administración experimental de hormonas (E2 y P4), permitió observar y analizar los cambios a nivel uterino, producto de la respuesta a las mismas.

Los animales tratados con estrógenos presentaron un desarrollo de la pared uterina en su observación macroscópica, con escasa luz uterina. En su endoscopia se visualizó la mucosa cornual edematosa con repliegues longitudinales (Figura 22 A y B).

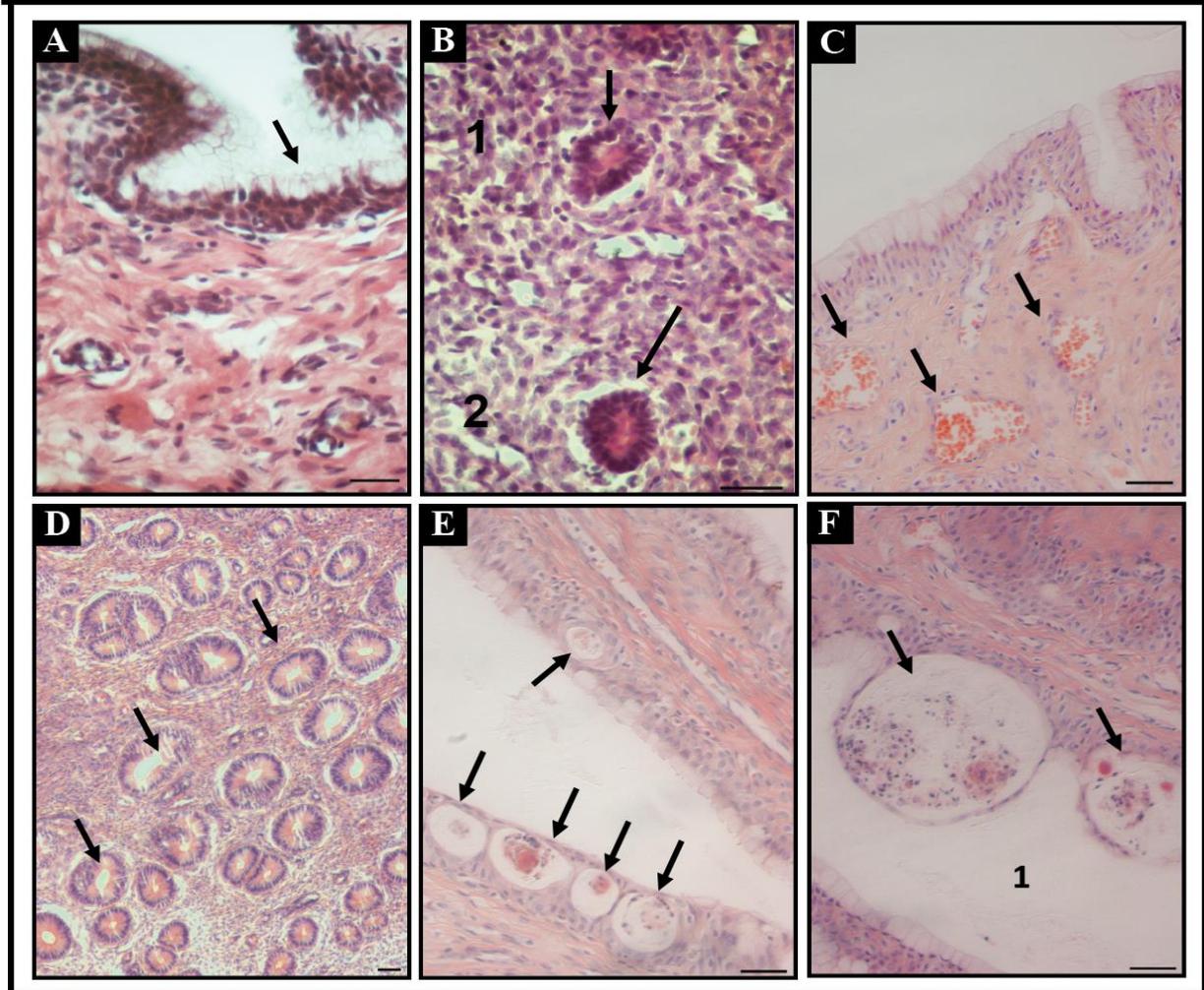
En el análisis histológico de las muestras se observó el epitelio vaginal con gran cantidad de células mucosas (Figura 23 A). En el endometrio las glándulas se presentaron sin secreción, con luz muy pequeña (Figura 23 B). El epitelio endometrial del lado anitmesometrial (AMe) y mesometrial (Me) se contactaban, siendo la luz uterina muy escasa; el estroma se mostró hipertrófico.

Los animales tratados con progesterona, en la endoscopia presentaron un tapón vaginal color amarronado (Figura 22 C). Se evidenció un cambio en la apariencia de la mucosa cornual y una mayor luz uterina con menor grosor de la pared. La histología reveló la vagina y los cuernos uterinos hiperémicos. Se observó un desarrollo glandular con proliferación del epitelio luminal cilíndrico. Las glándulas endometriales se presentaron aumentadas, con luz evidente (Figura 23 D). Hacia la región basal, las glándulas aparentan ser más grandes y se observó mayor densidad glandular del lado AMe. El tejido conectivo endometrial se va haciendo más laxo hacia la región apical. Se presentaron abundantes vasos sanguíneos entre el endometrio y la capa muscular circular interna. Los animales tratados con P₄ presentaron la vagina quistes intraepiteliales: estructuras cerradas, rodeadas de epitelio plano simple que en su interior contenían productos de descamación sin componentes inflamatorios (Figura 23 E). Los de mayor tamaño protruían hacia la luz uterina (Figura 23 F).



Animales tratados con estrógenos (A y B) o con progesterona (C y D). A) Se visualiza mucosa edematosa. Se marca el septum vaginal (flecha) en la bifurcación de los cuernos uterinos. B) Mucosa cornual edematosa con pliegues longitudinales (flecha). C) Presencia de secreciones y mucosa más irrigada (flechas). D) Mucosa cornual muy irrigada (flecha).

FIGURA 23. HISTOLOGÍA DEL TRACTO REPRODUCTOR DE ANIMALES TRATADOS CON HORMONAS.

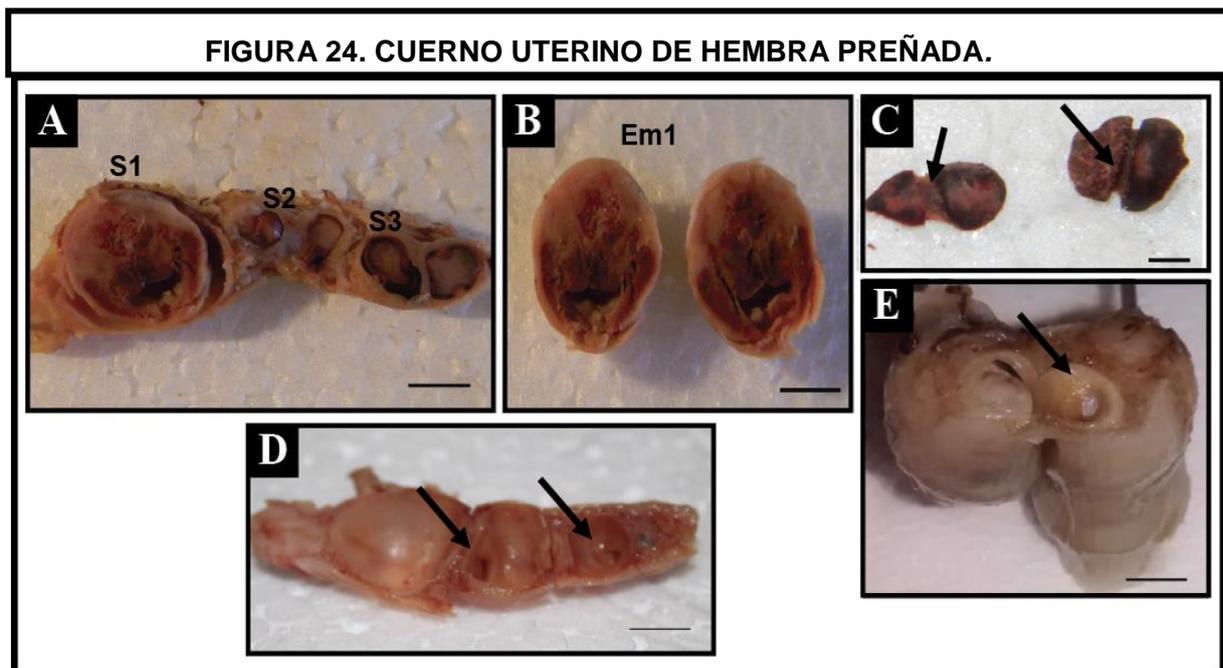


A y B. Animales tratados con estrógenos (E2). C – F. Animales tratados con progesterona (P4). A) Vagina donde se visualiza epitelio cilíndrico con células mucosas (flecha) (40x). B) Cuerno uterino. Se observa en la parte más apical tejido conectivo denso (1) y en la parte más basal el tejido conectivo es laxo (2). En ambos tejidos se observan glándulas con escasa luz (flechas) (40x). C) Vagina muy irrigada, se señalan vasos sanguíneos (flechas) (20x). D) Se muestra la alta densidad glandular, con luz amplia (flechas) (10x). E) Se visualizaron estructuras cerradas intraepiteliales (flechas), rodeadas por epitelio plano simple (x20). F) Dos estructuras (flechas) que por su gran tamaño protruyen a la luz uterina (1) (x20). Tinción Hematoxilina- Eosina. Barra A y B: 25 μ m. Barra C-F: 50 μ m.

6.1.3 Análisis macroscópico e histológico de la hembra adulta preñada.

Los cuernos con preñez temprana (Figura 24) fueron analizados macroscópicamente. Si bien se han descrito 5 implantaciones en cada cuerno uterino (Roberts y Weir, 1973), en algunos casos se ha detectado mayor número de implantaciones, siendo el máximo encontrado de 14 embriones (8 en un cuerno uterino y 6 en el otro). Se observaron diferencias de tamaño y de color entre las vesículas embrionarias (Figura 24 A), siendo la de

mayor tamaño la más cercana al cérvix (S1) que presentó más color blanquecino (Figura 24 B) y el resto mostró una coloración rojiza-amarronada. Las vesículas necrosadas se presentaron como una esfera con un extremo en forma de “gancho” (Figura 24 C), debido a la presencia de pseudo-tabiques entre los diferentes embriones, dejando un ojal que comunica las vesículas adyacentes (Figura 24 D y E).



A) Corte longitudinal de un cuerno uterino con preñez temprana. Se observa en S1 el embrión que llegará a término y en los restantes sectores (S2 y S3) se encuentran embriones en reabsorción. B) Vesícula embrionaria (Em1) más cercana al cérvix. C) Restos de vesículas embrionarias reabsorbidas, se observa surco que coincide con los pseudotabiques. D) Cuerno uterino con remoción de vesículas embrionarias, se señalan ojales que comunican las vesículas vecinas. E) Detalle de la conexión entre Em1 y Em2. Presencia de pseudotabique. Barra A-B y D-E: 0,5cm. Barra C: 0,2 cm.

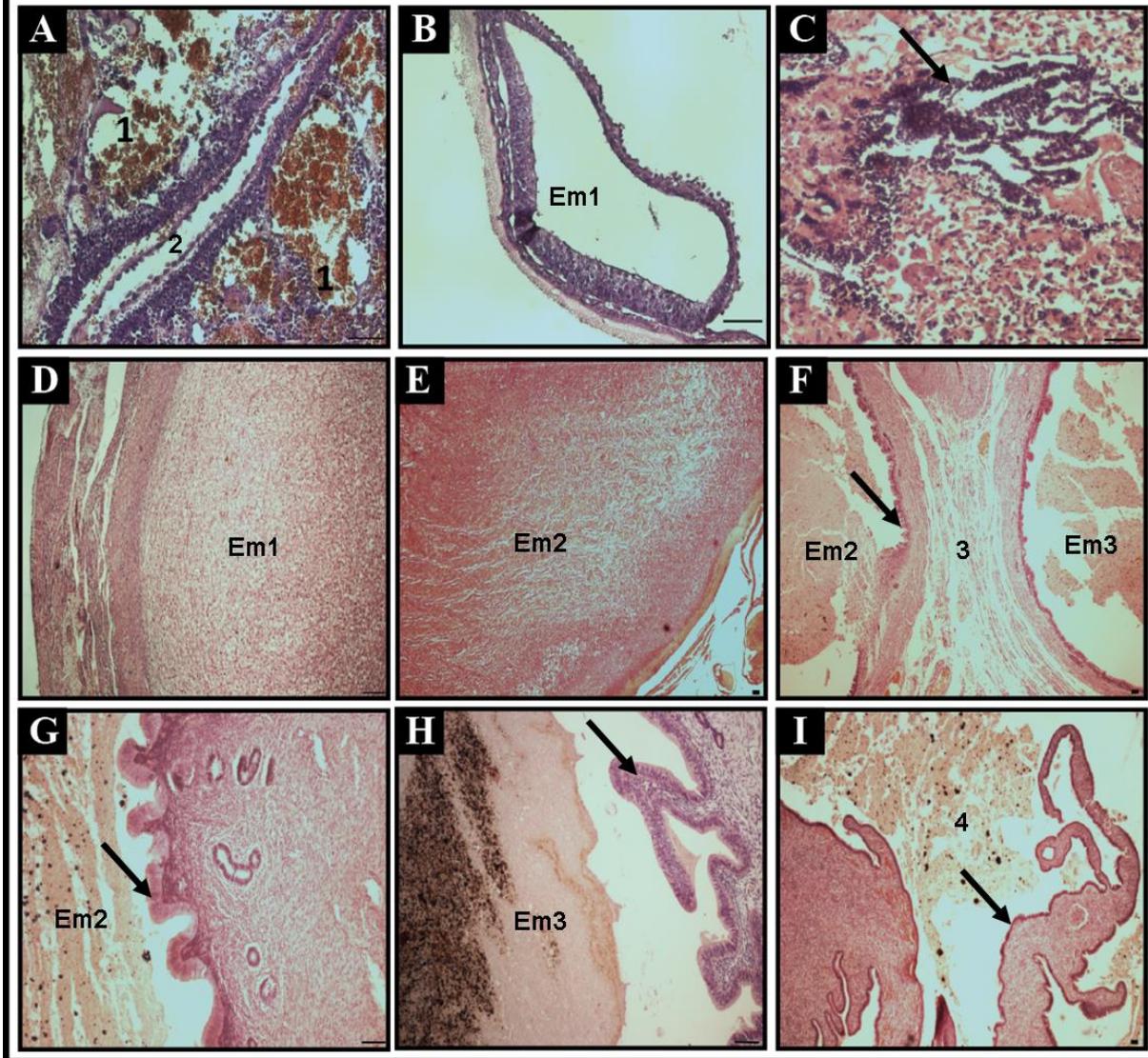
Al evaluar histológicamente los embriones (Figura 25), en un mismo cuerno uterino, se encontró que los más cercanos al ovario estaban en un proceso de reabsorción más avanzado que los que se encontraban más cercanos al cérvix. Las vesículas embrionarias ubicadas más cercanas al cérvix (S1) fueron las únicas que presentaron estructuras embrionarias normales, como de implantación definido y lagunas maternas donde se evidenció que la barrera hemomonocorial se estableció tempranamente (Figura 25 A y B). Mientras que en un cuerno uterino en S2 se observó restos de saco vitelino y embrión invadido por células inflamatorias (Figura 25 C), en S3 sólo se identificó un foco central de necrosis y material fibrinoide. A diferencia de lo que ocurre en la Em1 que sobrevive (Figura

25 D), las que se reabsorben presentaron alteraciones histológicas en su organización (Figura 25 E-I). Éstas últimas presentaron un trofoblasto desorganizado, una zona hemorrágica, material fibrinoide, necrótico y células inflamatorias que se localizaron en el interior de la vesícula embrionaria (Figura 25 E). El extremo en forma de “gancho” estaba formado por decidua capsular. En el cuerno uterino se han visualizado prolongaciones uterinas que estrechan la luz, entre las vesículas embrionarias, compuestas por tejido conectivo con vasos sanguíneos en su interior (Figura 25 F). El endometrio no pareció tener la misma respuesta, ya que sólo se observaron ondulaciones de la superficie uterina en las zonas donde estaban los embriones que se reabsorberán (Figura 25 G y H). En grados muy avanzados del proceso de pérdidas embrionarias se encontraron colgajos uterinos entre restos de reabsorción (Figura 25 I). En las vesículas embrionarias se evaluó la apoptosis (Ver en Implantación).

6.1.4 Análisis macroscópico e histológico de la hembra adulta en lactancia.

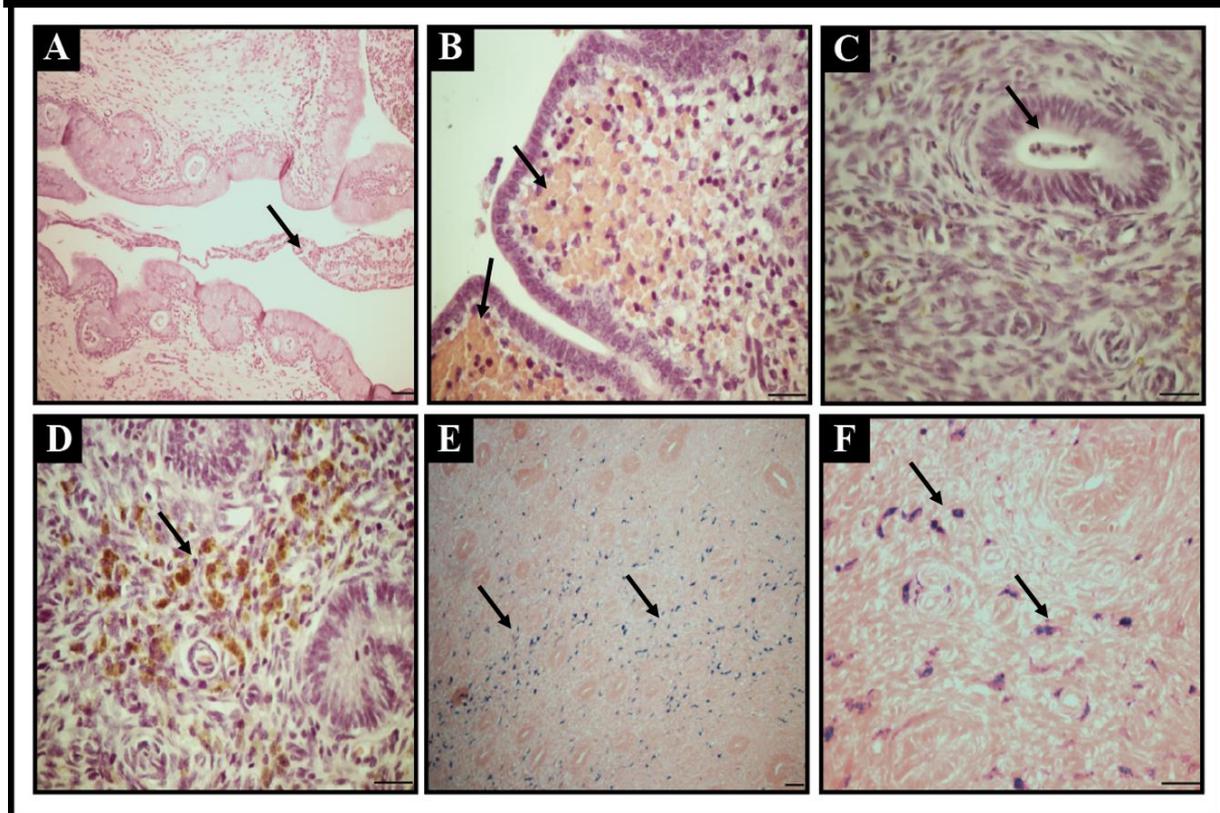
En el análisis sectorial de los cuernos uterinos en lactancia (Anestro, Figura 26) se encontró detritus celular en la luz uterina y la vagina (Figura 26 A). En esta última se observaron plegamientos fructuosos hacia la luz con secreciones. Había extravasación de glóbulos rojos en el endometrio (Figura 26 B), hemorragia previa a hemosiderosis que fue visualizada como múltiples focos, predominando del lado AMe donde suceden las implantaciones (Roberts y Weir, 1973). Las glándulas endometriales se presentaron con escasa secreción (Figura 26 C). Se visualizaron macrófagos como puntillado amarillo (Figura 26 D). El estroma mostraba signos de reorganización. La tinción de Azul de Prusia marcó de color turquesa el hierro libre en forma de gránulos (Figura 26 E y F). Este trastorno pigmentario se hizo presente en todos los cuernos de *L. maximus* en lactancia.

FIGURA 25. CUERNO UTERINO DE LA HEMBRA PREÑADA TEMPRANA.



A) La vesícula más cercana al cérvix presentó lagunas maternas (1) y entre medio de las mismas se ubicó el saco vitelino (2) (40x). B) Embrión correspondiente al sector uterino más cercano al cérvix (Em1) (40x). C) Vesícula Em2 donde se visualiza infiltrado inflamatorio y restos del saco vitelino (flecha) (40x). D) Embrión que llega a término (Em1) presentó trofoblasto organizado (10x). E) Em2 muestra trofoblasto desorganizado con gran cantidad de fibroblastos (4x). F) Pseudotabique (3) con prolongaciones uterinas hacia la luz que separa embriones (Em2 y Em3) (flecha) (4x). G- H) Se visualizan repliegues del epitelio uterino con presencia de embrión (Em2 y Em3) en reabsorción en la luz (flecha) (10x). I) Colgajos uterinos (flecha) que ocupan parte de la luz uterina y entre medio el resto de reabsorción (4x). Barra A-C: 20 μ m. Barra D- I: 50 μ m.

FIGURA 26. APARATO REPRODUCTOR DE HEMBRA EN ANESTRO.



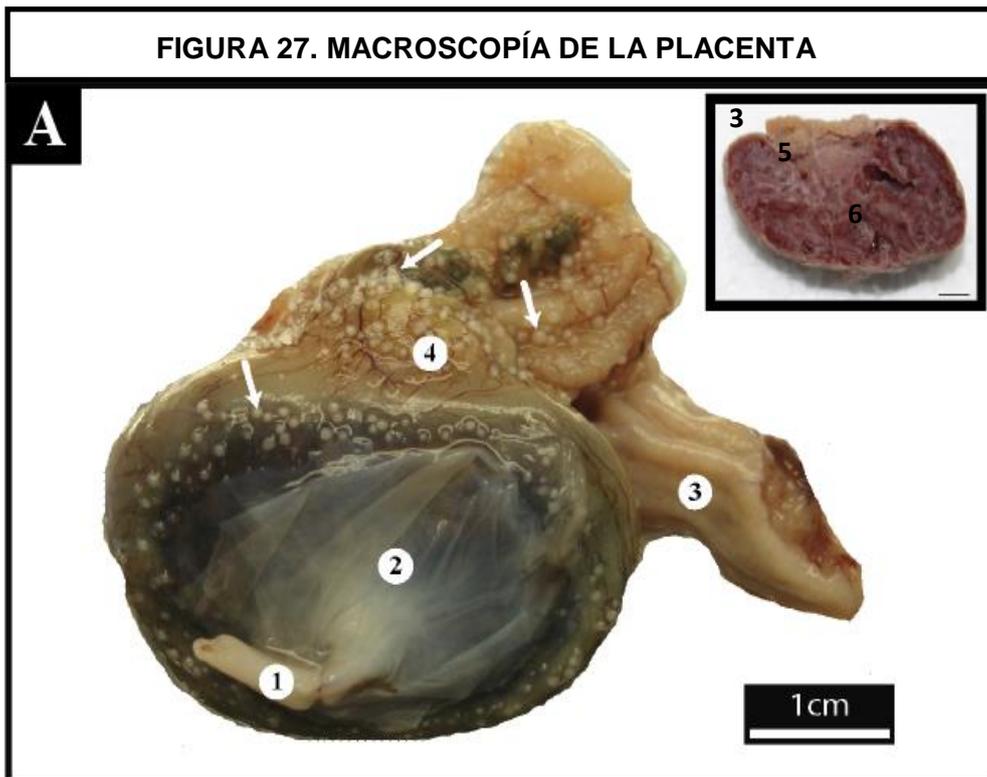
A) Detritus celular (flecha) en la luz vaginal (10x). B) Hemorragia subepitelial (flecha) (40x). C) Glándulas endometriales con escasa secreción (flecha) (40x). D) Macrófagos en el endometrio (flecha) (40x). E) Tinción de Azul de Prusia. Se visualizan gránulos turquesas (flechas) que marcan hemosiderosis (20x). F) Detalle de los gránulos de hemosiderosis (flechas). A-D: Tinción de Hematoxilina y Eosina. E y F: Tinción de Azul de Prusia. Barra A: 50 µm y Barra B – F: 20 µm.

6.2 ANÁLISIS MACROSCÓPICO E HISTOLÓGICO DE LA PLACENTA DE *L. maximus*

En el análisis macroscópico, las placentas presentaron “perlas blanquecinas” sobre su superficie a partir de la gestación intermedia. La cara fetal estaba recubierta por el saco vitelino al que se le anclan estas estructuras (Figura 27).

Al análisis estadístico, existe una asociación lineal entre el peso de la placenta y el peso del feto ($p= 9.3 \times 10^{-4}$, $r = 0,39$). También existe una asociación lineal entre las variables: peso de la placenta y tamaño del feto ($p= 5,9 \times 10^{-4}$, $r = 0,41$) (Anexo 10.1).

FIGURA 27. MACROSCOPIA DE LA PLACENTA



Placenta de la gestación intermedia. Se observan restos del cordón umbilical (1) y del amnion (2) que fueron removidos. Ambos libres de estructuras perladas. Estas estructuras se visualizan en la decidua (3) y en la cara fetal alrededor del amnion (4) y presentaron un diámetro de 1mm (flechas). En el corte transversal (Vértice superior derecho) se observa: decidua (3), subplacenta (5) y laberinto (6).

Se analizaron las concentraciones hormonales, medidas por radioinmunoensayo, pertenecientes a las tres regiones de la placenta (decidua, subplacenta y laberinto) (Tabla 5) y se observó que no hubo diferencias significativas ($p > 0,07$) en los niveles de E2 ni P4 entre las mismas.

La comparación de los niveles hormonales en cada región placentaria entre los diferentes estadios reproductivos no arrojó diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,18$) para P4. Para el caso del E2, se encontraron diferencias significativas ($p=0,018$) siendo la de menor concentración la decidua de la placenta a término, luego la de placenta intermedia ovulando y la de mayor concentración fue la de preñez intermedia no ovulando. No hubo diferencias en el E2 de las subplacentas entre grupos. Se encontraron diferencias significativas de E2 entre el laberinto ($p= 5 \times 10^{-4}$); la mayor cantidad se encontró en la placenta de intermedia no ovulando, luego la de preñez a término y la de menor concentración fue la placenta intermedia ovulando.

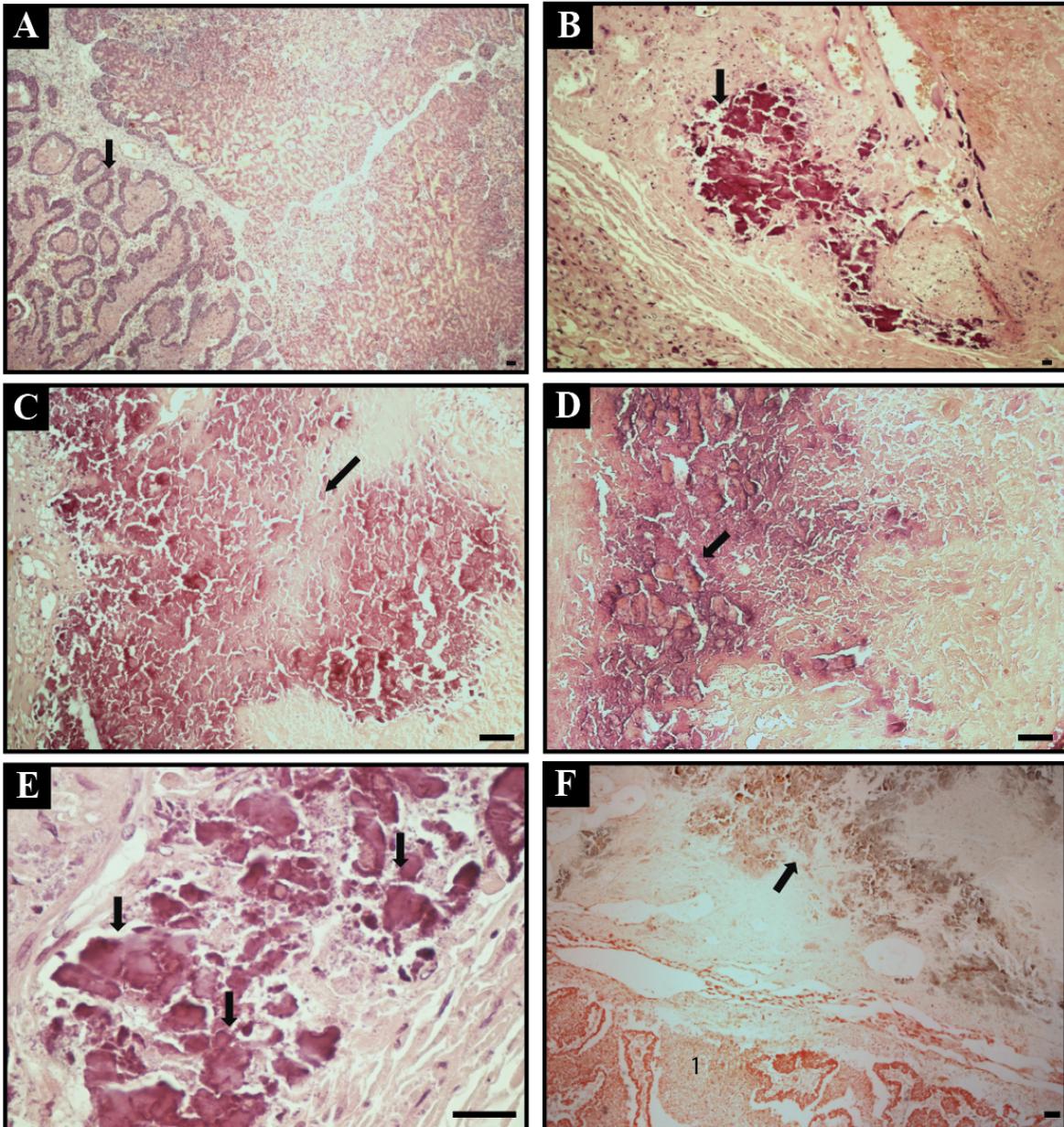
Tabla.5 Concentración de hormonas esteroideas (E ₂ y P ₄) en placenta de <i>L. maximus</i>							
	Hormona	Localización					
		Decidua		Laberinto		Subplacenta	
		E ₂	P ₄	E ₂	P ₄	E ₂	P ₄
Estadio	Preñada Intermedia No Ovulando	340,2±403,8	1840,1±860,3	162,2±57,3	1925,6±1131,4	390,7±518,2	2486,2±837,7
	Preñada Intermedia Ovulando	173,5±54,2	1906,9±673,9	33,3±32,7	1903,6±508,3	171,6±35,2	1625,8±1011,5
	Preñez a Término	35,0±35,3	1228,0±926,8	86,8±19,1	2139,8±2347,2	174,3±20,0	1566,4±1779,2

Las placentas pertenecientes al sector S1 en el comienzo de la gestación intermedia, presentaron depósitos de calcio (Figura 28A - B). Con el avance de la gestación, los densos agregados de minerales se fusionan y forman gránulos cada vez mayores en la decidua basal haciéndose más notorios por encima de la subplacenta (Figura C-E). Los depósitos se evidenciaron con la Tinción de von Kossa, donde aparecen de color pardo-negrusco sobre un fondo rojo (Figura 28F).

Las placentas de la vizcacha localizadas en el sector más cercano al cérvix presentaron tempranamente una calcificación distrófica; este proceso fisiológico indica un envejecimiento placentario.

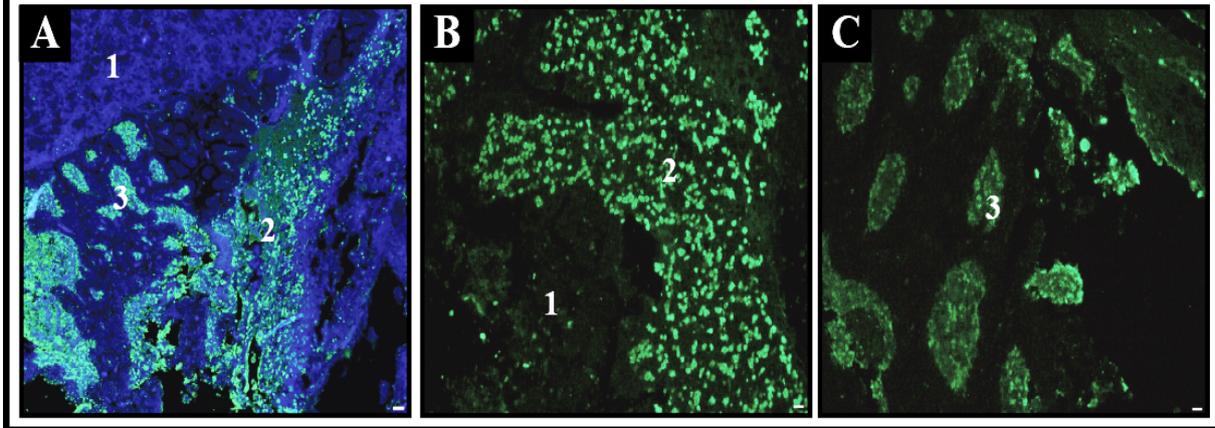
Se analizaron placentas correspondientes a preñez intermedia y a término mediante la técnica de tunel (Terminal deoxytransferase- mediated bio-dUTP Nick End Labelling) para detectar apoptosis (Figura 29). En las placentas de preñez intermedia se observaron células en apoptosis en la subplacenta y en la decidua basal (Figura 29G y H). Mientras que en las placentas de preñez más avanzada observaron células tunel positivas únicamente en la subplacenta (Figura 29I). El sector del laberinto no mostró positividad para tunel en ninguno de los dos estadios.

FIGURA 28. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LAS PLACENTAS DE *L. maximus*.



A) Placenta perteneciente a una preñez intermedia temprana que muestra la subplacenta (flecha) y el laberinto (4x) sin calcificación. B) Presencia de calcificación en decidua basal (flecha) (4x). C) Calcificación distrófica, se observan zonas necróticas (flecha) (40x). D) Placenta a término, se visualiza zona necrosada y depósitos minerales en la zona de aspecto rocoso (flecha) (40x). E) Detalle de los depósitos rocosos (flechas) (40x). F) Depósitos de calcio en color negruzco (flecha) por encima de la subplacenta en la decidua basal (4x). A-C: Placenta de gestación intermedia. D-F: Placenta de gestación a término. A-E: Tinción de Hematoxilina- Eosina. F: Tinción de Van Kossa.

FIGURA 29. APOPTOSIS EN LA PLACENTA DE PREÑEZ INTERMEDIA Y A TÉRMINO.



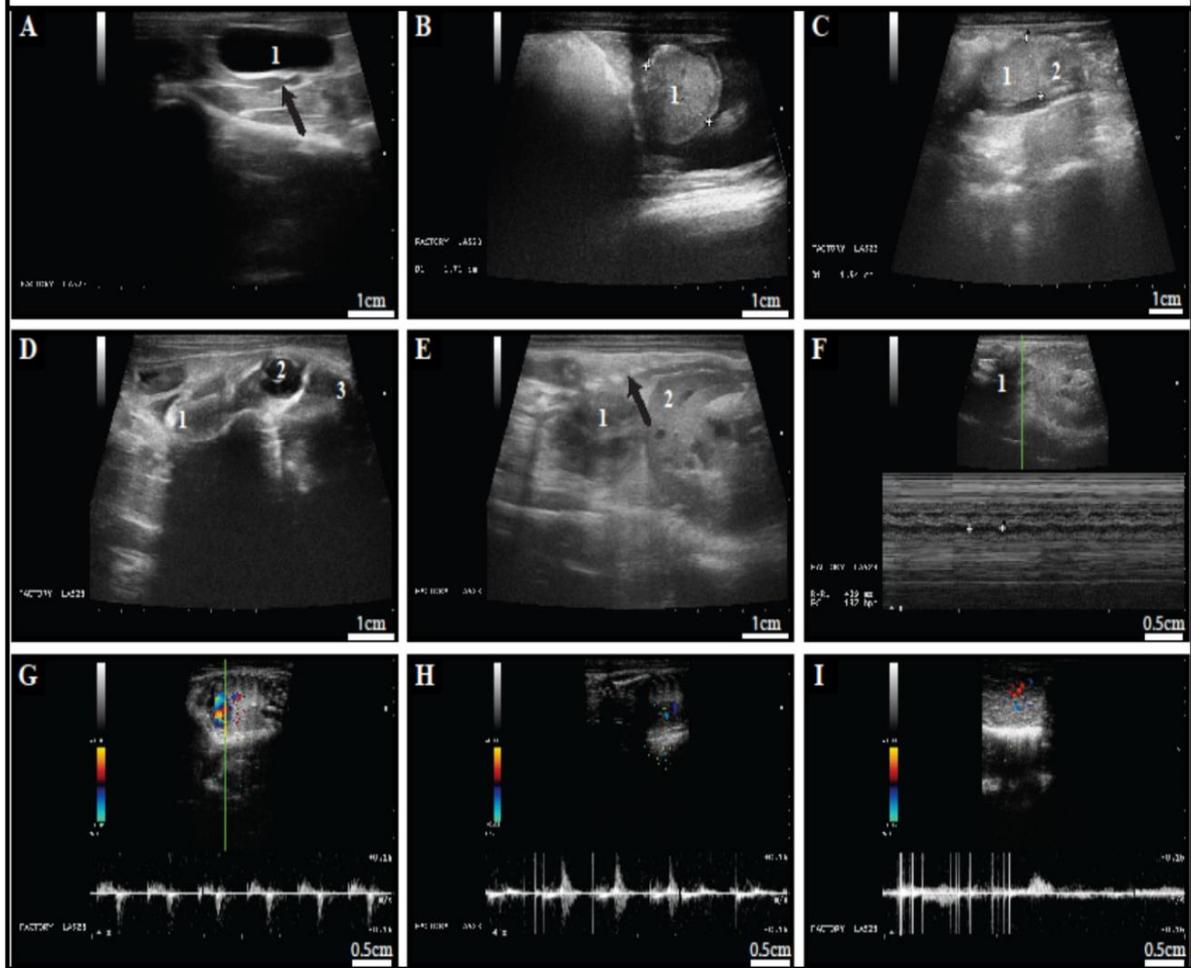
A) Placenta de gestación intermedia, se observa marca en la decidua basal (2), subplacenta (3). Laberinto (1) negativo. B) Decidua basal (2) con apoptosis. Laberinto sin marca (1). C) Placenta de gestación a término. Subplacenta (3) con apoptosis (flechas).

6.2.1 Análisis estructural y subestructural de las “perlas” de la placenta de *L. maximus*.

Con la finalidad de continuar el estudio de las “estructuras perladas” se realizaron ecografías para definir el estado reproductivo de las hembras capturadas. En caso de estar preñadas, se evaluaron los parámetros vitales de los fetos para confirmar que la gestación continuaba su curso (Figura 30). Estas estructuras perladas no se visualizaron en las ecografías.

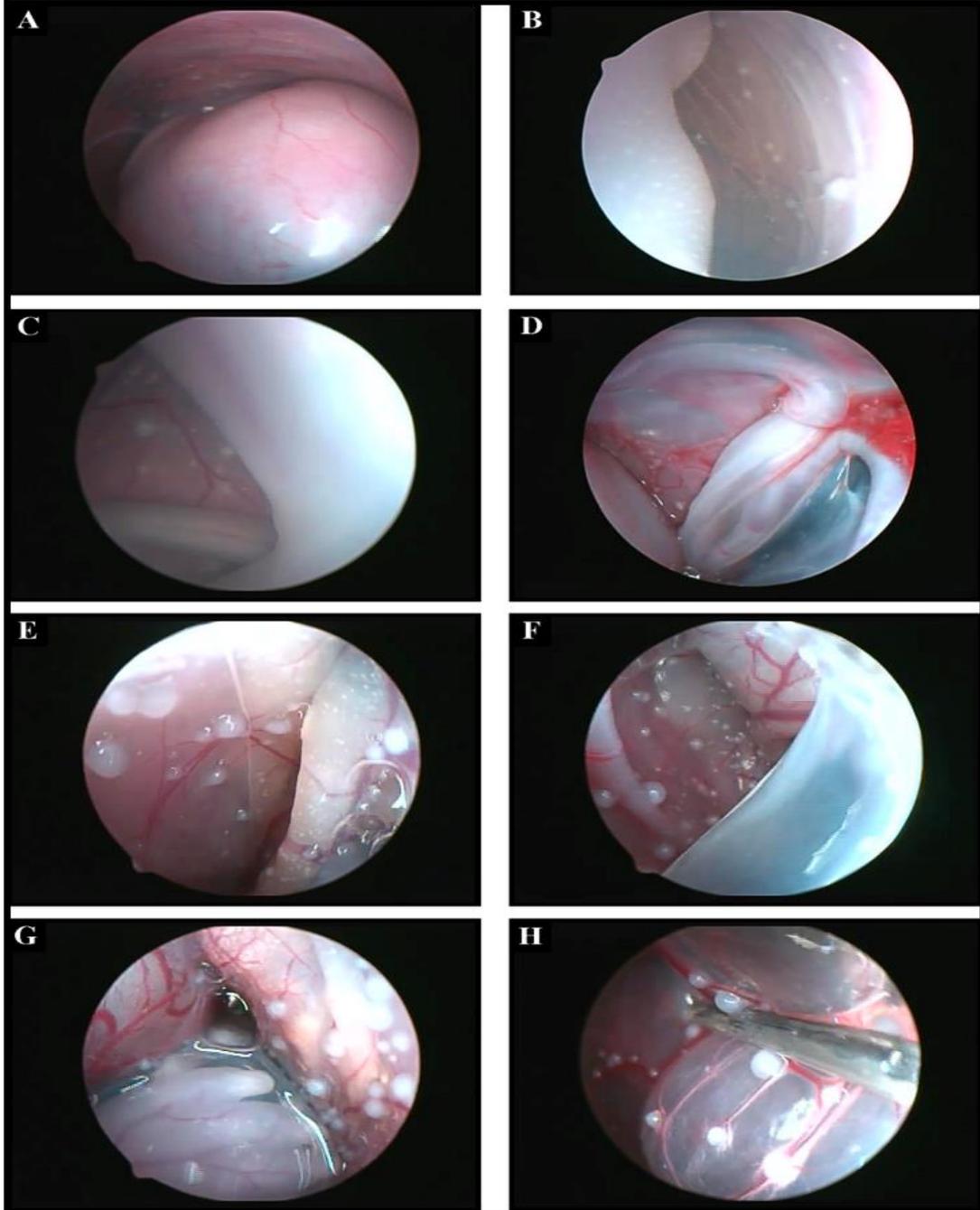
En las endoscopías de las hembras preñadas con gestación mayor a 90 días, se observaron perlas blanquecinas de 1mm de diámetro en el espacio extracelómico (Figura 31 y 32), que seguían el recorrido vascular. El amnios se presentó avascular, sin evidencias de presencia de estructuras perladas, que tampoco se presentaron sobre el cordón umbilical.

FIGURA 30. ECOGRAFÍAS Y ECO-DOPPLER EN *L. maximus*.



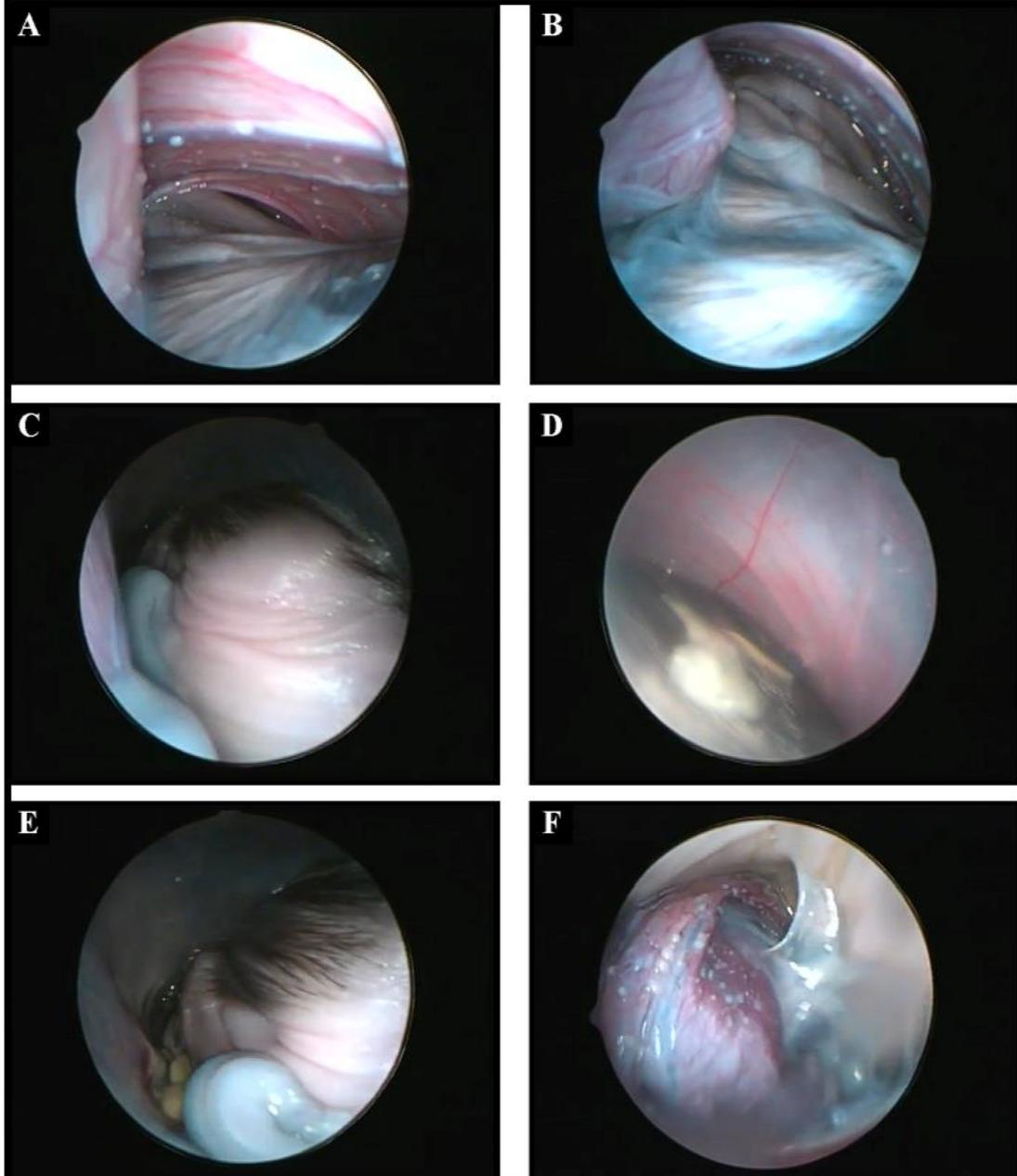
A) Ecografía de la hembra no preñada. Se visualiza la vejiga anecoica (1) y por debajo el cuerno uterino vacío (flecha). B) Corte transversal de un feto de preñez intermedia donde se mide su diámetro abdominal (1). C) Corte longitudinal de un feto de preñez intermedia donde se mide diámetro del tórax. D) Ecografía craneal de un feto a término. Se observa fosa nasal (1), cavidad ocular (2) y occipital (3). E) Corte longitudinal de un feto a término. En craneal se observa el corazón y en caudal el hígado. Por dorsal se visualiza la columna vertebral del feto. F) Ecografía en Modo-M. Se realiza un corte a nivel cardíaco para medir la frecuencia cardíaca como parámetro de vitalidad fetal. G, H I) Doppler en fetos para mostrar su vitalidad.

FIGURA 31. ENDOSCOPIA DE LA HEMBRA CON PREÑEZ INTERMEDIA MAYOR A 90 DÍAS.



A) Se visualiza la región cefálica del feto dentro del útero. B) A la izquierda se observa parte del feto y a la derecha parte del cuerno uterino con estructuras perladas blancuecinas. C) A la izquierda amnion libre de estructuras perladas, a la derecha se observan dichas estructuras y la cola del feto. D) Placenta *in situ* (flecha) donde se ve cómo sale el cordón umbilical. E) Membrana extraembrionaria apoyada sobre el cuerno uterino. Muy irrigada y con presencia de estructuras perladas. F) Se visualiza el amnion a la derecha de la foto libre de estructuras perladas y a la izquierda membrana con estructuras perladas. G) En el centro de la foto se observa mano dentro del amnion. H) Estructuras perladas siguen el recorrido de los vasos sanguíneos.

FIGURA 32. ENDOSCOPIA DE LA HEMBRA CON PREÑEZ A TÉRMINO.



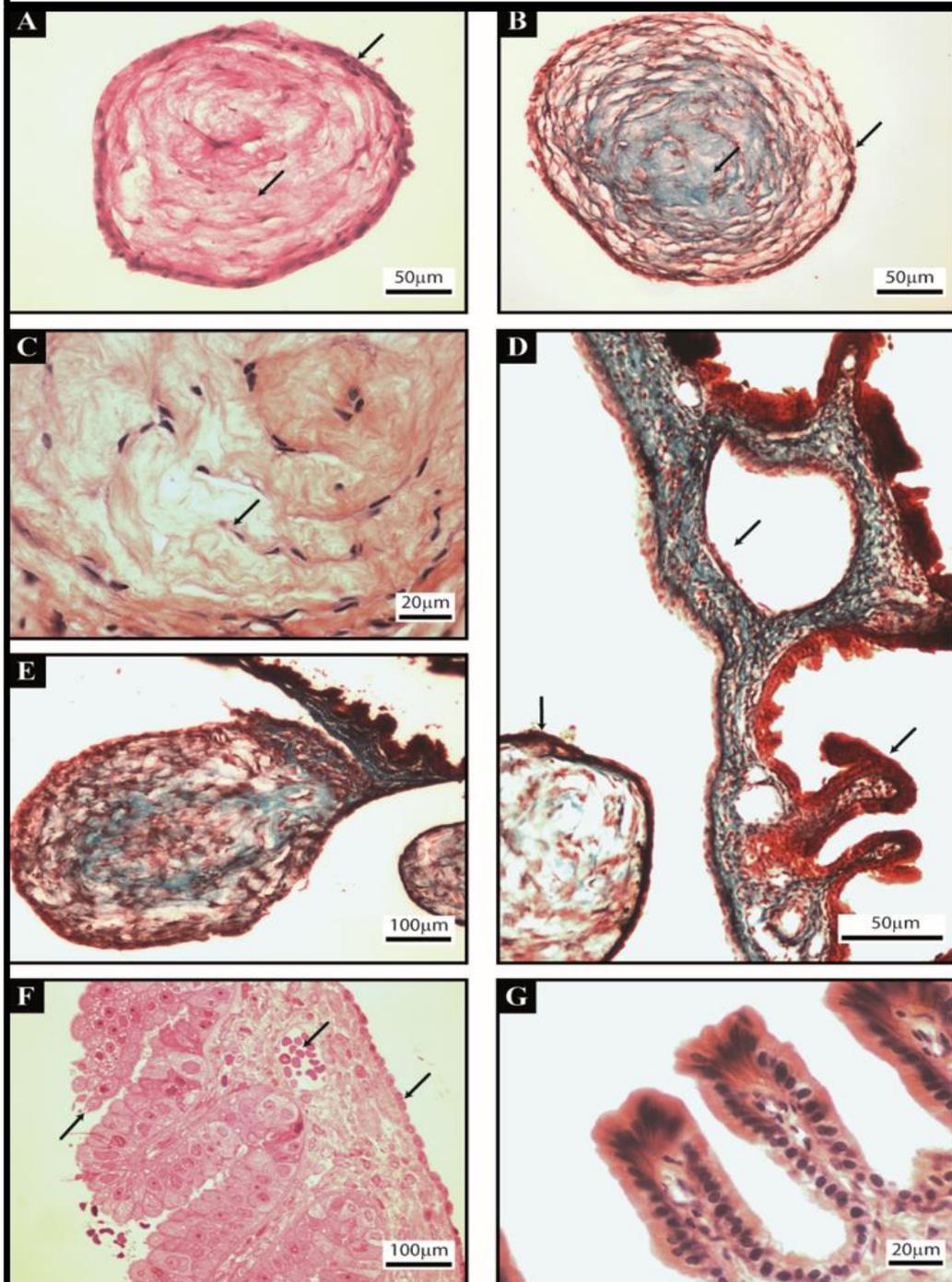
A y B) Se observa por debajo el feto con manto piloso cubierto por amnion y por encima se visualiza el cuerno uterino recubierto por la membrana extraembrionaria y estructuras blancuecinas siguiendo el recorrido de los vasos sanguíneos. C) Feto dentro del cuerno uterino en el interior del amnion, visualizado desde ventral. Se observa parte del cordón umbilical (Flecha). D) Se señala meconio sobre el manto piloso del feto, por debajo del amnion. E) Observación dentro del amnion. Se visualiza parte del feto, el cordón umbilical y el meconio. F) Placenta *in situ* con membrana extraembrionaria que recubre cara fetal. Se observa la adhesión del amnion a la placenta.

Las perlas blanquecinas, en la microscopía óptica (Figura 33), se presentaron en la membrana extraembrionaria rodeadas por un epitelio simple plano y en su interior, muestran capas espiraladas de tejido fibroso. Construyen una masa ovalada de fibroblastos y colágeno que se identifica de color verde en la tinción de Tricrómico de Masson. Se trataría de estructuras avasculares, ya que no se identifican vasos sanguíneos en su interior. En los preparados, la mayoría se mostraron sueltas (Figura 33A, B y D) debido a que durante la preparación se desprenden fácilmente del saco vitelino al que están unidas (Figura 33 E). En *L. maximus* estas estructuras serían un parámetro útil para determinar la edad gestacional. Su presencia indica gestación mayor a 90 días. Si bien no se conoce la función de estas estructuras, su histología permitiría asociarlas con excrecencias mesodérmicas.

En la MEB las estructuras perladas se observaron redondeadas, de diversos tamaños (Figura 34A y B), sobre superficie con vellosidades a la que están unidas por 2 o 3 pedúnculos (Figura 34C-F) que pueden ser cortos o largos.

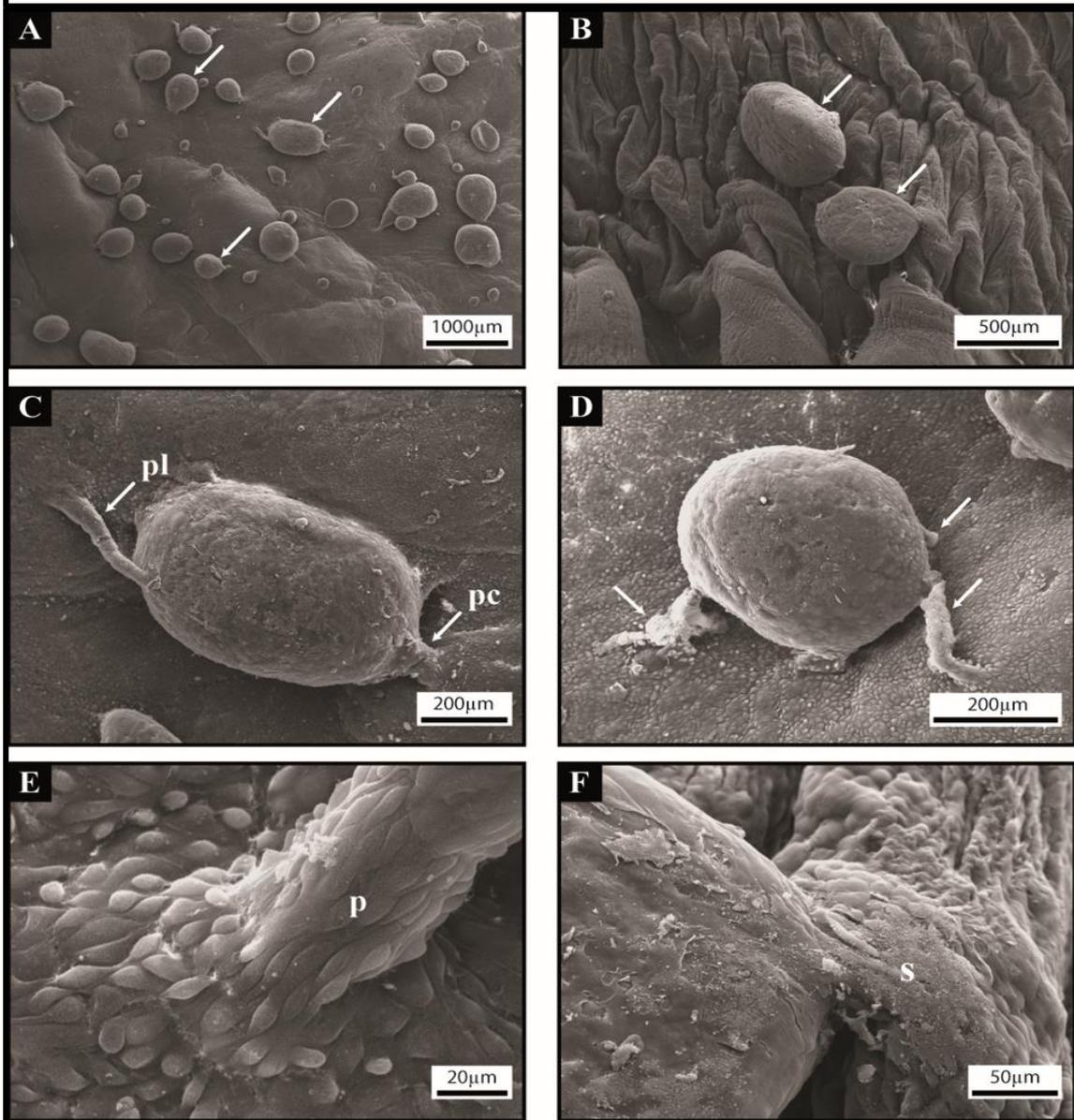
En la MET, el epitelio que rodea la estructura perlada mostró microvellosidades. Dentro de las estructuras se evidenciaron: fibroblastos (Figura 35 A-D), predominando los de aspecto fusiforme sobre los estrellados con núcleos alargados; retículo endoplasmático abundante; ribosomas en R.E.R, muy desarrollados y activos sintetizando fibras de colágeno en gran cantidad (Figura 35E y F). Las fibras, a mayor aumento, mostraron las fibrillas paralelas al eje longitudinal. Entre los fibroblastos y las fibras de colágeno quedaron zonas traslúcidas que podrían corresponder a sustancia fundamental compuesta por polisacáridos (Glucosaminoglucanos).

FIGURA 33. MICROSCOPIA ÓPTICA DE ESTRUCTURAS PERLADAS.



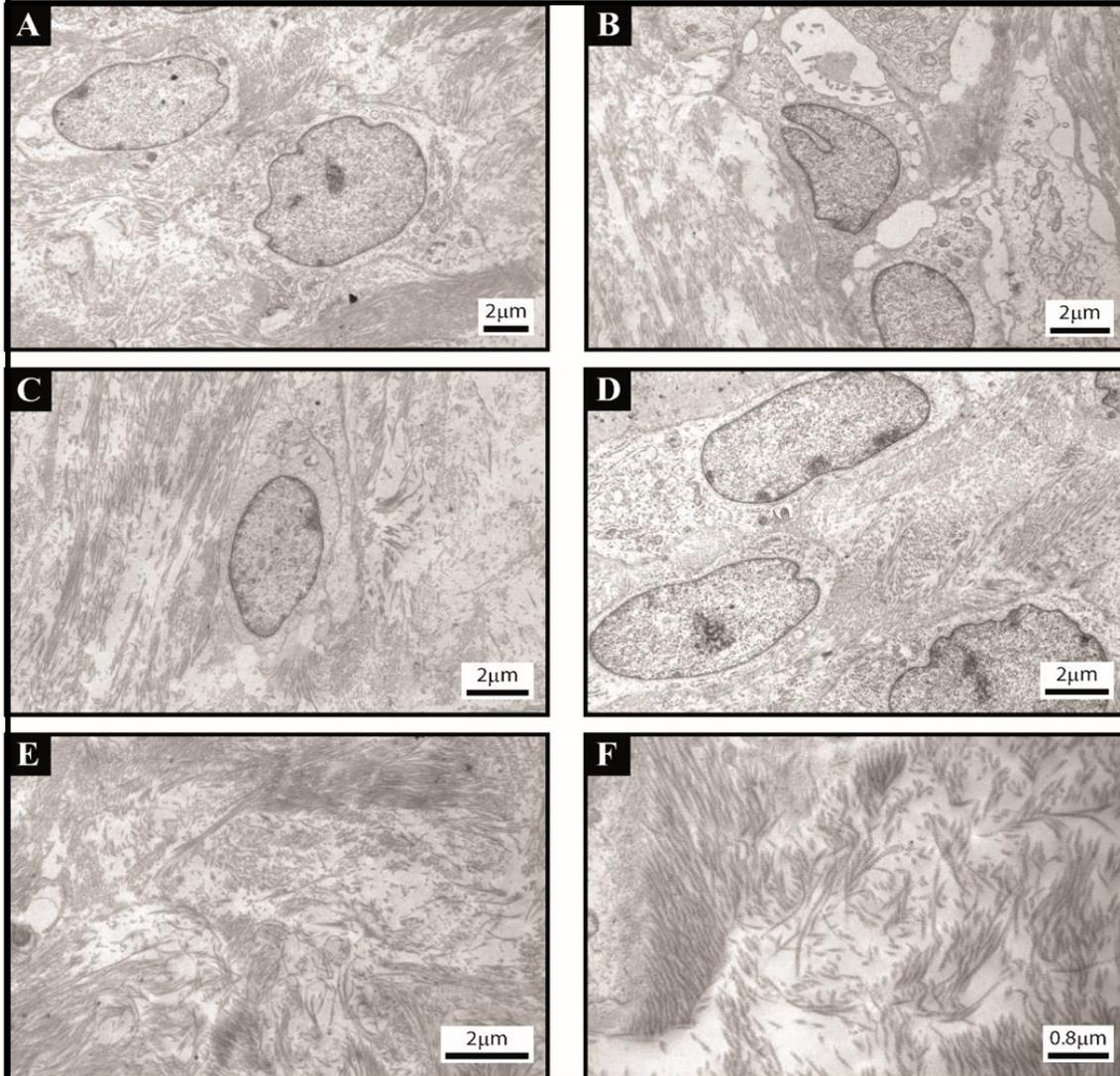
A y B) Estructura perlada, organizada en capas espiraladas de tejido fibroso, rodeada por epitelio simple cúbico. No se observan vasos sanguíneos en su interior (20x). C) Interior de la estructura perlada, se visualizan fibroblastos y fibras de colágeno. Se señalan núcleos (40x). D) Se visualiza a la izquierda estructura perlada desprendida, rodeada de epitelio (flecha). A la derecha se observa el saco vitelino invertido con vellosidades (flecha) que contactan con el tejido materno y el mesotelio con gran cantidad de vasos sanguíneos (flecha) (20x). E) Estructura anclada a la membrana extraembrionaria (10x). F) Se observa saco vitelino. Vellosidades que contactan con el tejido materno y del lado opuesto epitelio donde se anclan las estructuras perladas (40x). G) Detalle de las vellosidades del saco vitelino invertido (40x). A, C y F Tinción de Hematoxilina-Eosina. B, D, E, G Tinción Tricómico de Masson.

FIGURA 34. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LAS ESTRUCTURAS PERLADAS.



A) Imagen panorámica de múltiples estructuras ovales de varios tamaños. B) Observación de dos estructuras ovales ancladas en las vellosidades superficiales. C y D) Estructuras ancladas a la superficie vellosa por pedículos. Se observa en C 2 pedículos, uno largo (pl) y otro corto (pc). En D se visualizan 3 pedículos (flechas). E) Detalle del pedículo (p) de unión a la superficie vellosa. F) Visualización de la unión del pedículo (s) a la estructura oval.

FIGURA 35. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LAS ESTRUCTURAS PERLADAS.

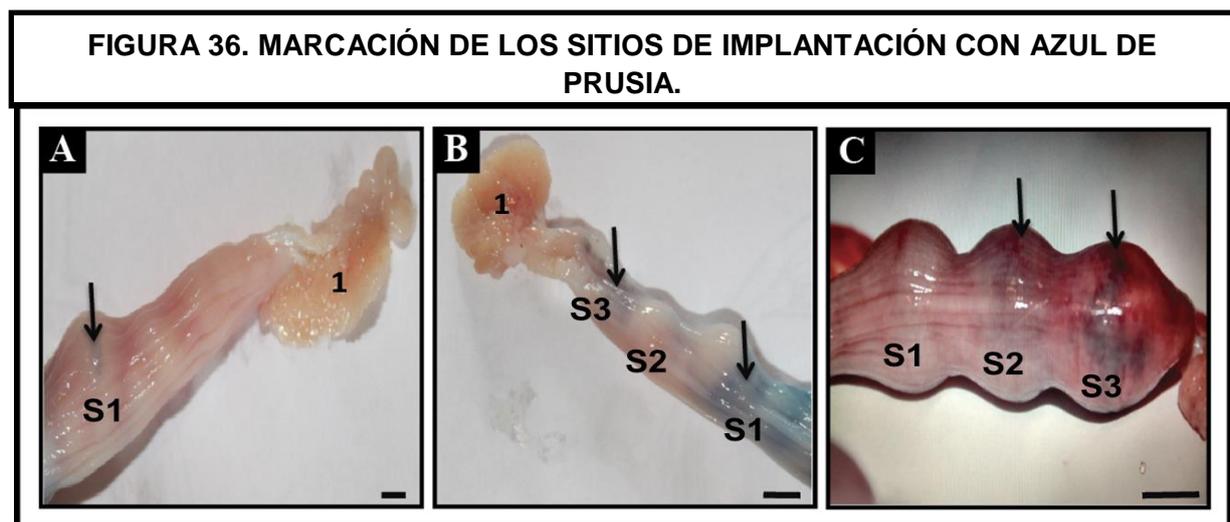


A) Se observan dos fibroblastos rodeados por gran cantidad de fibras de colágeno. B, C y D) Fibroblastos con organelas muy desarrolladas lo que indicaría que las células están sintetizando colágeno. E y F) Fibras de colágeno dispuestas al azar.

6.3 IMPLANTACIÓN DE *L. maximus*

6.3.1 Marcación de los sitios de implantación con Azul de Tripán

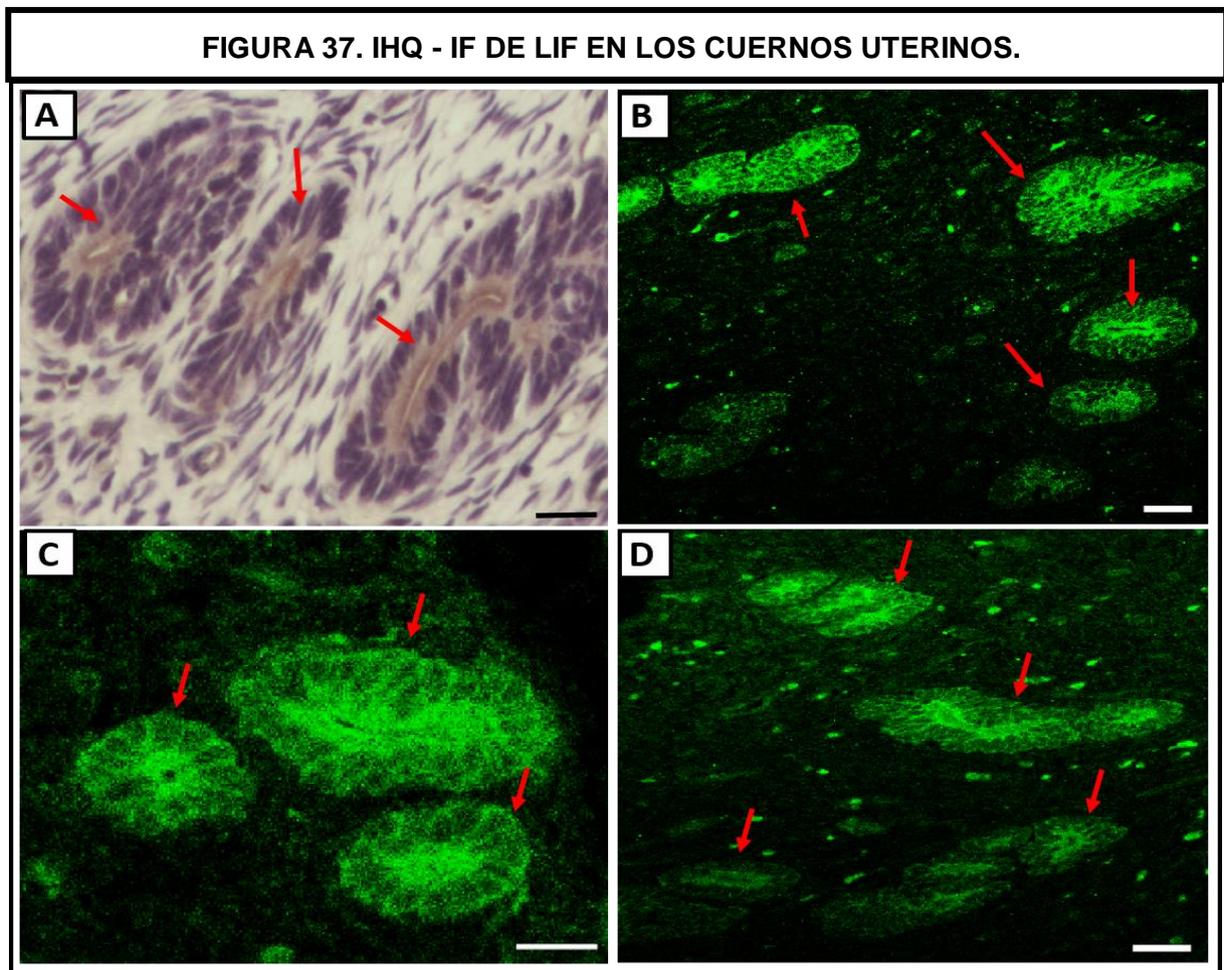
Los sitios de implantación se visualizaron como bandas azuladas del lado AMe (Figura 36), dado que el Azul de Tripán muestra la permeabilidad vascular, el primer signo macroscópico identificable en la implantación. Se evidenciaron cambios en la localización de las bandas a lo largo de los cuernos uterinos acordes al tiempo gestacional que cursaban las hembras preñadas. En etapas muy tempranas las bandas se presentaron en los sectores del cuerno uterino más próximos al cérvix (Figura 36 A y B). En etapas más avanzadas de la preñez temprana se visualizaron en los sectores más cercanos al ovario (Figura 36 C). Esto indica que la permeabilidad vascular a lo largo de los cuernos uterinos disminuye con el avance gestacional del cérvix al ovario.



A) Marcación leve del sitio de implantación en una gestación de aproximadamente 20 días en la región proximal del cuerno uterino (S1). B) Bandas de marcación del sitio de implantación en S1, S2 y leve en S3 de una gestación de 25-30 días. C) Marcación en gestación temprana avanzada presenta banda azulada antimesometrial en S3, muy leve en S2 y ausencia de banda en S1. (1) Ovario. Barra de 0,5 cm.

6.3.2 Factores angiogénicos que participan en la implantación

La IHQ e IF de LIF en las distintas secciones (S1, S2 y S3) de los cuernos uterinos con preñez temprana, mostró marca con localización citoplasmática (Figura 37). La inmunomarcación para LIF se observó a nivel del epitelio glandular de manera transitoria durante la implantación; siendo negativa en cuernos uterinos de hembras no preñadas y estadios gestacionales avanzados. La IHQ de LIF realizada en cuernos uterinos de animales tratados previamente con P4 mostró marca en epitelio glandular, mientras que los tratados con E2 fueron negativos, con lo cual no sería dependiente de la presencia de embriones viables, pero sí dependiente de un cambio hormonal.



A) IHQ de LIF. Se muestran marcas en el epitelio glandular (flechas) (40x). B y C) IF de LIF en hembras con preñez temprana. Muestran marca positiva en las glándulas endometriales (40x). D) IF de LIF en animal no preñado tratado con progesterona, muestra marca en las glándulas del endometrio (40x). IHQ: Inmunohistoquímica. IF: Inmunofluorescencia. LIF: Factor inhibidor de leucemia. Barra A: 20 µm. Barra B-D: 10 µm.

En el ELISA, las diferentes secciones del cuerno uterino (S1, S2 y S3) no mostraron diferencias significativas entre los valores de LIF ($p > 0,1$, en todos los casos). En la Tabla 6A se muestran las mediciones obtenidas de LIF en las distintas secciones uterinas.

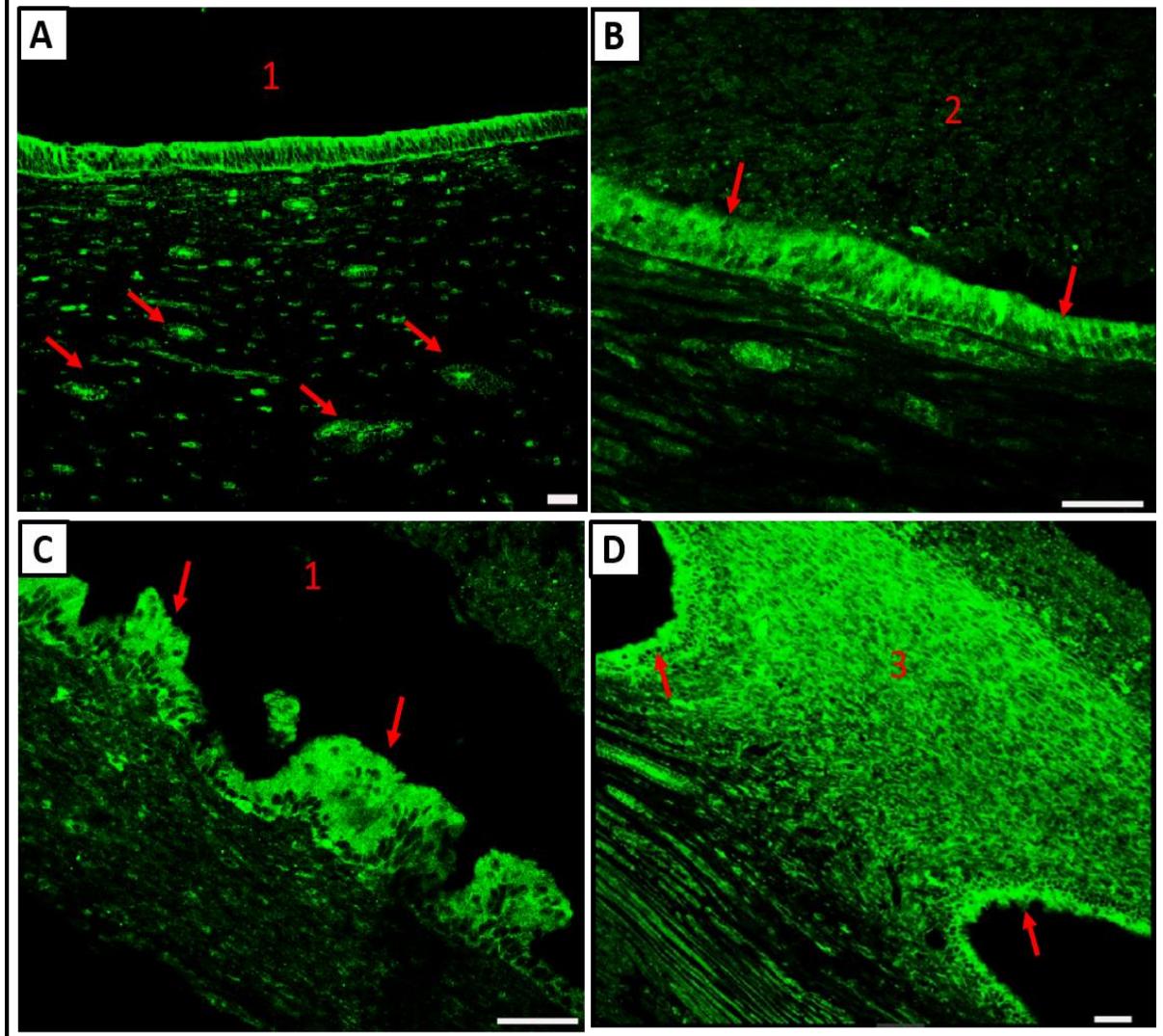
Con el objeto de detectar posibles diferencias entre el lado Me y el AMe de las distintas secciones del cuerno uterino se los evaluó separadamente. Tampoco hubo en este caso diferencias significativas entre los lados de las mismas secciones ($p > 0,1$ en todos los casos). En la Tabla 6B se muestra las mediciones obtenidas de LIF del lado AMe y Me de una misma sección.

TABLA 6. ELISA DE LIF EN CUERNOS UTERINOS DE HEMBRAS PREÑADAS.					
A			B		
SECCIÓN	MEDIA (pg/ml)	DS	SECCIÓN	MEDIA (pg/ml)	DS
S1	1588.62	317.91	S1 Me	1457.64	135.82
S2	2160.75	509.5	S1 AM	1860.23	623.41
S3	1651.16	316.47	S2 Me	2531.28	764.55
			S2 AM	1807.91	502.30
			S3 Me	1644.21	276.81
			S3 AM	1835.26	309.63

A) Valores obtenidos de las mediciones de LIF en la sección más cercana al cérvix (S1), en la región media (S2) y en el sector más cercano al ovario (S3). B) Valores de las mediciones de LIF diferenciado en cada una de las secciones la parte mesometrial (Me) y la antimesometrial (AMe). DS: Desvío estándar. LIF: Factor inhibidor de leucemia.

VEGF mostró inmunomarcación citoplasmática (Figura 38) en células epiteliales uterinas, en epitelio glandular, en estroma endometrial, endotelios, células del miometrio y en el sitio de implantación (Figura 38D). Se expresa en células que rodean la vasculatura en expansión del endometrio.

FIGURA 38. IF DE VEGF EN LOS CUERNOS UTERINOS CON PREÑEZ TEMPRANA.

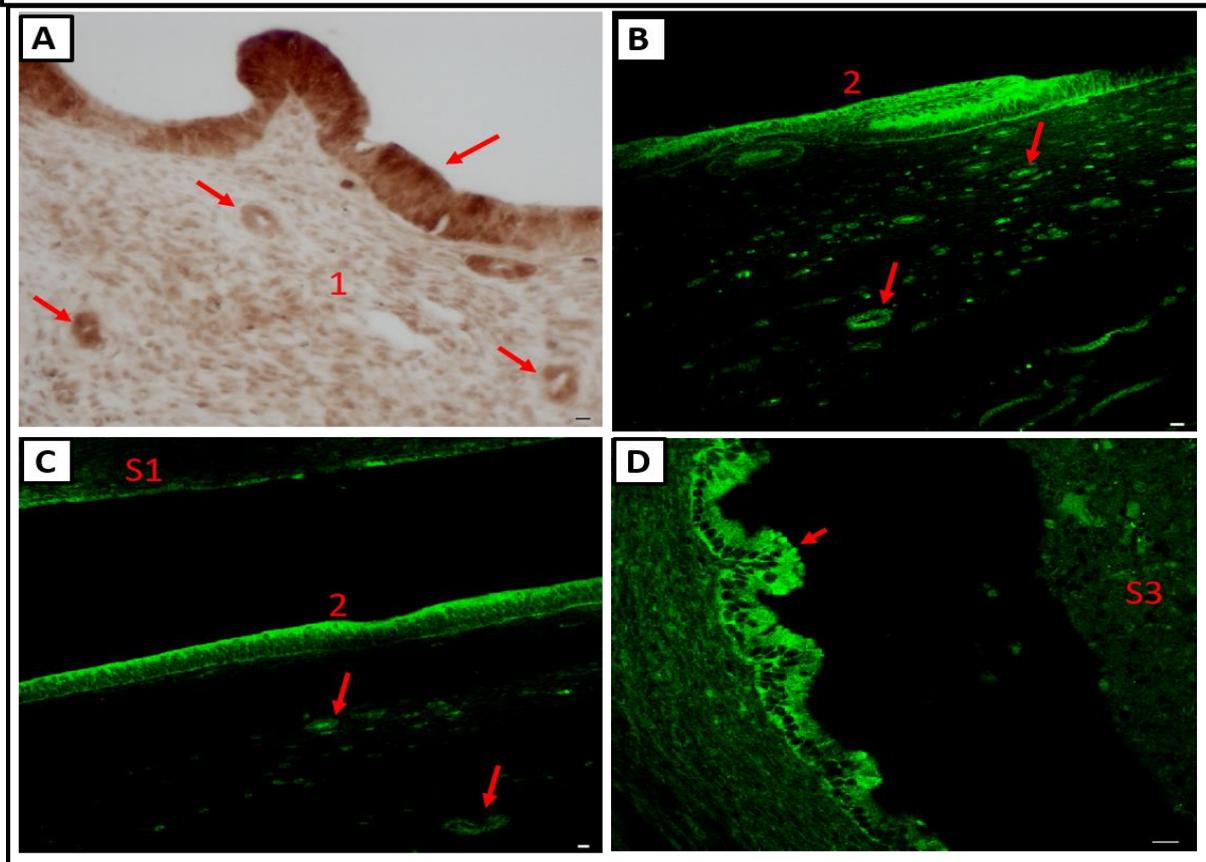


A) Se visualiza marca citoplasmática en epitelio uterino, epitelio glandular (flechas) y endotelios pertenecientes a la sección S1. 1- luz uterina (20x). B) Marca en el epitelio uterino (flechas). 2- vesícula embrionaria del sector S2 (40x) C) Se señala el epitelio uterino perteneciente a S3, en la luz uterina (1) se evidencio una vesícula embrionaria en proceso de reabsorción. El epitelio uterino emite prolongaciones hacia la luz (40x). D) Sitio de implantación (3) del embrión localizado en S1, rodeado por epitelio uterino el cual mostró también marca (flechas) (20x). Barra de 20 μ m.

La IHQ de eNos mostró las mismas marcas que para VEGF. Se expresó en epitelio glandular, epitelio uterino y endotelios de los cuernos uterinos con gestación temprana.

La IHQ y la IF de COX2 mostró marca citoplasmática. Se expresó en cuernos uterinos con preñez temprana en tejido epitelial luminal más notoria en la parte apical (Figura 39), epitelio glandular y células del estroma subepitelial.

FIGURA 39. IHQ - IF DE COX₂ EN LOS CUERNOS UTERINOS CON PREÑEZ TEMPRANA.

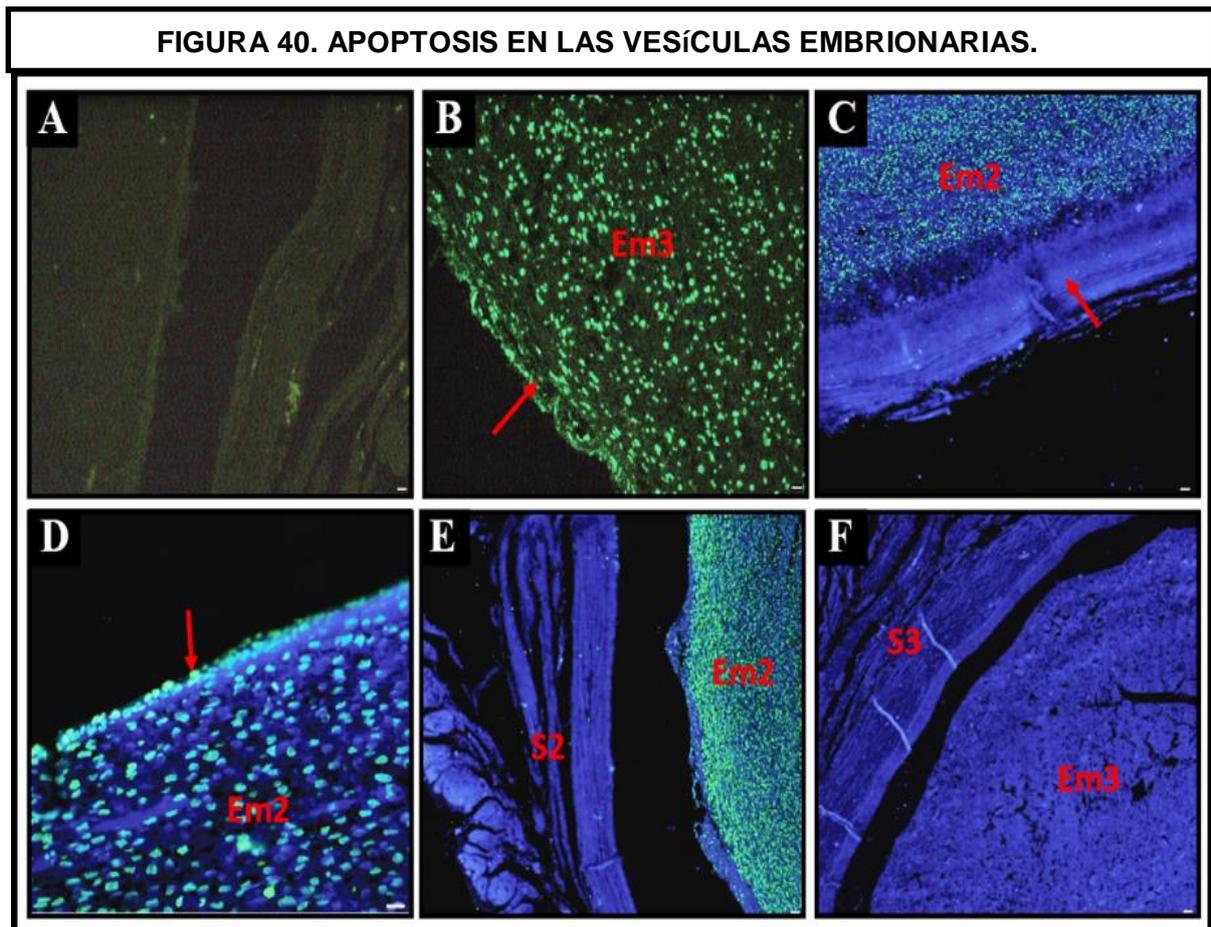


A) IHQ de COX₂. Se muestran marcas en el epitelio luminal y glandular (flechas) y en estroma subepitelial (1) (10x). B y C) IF de COX₂ en hembras con preñez temprana. Muestran marca positiva en el epitelio luminal (2) y en las glándulas endometriales (flechas). Ambos cortes pertenecen a sectores S1 (20x). D) IF de LIF en animal preñado en sector S3. Muestra marca en el epitelio luminal replegado (40x). IHQ: Inmunohistoquímica. IF: Inmunofluorescencia. COX: Ciclooxygenasa. Barra A: 20 μ m. Barra B-D: 10 μ m.

6.3.3 Rol de la apoptosis en la reabsorción embrionaria selectiva de *L. maximus*

Al analizar los resultados de tunel en las diferentes secciones de los cuernos uterinos con sus respectivas vesículas embrionarias se observó que existía un proceso de apoptosis en las vesículas embrionarias que posteriormente se reabsorben (Figura 40). En las vesículas Em1 (Figura 40A) si bien se encontraron algunas marcas en la decidua, no tuvo significancia al comparar la respuesta que se generó en Em2 y Em3. En etapas muy tempranas, estas tuvieron marca en el interior de la vesícula embrionaria y en el epitelio uterino que la rodea mostrando un proceso de apoptosis activo (Figura 40B - E), sin embargo la respuesta del

sector uterino (S2 y S3) fue negativo (Figura 40C y E). Esto demostraría que el suceso está localizado en el interior de las vesículas embrionarias en una etapa temprana y que el cuerno uterino no sufriría apoptosis en ningún sector del mismo. Posteriormente, una vez que la vesícula inicia el proceso de necrosis evidenciado en el análisis histológico, la técnica de tunel dio negativa para las vesículas que ya están en proceso de reabsorción (Figura 40F). Lo que indicaría que existiría una combinación de dos procesos: en una primera etapa la apoptosis seguida por un proceso de necrosis.



A-F. CUERNOS UTERINOS CON SUS RESPECTIVAS VESÍCULAS EMBRIONARIAS. A) Tunel negativo en S1 con Em1. B) Vesícula Em3 con su epitelio uterino rodeándola (flecha) con apoptosis. C) Apoptosis en el interior de Em2 y el sector del útero negativo (flecha). D) Em2 con apoptosis. E) Vesícula Em2 con apoptosis mientras que el sector uterino correspondiente al mismo no muestra marca (S2). F) Vesícula con reabsorción embrionaria, de una gestación más avanzada, que a la histología presentó zonas necróticas. No se observan marcas ni en Em3 ni S3.

6.4. ESTUDIO DE LA IRRIGACIÓN DEL TRACTO REPRODUCTIVO DE LA HEMBRA DE *L. maximus*

L. maximus implanta en su útero bicorne 10-12 blastocistos y entre los días 26-70 de gestación ocurre la reabsorción embrionaria selectiva de todos los embriones, exceptuando los dos más cercanos al cérvix, que se desarrollan a término. Se exploró la vascularización del aparato reproductivo de vizcachas hembras adultas para comprender como es la irrigación del cuerno uterino y su relación, de existir, con el proceso de pérdidas embrionarias.

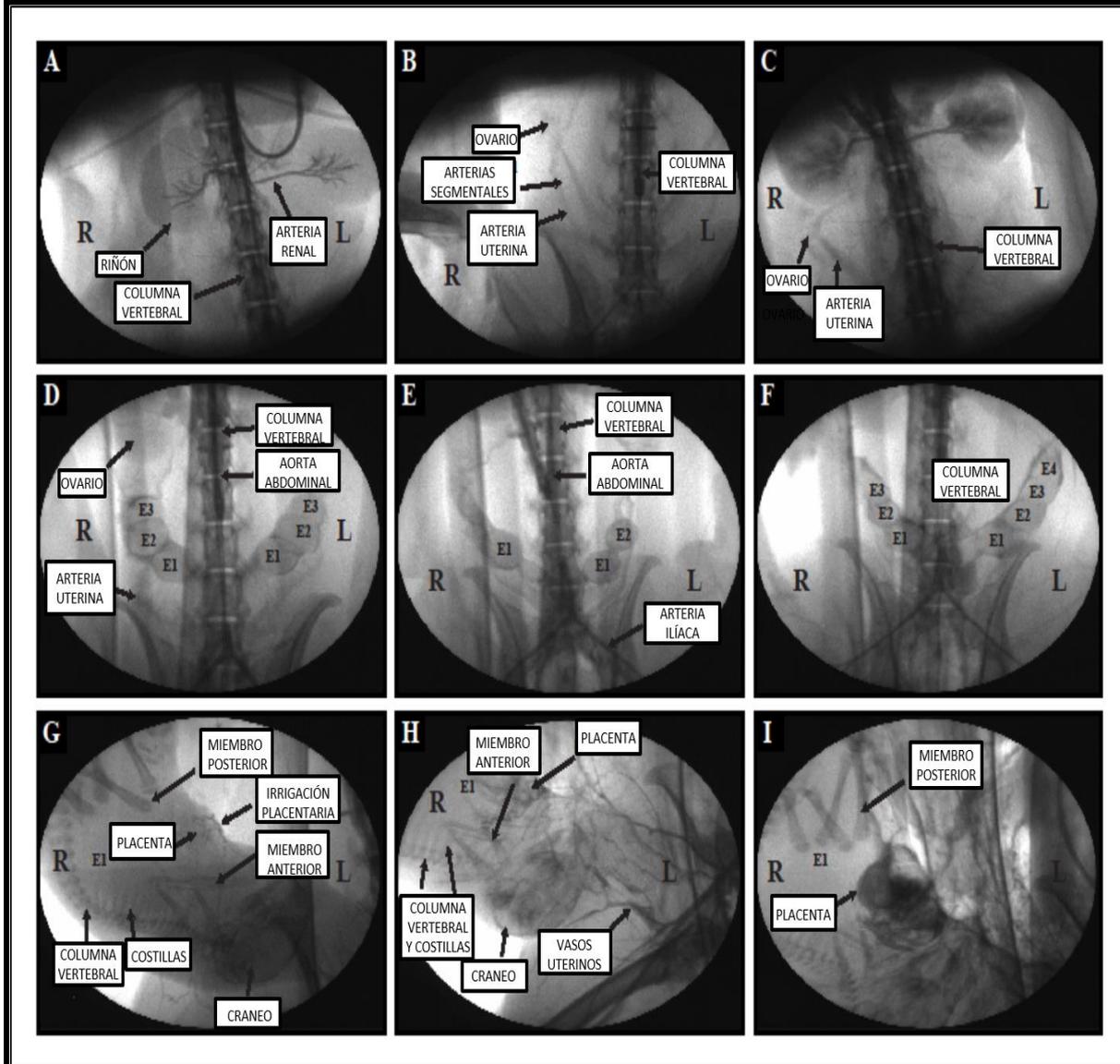
6.4.1 Angiografías del tracto reproductivo de las hembras en diferentes estadios reproductivos

Los resultados de las angiografías en hembras adultas no preñadas (Figura 41A–C) muestran que, ante la inyección del contraste en arteria aorta abdominal o en las arterias renales, no se observa marcación de los vasos uterinos ni ováricos. Sin embargo, ante la inyección del contraste por encima de la bifurcación de las arterias ilíacas, se visualiza la arteria uterina que realiza un trayecto ascendente emitiendo ramas arteriales hacia el cuerno uterino. Al alcanzar el ovario, emite ramas ováricas. Las venas uterinas y ováricas desembocan directamente en la vena cava.

El aumento del calibre de los vasos sanguíneos también se evidenció en las angiografías realizadas a estos animales con preñez temprana, mostrando una remodelación vascular en los estadios de gestación (Figura 41D-F).

Al realizar las angiografías en animales con preñez intermedia, no fue posible estudiar la perfusión a lo largo de todo el cuerno gestante y del ovario. Al inyectar el contraste en aorta abdominal, se visualizó el recorrido a través de las arterias ilíacas y luego por la arteria uterina donde al ingresar al cuerno uterino todo el contraste se depositaba marcando la irrigación placentaria (Figura 41G-I) no visualizándose la irrigación proximal hacia el ovario. Dado que en este estadio se inyectó 150 ml de contraste y sólo se visualizó la placenta no se repitió en animales con gestaciones más avanzadas.

FIGURA 41. ANGIOGRAFÍAS EN *L. maximus* EN DIFERENTES ESTADIOS REPRODUCTIVOS.

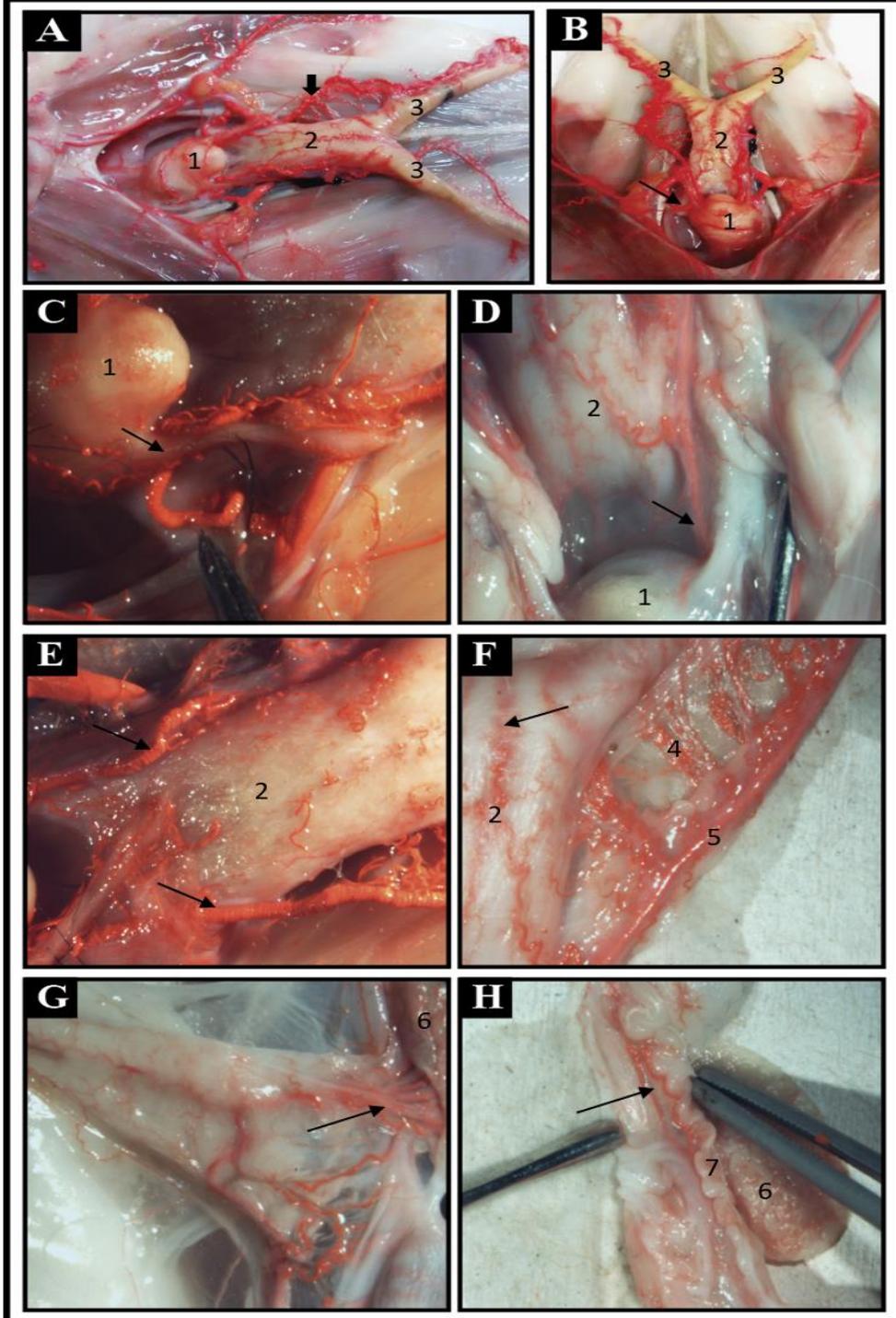


A, B y C. Angiografías de las hembras no preñadas. A) Marcación de las arterias renales por inyección del contraste por la arteria aorta abdominal a dicha altura. B y C) Marcación de la arteria uterina y las arterias segmentales del cuerno uterino. D, E y F. Angiografías de las hembras con preñez temprana. D) Hembra con 3 embriones en cada cuerno uterino. Se visualiza bifurcación de la arteria aorta abdominal en arterias ilíacas que emite la rama, arteria uterina. E) Hembra con 1 embrión en el cuerno uterino derecho y 2 embriones en el cuerno uterino izquierdo. Se marca la arteria ilíaca y la arteria uterina. F) Hembra con 3 embriones en el cuerno uterino derecho y 4 en cuerno uterino izquierdo. G, H e I. Angiografías de hembras con preñez intermedia. G) Comienza a marcarse la irrigación placentaria. H) Marcación de los vasos uterinos. I) Placenta con gran contenido de contraste.

6.4.2 Moldeado de la vasculatura del tracto reproductivo de la hembra adulta con látex

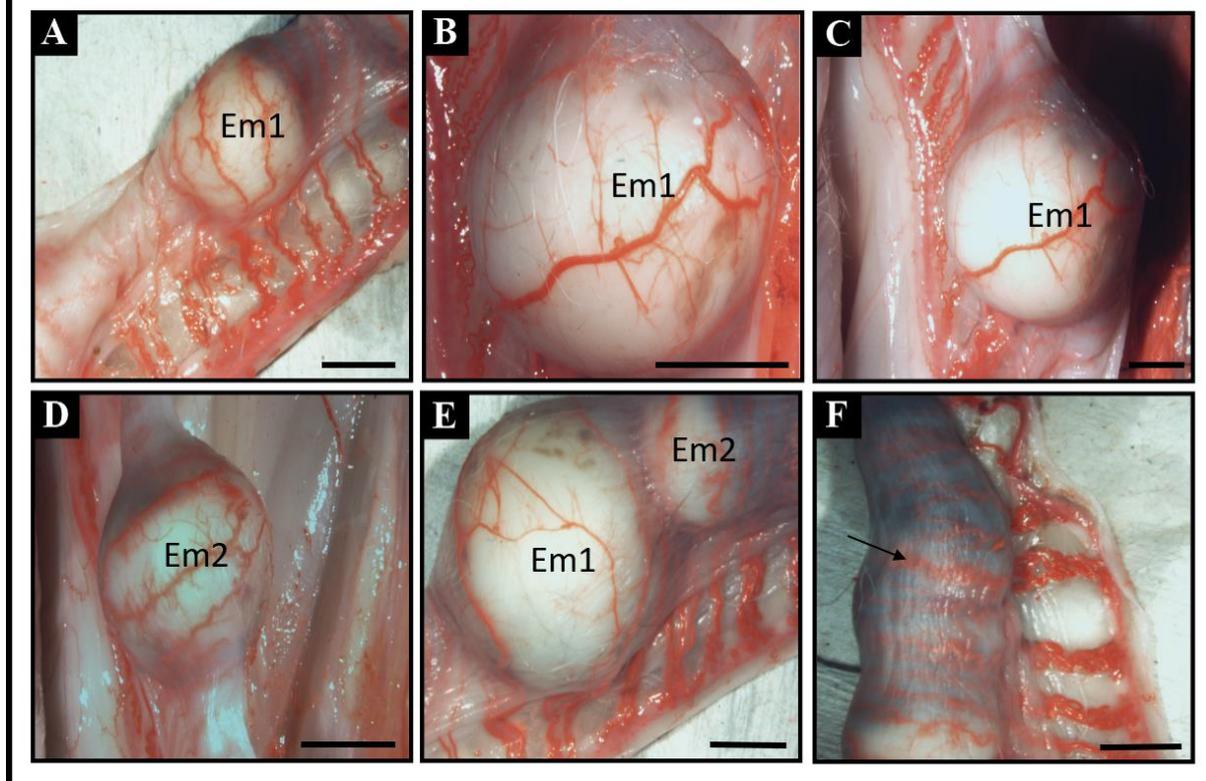
Los moldes vasculares con látex (Figura 42-44) permitieron conocer la irrigación útero-ovárica con mayor detalle. La arteria que irriga al útero es rama de la ilíaca y se origina a 1,5 cm por caudal de la bifurcación de la arteria aorta abdominal en las arterias ilíacas. Se ubica por medial de la cresta ilíaca (Figura 42A - D), dorsal a la vejiga y sigue un recorrido ascendente por el ligamento ancho del útero (Figura 42E y F). Esta arteria emite las ramas para irrigar la vagina, el cuello uterino, el pseudo-tabique (Figura 42F) y el cuerno uterino. Ambas técnicas permitieron conocer que la irrigación del cuerno uterino de *L. maximus* está dada por rama de la arteria ilíaca, que hace un recorrido ascendente por todo el ligamento ancho del útero, siendo la arteria uterina el mayor aporte sanguíneo al tracto reproductivo. En los estudios realizados en las hembras con preñez temprana (Figura 43) se observa un mayor tamaño vascular, grandes vasos que están en las vesículas embrionarias (Figura 43A - E) y las arterias segmentarias en los restos de reabsorción embrionaria (Figura 43 F). En el moldeado con látex de los cuernos uterinos con preñez intermedia y a término, se ha visualizado una remodelación de los vasos sanguíneos, comparándolo con las hembras no preñadas (Figura 44). Los cuernos preñados se encontraban con una mayor irrigación para asegurar el suministro sanguíneo a la placenta y al feto. En la mayoría de los cuernos pertenecientes a preñez intermedia se encontraron restos de las reabsorciones embrionarias (Figura 44B y C), separados por un tabique del feto que llega a término. En ambos estadios gestacionales se observó la membrana vitelina irrigada sin marcación con látex, el amnios avascular y la pared del cuerno uterino con vasos sanguíneos maternos moldeados con látex. La arteria uterina, rama de la ilíaca emite ramas segmentadas que recorren el cuerno uterino por ventral y dorsal.

FIGURA 42. IRRIGACIÓN DEL TRACTO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA NO PREÑADA.



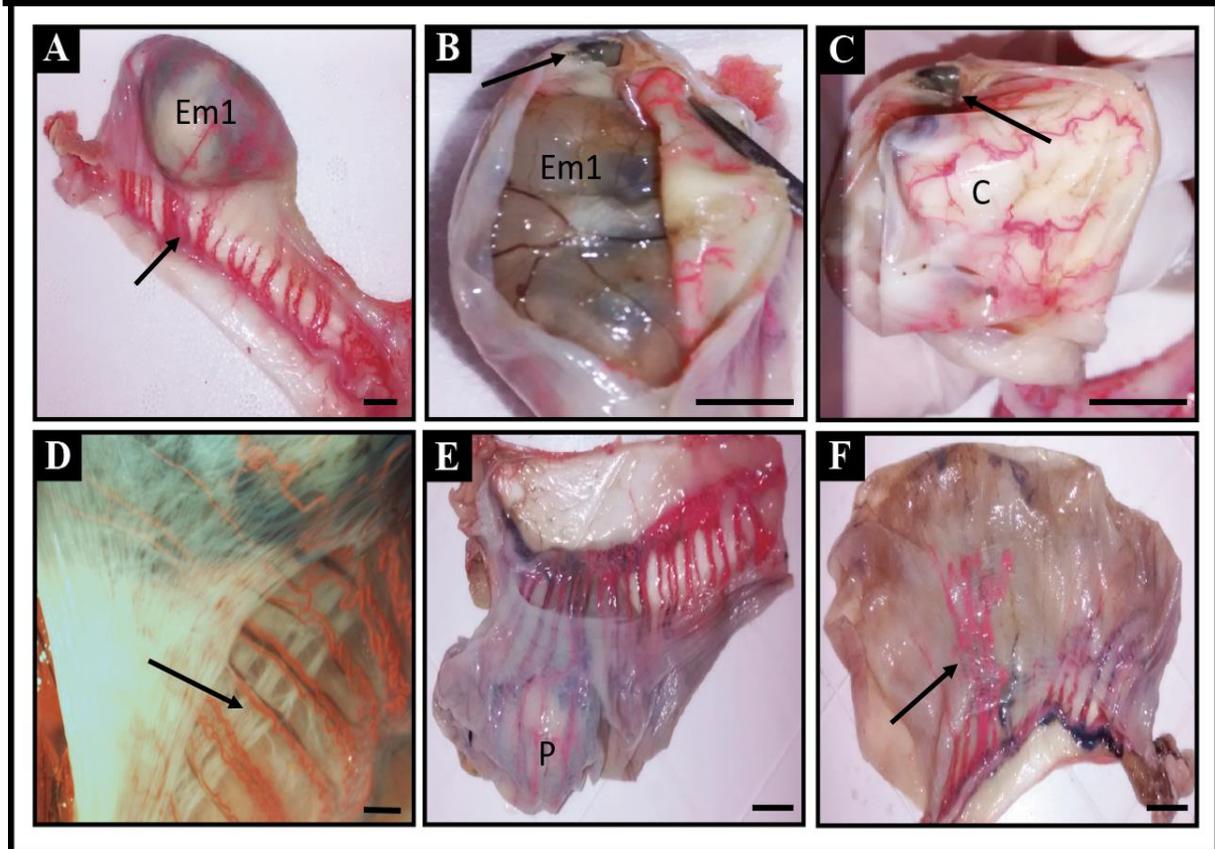
A y B) Irrigación del tracto reproductor de la hembra no preñada de *L. maximus*. La arteria uterina tiene su origen en la arteria ilíaca (flecha). C) La arteria uterina emite un giro por debajo del uréter para seguir el trayecto del cuerno uterino (flecha), D) Arteria uterina se sitúa dorsal del uréter y continúa su recorrido ascendente. E) Las arterias uterinas corren por lateral de la vagina hasta llegar a los cuernos uterinos (flechas). F) Se detecta arteria del pseudotabique (flecha). La arteria uterina emite ramas segmentales localizadas en el ligamento ancho. G) Irrigación del ovario por un ramillete (flecha). H) Se visualiza el recorrido de la arteria oviductual (flecha). 1: vejiga. 2: vagina. 3: cuerno uterino. 4: arterias segmentales. 5: arteria uterina. 6: ovario. 7: oviducto.

FIGURA 43. IRRIGACIÓN DEL CUERNO UTERINO CON PREÑEZ TEMPRANA.



A, B y C) Vesículas embrionarias pertenecientes a Em1, embrión más cercano al cérvix. Se observan las arterias segmentarias que emite la arteria uterina. D) Em2 con su respectiva irrigación sanguínea. E) Em1 junto a Em2, ya se evidencia el mayor tamaño que presenta Em1. F) Cuerno uterino con restos de vesículas embrionarias reabsorbidas. Se evidencia remodelación de los vasos sanguíneos. Barra de 0,5 cm.

FIGURA 44. IRRIGACIÓN DEL CUERNO UTERINO PREÑADO.



A, B y C. Cuerno uterino con preñez intermedia. A) Cuerno uterino donde se visualiza Em1 con su irrigación sanguínea. B) Se observa Em1 envuelto por membranas extraembrionarias. Por delante se visualiza resto de reabsorción embrionaria (flecha) separada de Em1 por un tabique. C) Irrigación del cuerno uterino. Se removió el feto de preñez intermedia. D, E y F. Cuerno uterino con preñez a término. D) Arterias segmentales del cuerno uterino (flecha). E) Cuerno uterino donde se ha removido el feto y quedó *en situ* la placenta (P). F) Irrigación donde se ubica la placenta que fue removida (flecha). Barra de A – C: 1,5 cm. Barra de D – F: 1cm.

6.4.3 Medición de las hormonas esteroideas (E2 y P4) en las diferentes secciones uterinas y vesículas embrionarias.

La irrigación del cuerno uterino ascendente establece que la primera sección a la que se le suministra nutrientes, hormonas, etc. sea la región donde está Em1 que llega a término, continuando con dirección hacia el ovario. Por este motivo, se planteó estudiar el E2 y la P4 en las distintas secciones uterinas para identificar si existen diferencias en las concentraciones de estas hormonas esteroideas como consecuencia de la anatomía del sistema vascular.

Al estudiar los valores de E2 en el ovario (Tabla 7) se hallaron diferencias significativas ($p=2.1 \times 10^{-3}$) en los animales con preñez intermedia ovulando, los cuales presentaron el mayor nivel de E2, en relación al resto de los grupos estudiados.

Los resultados de P4 ovárica (Tabla 7) se compararon entre los diferentes estadios reproductivos y se observaron diferencias significativas ($p=7 \times 10^{-4}$) entre las hembras no preñadas no ovulando y las de preñez a término, las mismas presentaron niveles menores de P4 comparándolas con el resto de los grupos.

Tabla 7. Concentración de hormonas esteroideas (E2 y P4) en los ovarios de los distintos estadios reproductivos de <i>L. maximus</i>			
		Hormona	
		E2	P4
Estadio	No Preñada No Ovulando	167,2±37,1	4494,5±2220,3
	No Preñada Ovulando	141,3±97,7	62047,3±43442,6
	Preñez Temprana	480,6±312,1	87588,1±59780,1
	Preñada Intermedia No Ovulando	4633,0±6000,7	466803,3±24967,1
	Preñada Intermedia Ovulando	28411,0±26761,0	84133,4±59900,7
	Preñez a Término	2867,3±2559,5	5805,4±4919,7

Se midieron las hormonas esteroideas en las diferentes secciones uterinas (Tabla 8) y ningún grupo presentó diferencias significativas ($p > 0,07$) de los niveles de E2 entre S1-S2. Tampoco se observaron diferencias significativas entre S2-S3 ($p > 0,07$).

Al comparar la sección S1 con la S2, se presentaron diferencias significativas del nivel de P4 en las hembras no preñadas no ovulando ($p=0,02$) y en la preñez temprana ($p=0,01$), en estos dos estadios reproductivos la S1 presentan mayor nivel de P4. Al comparar los niveles de esta hormona entre las secciones uterinas S2-S3 se ha encontrado diferencias significativas ($p=1.06 \times 10^{-2}$) en las hembras no preñadas no ovulando.

Al comparar las mismas secciones del cuerno uterino entre los diferentes estadios reproductivos, no hubo diferencias significativas entre grupos ($p > 0,096$).

Se midió la concentración de E2 y P4 en las vesículas embrionarias de la preñez temprana (Tabla 9) y se encontraron diferencias significativas de E2 ($p=0,04$) y P4 ($p=0,02$) entre E1 y E2, siendo mayor el nivel de ambas hormonas en E1. Mientras que entre E2 y E3 no hubo diferencias significativas en ninguna de las hormonas medidas.

Tabla 8. Concentración de hormonas esteroideas (E₂ y P₄) en las secciones uterinas de los diferentes estadios reproductivos

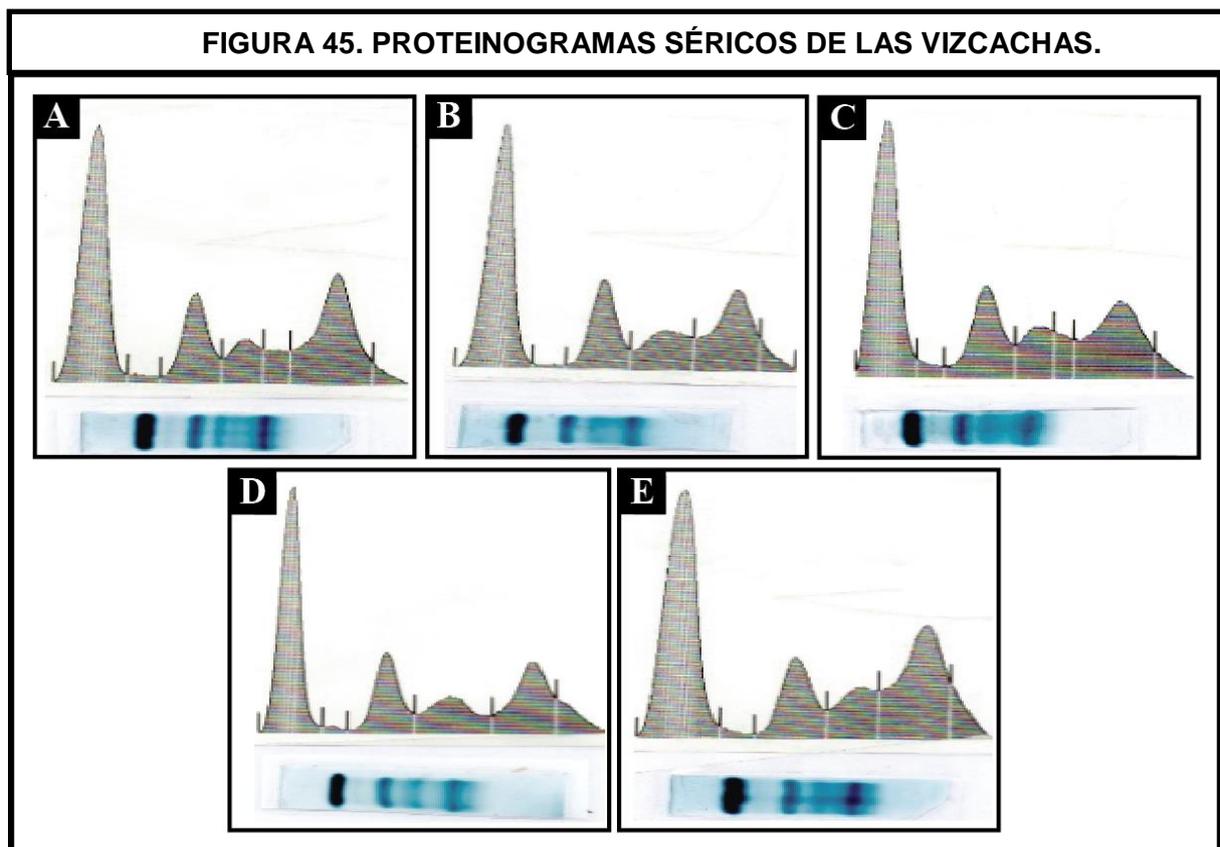
		Localización					
		S1		S2		S3	
Estadio	Hormona	E2	P4	E2	P4	E2	P4
	Estadio	No Preñada No Ovulando	944,3±1606,3	2499,5±1094,7	142,4±41,5	1733,5±716,6	148,1±108,8
No Preñada Oculando		90,8±35,2	3334,7±3187,0	43,3±24,2	637,3±154,7	23,8±36,5	299,7±24,5
Preñez Temprana		189,7±71,2	6216,7±4155,1	140,3±40,7	3420,6±2991,0	129,7±38,1	1937,4±1927,1

Tabla 9. Concentración de hormonas esteroideas (E₂ y P₄) en vesículas embrionarias de preñez temprana

		Hormona	
		E2	P4
Vesícula Embrionaria	Em1	154,7±61,5	4705,2±2479,4
	Em2	88,0±71,8	4020,6±1254,7
	Em3	78,9±53,2	2030,6±2157,9

6.5 INMUNOLOGÍA DE LA GESTACIÓN DE *L. maximus*

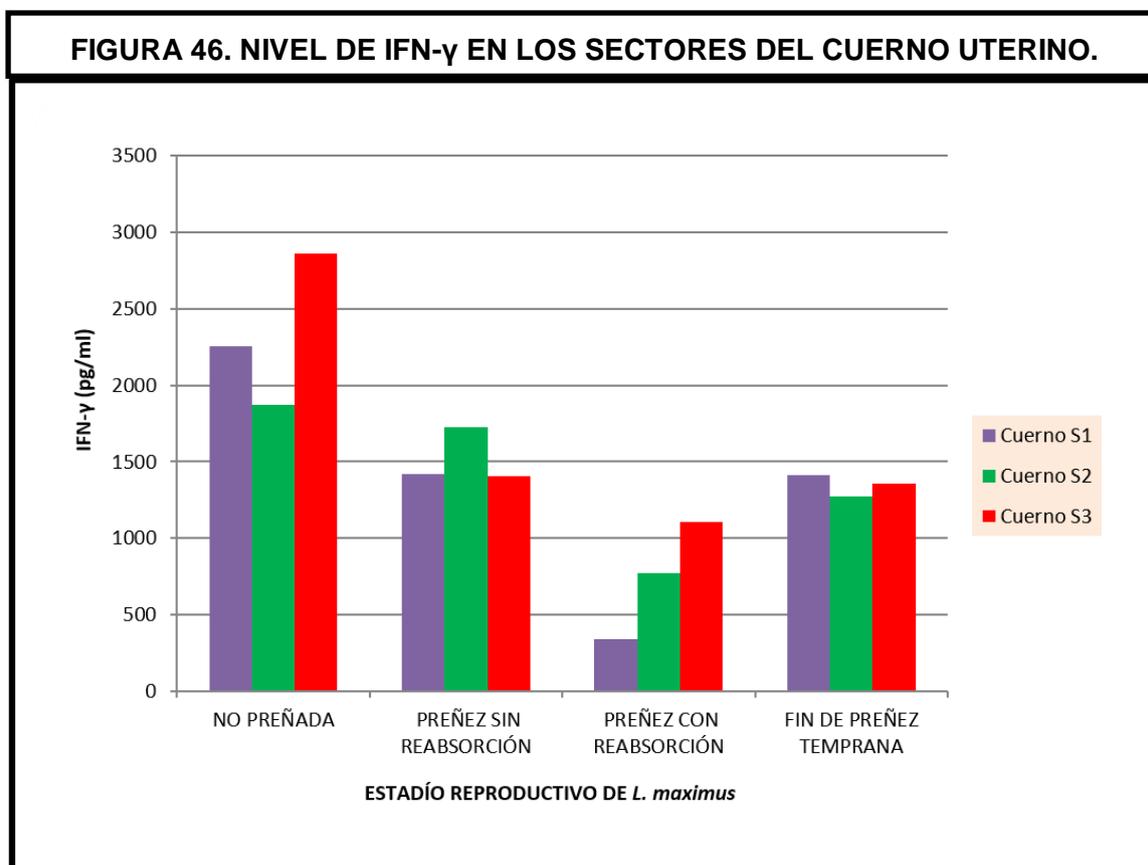
La proteinemia de *L. maximus* en los diferentes estadios reproductivos no presentó diferencias significativas. El valor fue similar al resto de los mamíferos teniendo un promedio de 7g/dl. El cociente proteico fue menor a 1 en todas las muestras estudiadas, por lo que el contenido de globulinas fue superior al de albúminas en la especie estudiada. En el densitograma se pudo observar cuatro fracciones (albúmina, α , β y γ) en las que siempre se desdobló la α en 1 y 2 y en algunos casos se presentó desdoblamiento para β_1 y β_2 y/o γ_1 y γ_2 (Figura 45). Las fracciones proteicas desdobladas no se relacionaron con un grupo particular, ni con el estado reproductivo ya que se presentaron en algunos individuos y de diferentes estadios. Cada una de las fracciones proteicas no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. La albúmina y α_1 no varió mucho entre las muestras, mientras que α_2 y β presentaron pequeños cambios que no fueron significativos entre los grupos.

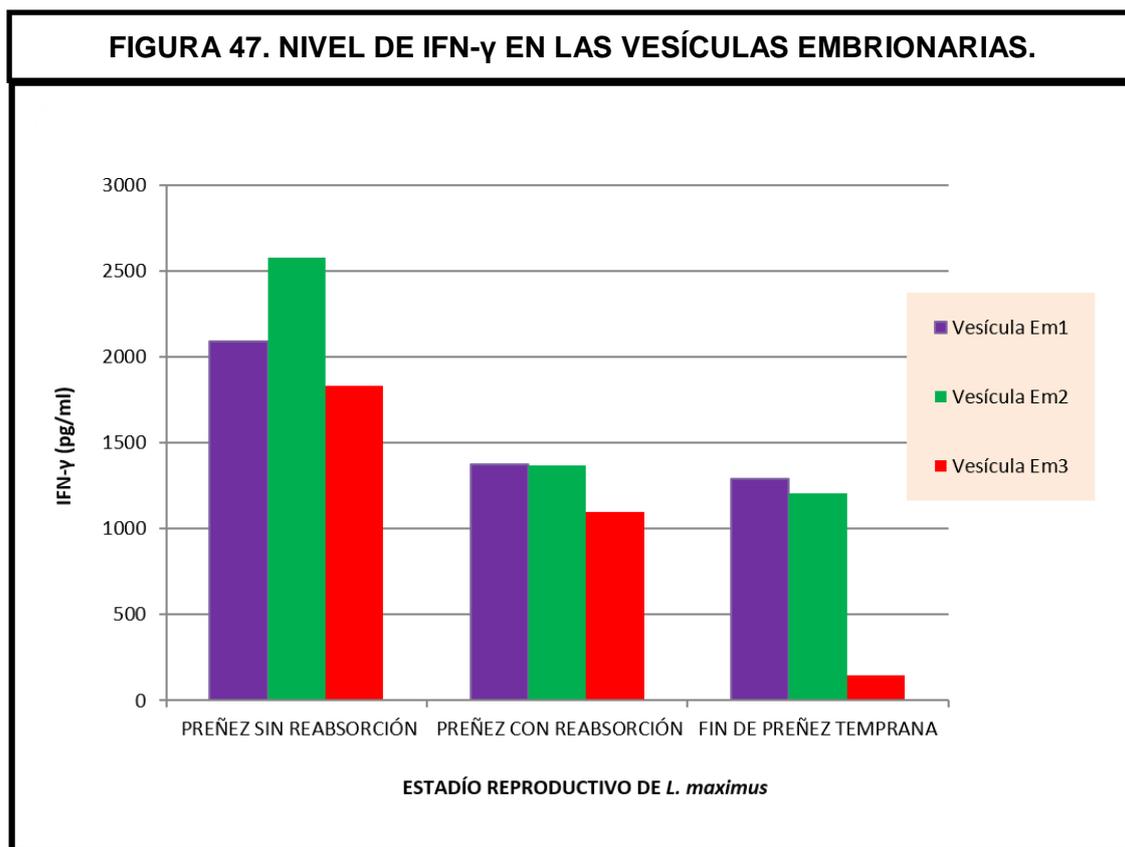


A) Proteinograma de la vizcacha no preñada. B y C) Proteinogramas de las vizcachas con preñez temprana. D) Proteinograma de la vizcacha con preñez intermedia. E) Proteinograma de la vizcacha con preñez a término.

En la medición de la citocina IFN- γ , en el cuerno uterino con reabsorción embrionaria en desarrollo, el S1 se diferenció de manera significativa del S3, siendo S3 el que presentó mayor nivel de IFN- γ ($p=0,05$). En el resto de los estadios no se encontraron diferencias significativas de los niveles de esta citocina entre los distintos sectores del cuerno uterino. Al comparar los niveles de un mismo sector uterino en los diferentes estadios reproductivos se encontró que S1 con reabsorción embrionaria en desarrollo se diferencia de manera significativa con el S1 de la no preñada, siendo el nivel de IFN- γ menor durante la reabsorción ($p < 0,05$). Si bien no se han encontrado diferencias significativas en otros estadios reproductivos se observa una tendencia de disminución de esta citocina a medida que transcurre la preñez temprana y al final de la misma, el nivel de IFN- γ en S1 aumenta (Figura 46).

En el estadio final de la preñez temprana la Em1 se diferenció de manera significativa con respecto a los niveles de IFN- γ de la Em3, siendo la Em1 la que presentó mayor nivel ($p=0,02$). Si bien no se encontraron otras diferencias en el análisis estadístico, la tendencia mostraría que los niveles en las vesículas embrionarias tienden a disminuir a medida que transcurre la preñez temprana siendo más notorio en las vesículas que sufren la reabsorción embrionaria (Figura 47).





La IL-10 no fue detectada en los cuernos uterinos de hembras no preñadas ni en las de preñez temprana sin reabsorción embrionaria (Figura 48). En el sector uterino S1, IL-10 no fue detectada en ninguno de los estadios reproductivos estudiados. En los cuernos que presentaron reabsorción embrionaria se detectó esta citocina en los sectores más próximos al ovario (S3 y S4); mientras que en la etapa final de la preñez temprana sólo se detectó en la sección S3.

Con respecto a las vesículas embrionarias (Figura 49) la IL-10 se pudo medir en la Em3 durante la preñez temprana con una tendencia a incrementarse durante la reabsorción embrionaria y al finalizar dicho proceso decrece sus niveles. La Em1, que no sufre reabsorción, mostró una tendencia contraria a Em3, tiende a incrementarse al finalizar el proceso de reabsorción embrionaria.

Los niveles de IL-10 encontrados fueron notoriamente inferiores a los niveles de IFN- γ .

FIGURA 48. NIVEL DE IL-10 EN LOS SECTORES DEL CUERNO UTERINO.

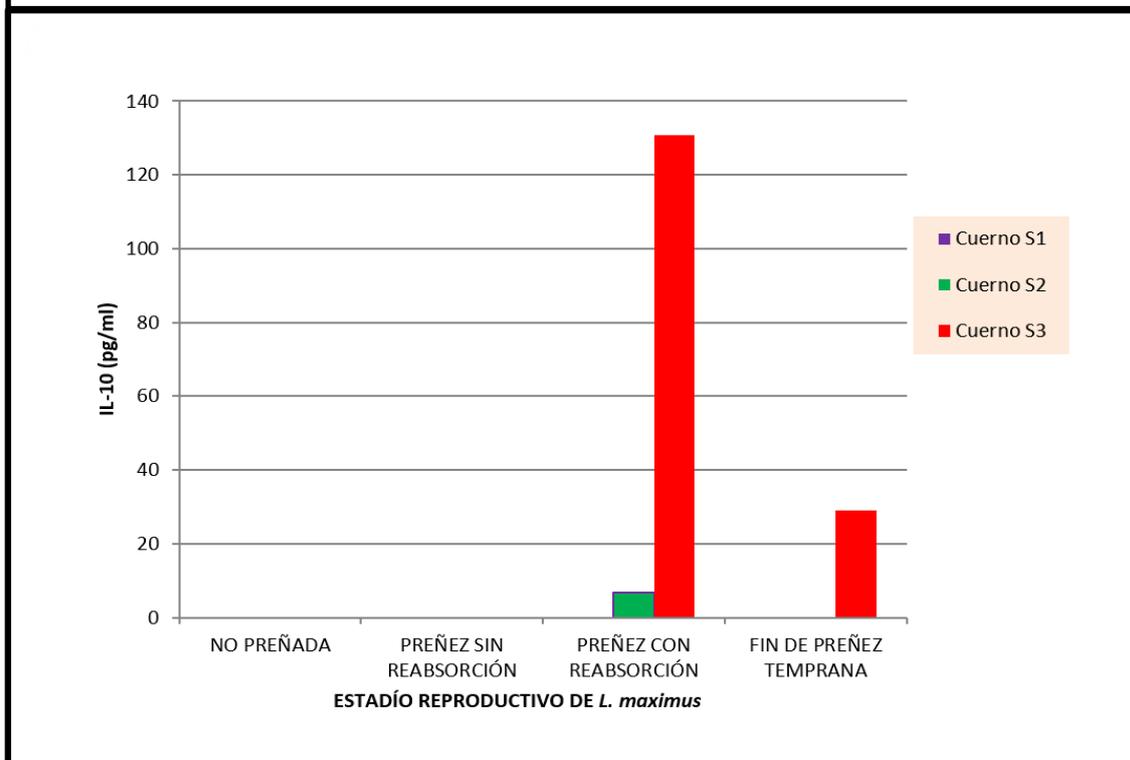
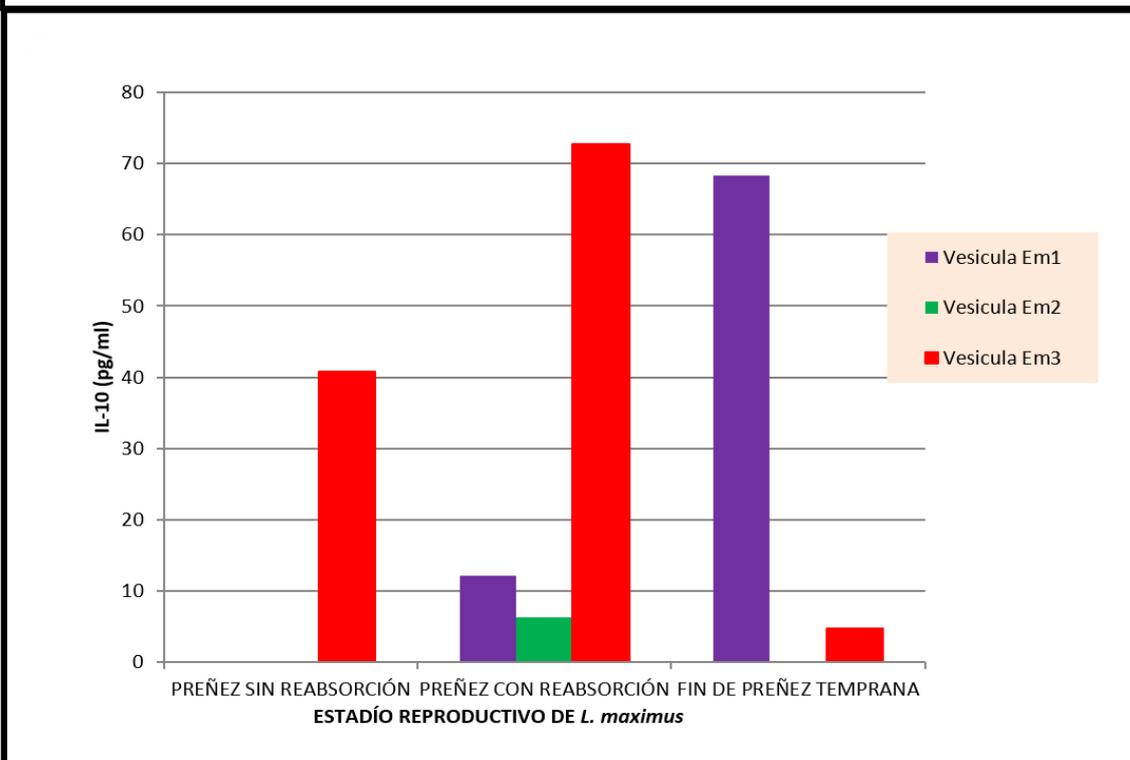


FIGURA 49. NIVEL DE IL-10 EN LAS VESÍCULAS EMBRIONARIAS.



6.6 ANÁLISIS REPRODUCTIVO DEL MACHO DE *L. maximus*

6.6.1 Diseño y fabricación de un electroeyaculador exclusivo para vizcacha

El electroestimulador fabricado y diseñado exclusivamente para *L. maximus* (Figura 50), cuenta con la posibilidad de ser conectado a una red doméstica o con batería incluida en su interior para trabajar a campo. En el frente del equipo se visualizan las perillas para modificar la frecuencia y amplitud (Figura 50A) según las respuestas individuales que manifieste cada macho anestesiado. En la parte posterior presenta dos entradas, a la derecha para el cable del transformador para acceder a red de energía doméstica y la de la izquierda para conectar el transductor (Figura 50B). En el interior del dispositivo se visualiza la batería y la placa fenólica de cobre sobre la cual se armaron los circuitos propiamente dichos (Figura 50C). Todo el conjunto fue ensamblado dentro de un gabinete.

El vástago (Figura 50D) fue diseñado teniendo en cuenta la anatomía de la vizcacha. La distancia ano-próstata en vizcacha es de 7 cm por lo que el vástago se hizo de 8 cm con un ancho de 0,7 cm. Presenta tres electrodos de 8 cm de longitud que son los que deben orientarse en dirección ventral cuando se introduce en el animal.

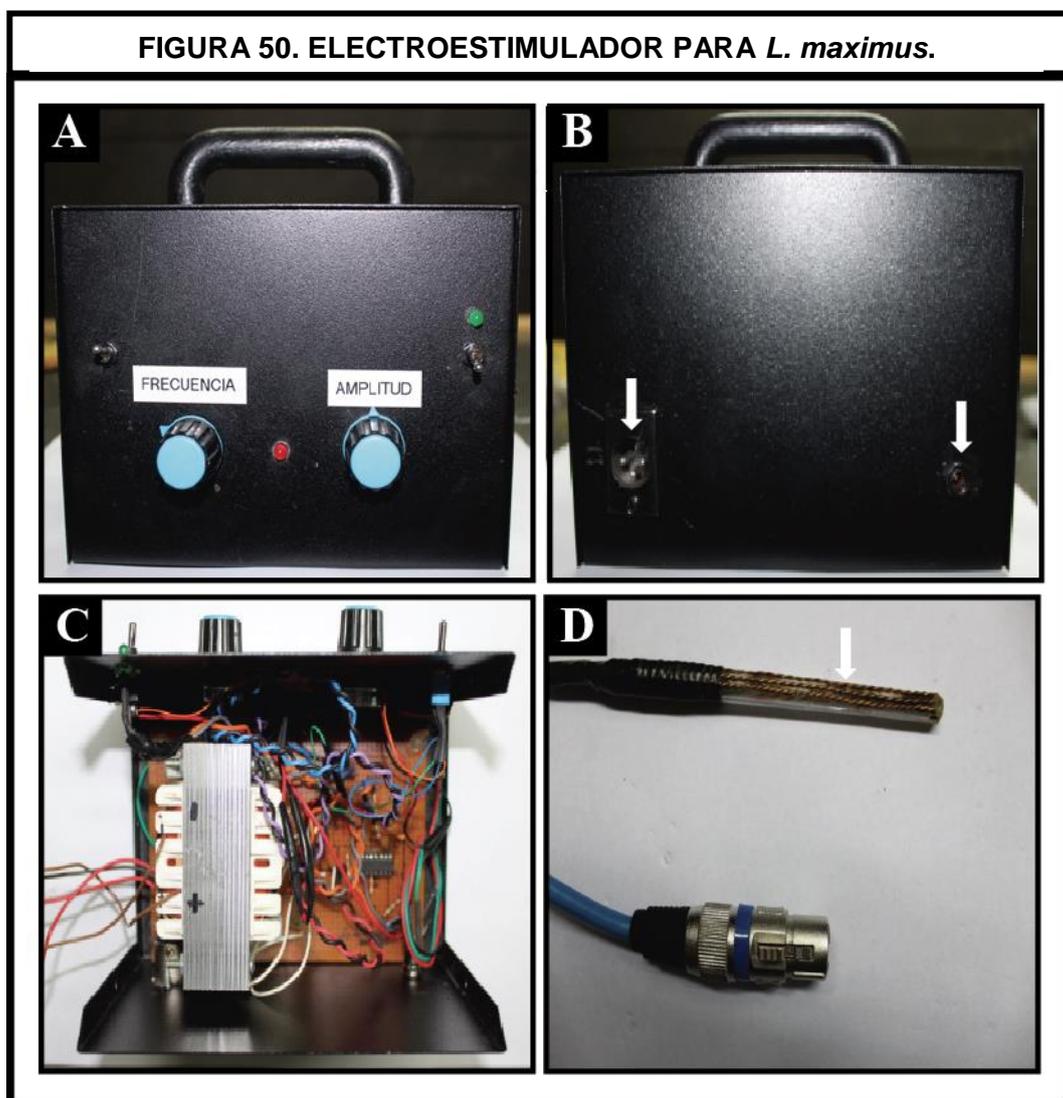
Luego de aplicada una serie de estímulos, se exterioriza el pene semierecto. En su extremo se visualizaron espículas peneanas que hasta el momento no habían sido descritas.

Nos encontramos con la necesidad de incluirle un estímulo de temperatura, al estímulo eléctrico. Por lo que se adicionó un dispositivo similar a una vagina artificial anexada con otro dispositivo que sostiene el tubo recolector de muestra (Figura 51). Se diseñó teniendo en cuenta el largo del pene. Ante el estímulo eléctrico que emite el equipo se logró la exteriorización completa del pene y pudo medirse en 6 animales. Se observó que el tamaño del pene fue de $15,74 \pm 0,39$ cm. Dentro del dispositivo térmico se coloca agua a 38°C en el tubo externo, por el tubo interno se pasa el pene del macho (Figura 51A) y en la punta se coloca el tubo recolector de muestra (Figura 51B). De esta manera el animal recibe un estímulo eléctrico mientras mantiene la temperatura (Figura 51C).

El uso del electroestimulador en animales adultos ha permitido establecer (Figura 51):

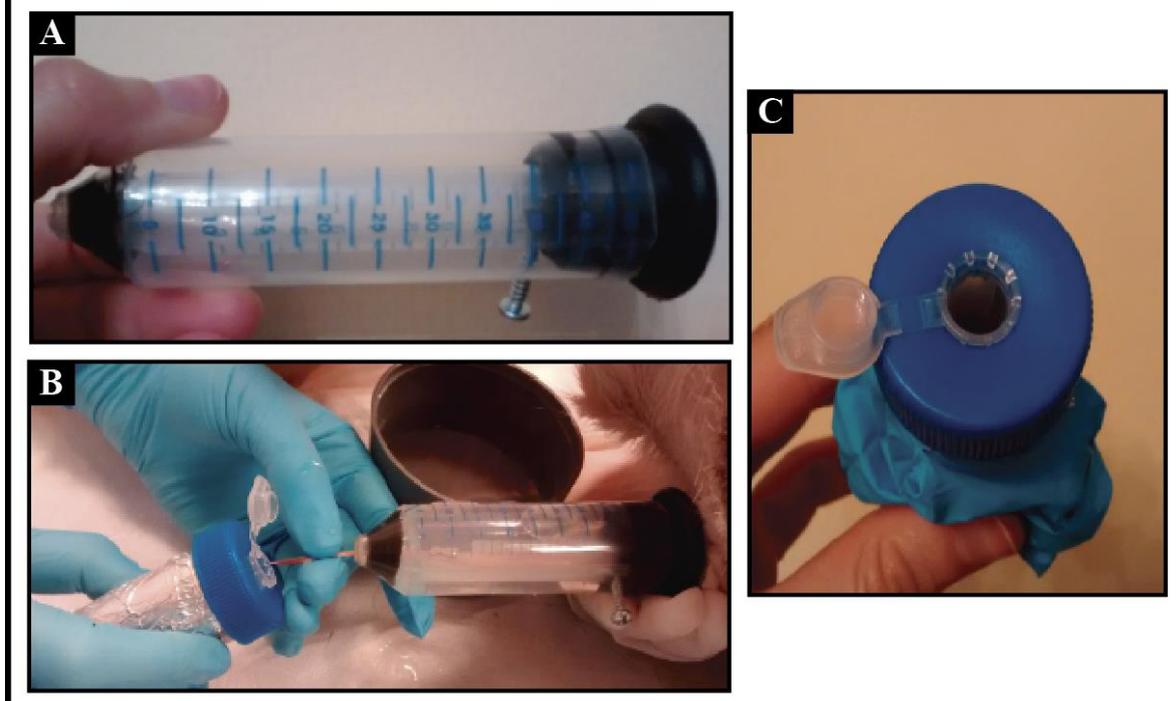
- ✓ Los primeros estímulos eléctricos producen la exteriorización del extremo del pene (Figura 51A).
- ✓ Continuando los estímulos eléctricos, se logra la exteriorización completa del pene de *L. maximus*. Ante este resultado se permitió conocer que el tamaño del pene de la vizcacha es de 16 cm.

- ✓ Al producirse la exteriorización del pene se pudo observar que en su extremo presenta espículas.
- ✓ Determinadas las condiciones de estimulación necesarias para provocar la exteriorización del pene, se analizaron las condiciones adecuadas para la obtención de espermatozoides: El primer grupo experimental de animales sometidos a estímulos eléctricos con exteriorización completa del pene no presentó espermatozoides en su muestra, mientras que al segundo grupo experimental se le agregó el dispositivo térmico y se visualizaron espermatozoides en sus muestras (Figura 51B y C). A la tinción de eosina/nigrosina se han encontrado espermatozoides vivos y a la observación directa se vio espermatozoides móviles.



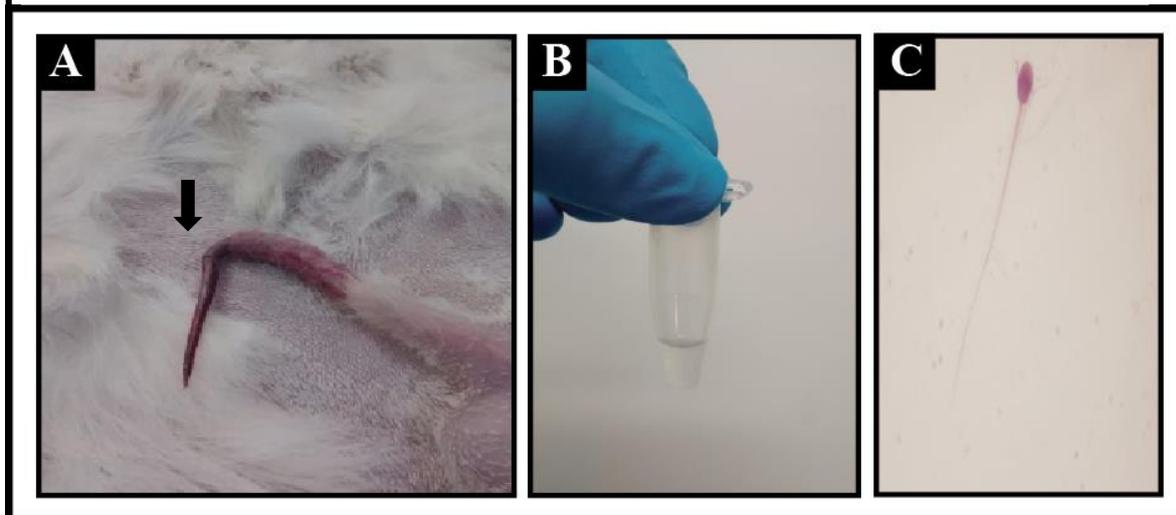
A) Frente del electroeyaculador. Contiene dos perillas una de frecuencia y otra de amplitud. B) Parte posterior del equipo. Presenta dos entradas (flechas) para conectar el transformador y el transductor. C) Interior del equipo. D) Vástago (flecha) de 8 cm de longitud con tres electrodos.

FIGURA 51. DISPOSITIVO PARA ESTÍMULO DE TEMPERATURA.



Diseñado para *L. maximus*. A) Dispositivo con doble camisa. Se carga el tubo exterior con agua atemperada y por dentro queda el tubo por donde pasa el pene. B) Tubo recolector de muestra dentro de otro tubo que contiene agua atemperada. C) Recolección de muestra con estímulo eléctrico y térmico.

FIGURA 52. ELECTROESTIMULACIÓN DEL MACHO DE *L. maximus*.



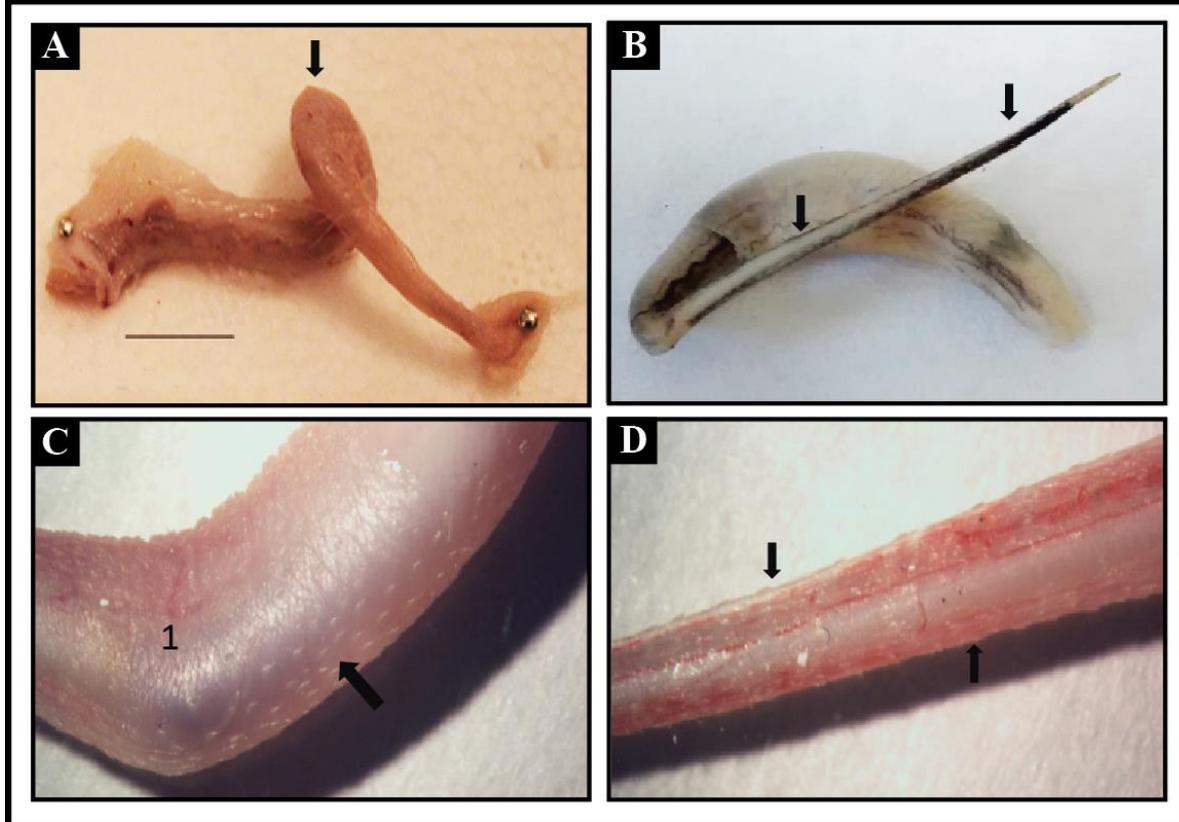
A) Respuesta ante los primeros estímulos eléctricos. Exteriorización parcial del estilete con espículas (flecha)
B) Muestra obtenida por electroeyaculación. C) Espermatozoide obtenido con la electroestimulación. Se realizó frotis.

6.6.2 Estudio macroscópico e histológico del pene de *L. maximus*

El pene de *L. maximus* manifestó una flexura sigmoidea (Figura 53A). Su extremo distal presentó un “estilete” de aproximadamente 3 cm (Figura 53B) que se une al resto del pene por medio de un codo (Figura 53C) sobre el cual también se presentaron espículas. El estilete presentó tres bandas marrones alternadas con tres bandas blancas. Sobre las bandas marrones se encontraron las espículas peneanas ordenadas en hilera (Figura 53D). Al análisis histológico (Figura 54), el estilete presentó estructura cartilaginosa como tejido central que le brinda rigidez al extremo distal del pene hasta el codo. La región proximal hasta el codo mostró una estructura típica con cuerpo cavernoso y esponjoso. Presenta dos cuerpos cavernosos separados por un septo bien marcado. En ventrolateral se observó paquete vasculonervioso. Hacia proximal el tabique no llega a basal y permite la comunicación entre ambos lados por ventral. Cuerpo esponjoso bien desarrollado principalmente en ventral en las regiones más proximales. En todos los cortes se ha visualizado la uretra peneana que manifestó un cambio transicional. En el estilete mostró menor tamaño y un epitelio poco plegado (Figura 54E). En las regiones proximales fue de mayor tamaño, con luz amplia y presentando gradualmente un cambio de epitelio hasta mostrar un epitelio cilíndrico pseudoestratificado plegado (Figura 54G).

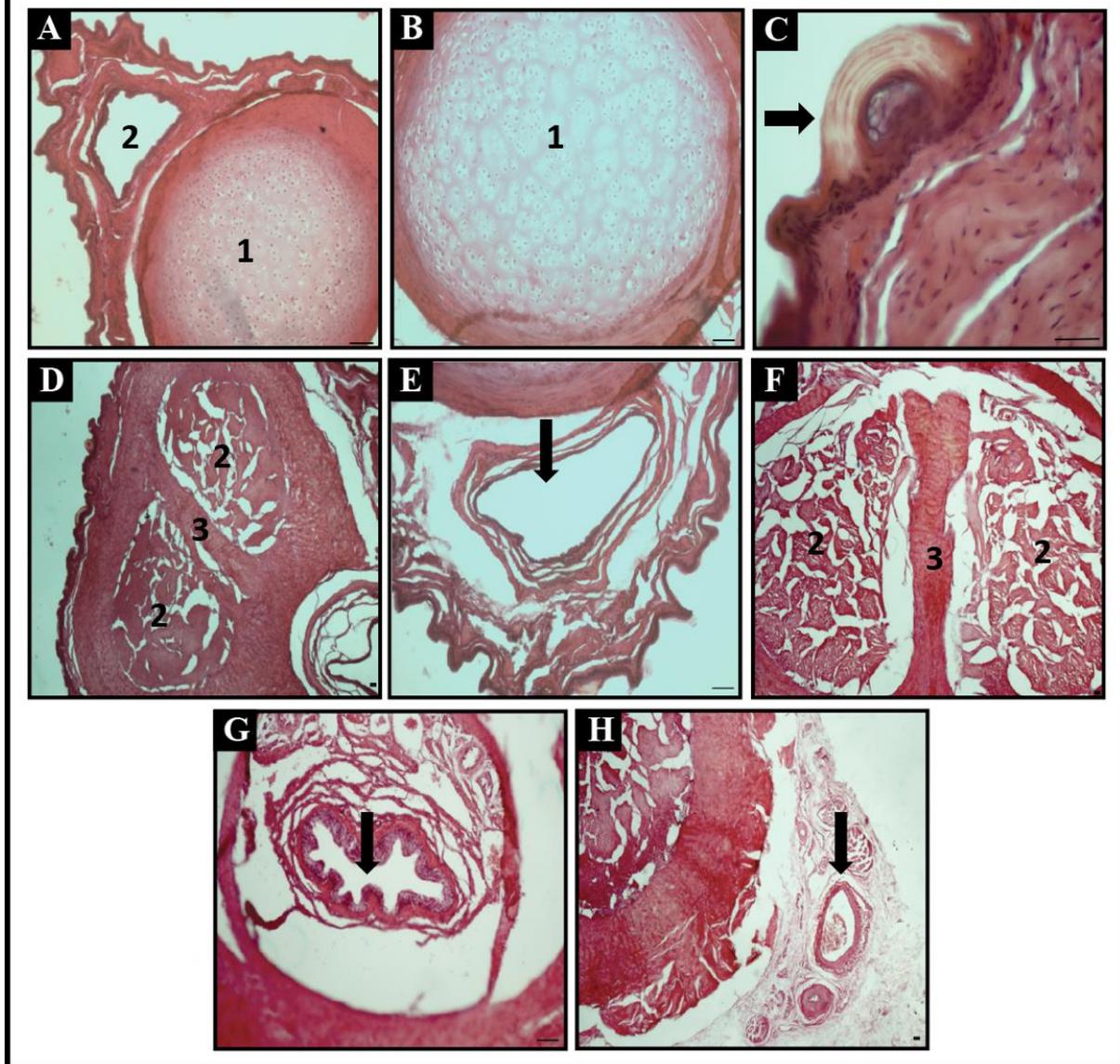
En la MEB se observaron en detalle las espículas peneanas (Figura 55) sobre la superficie del estilete del pene de *L. maximus* hasta la región del “codo”. Todas las espículas presentaron la misma dirección con el borde libre en sentido contrario al glande.

FIGURA 53. MACROSCOPÍA DEL PENE DE *L. maximus*.



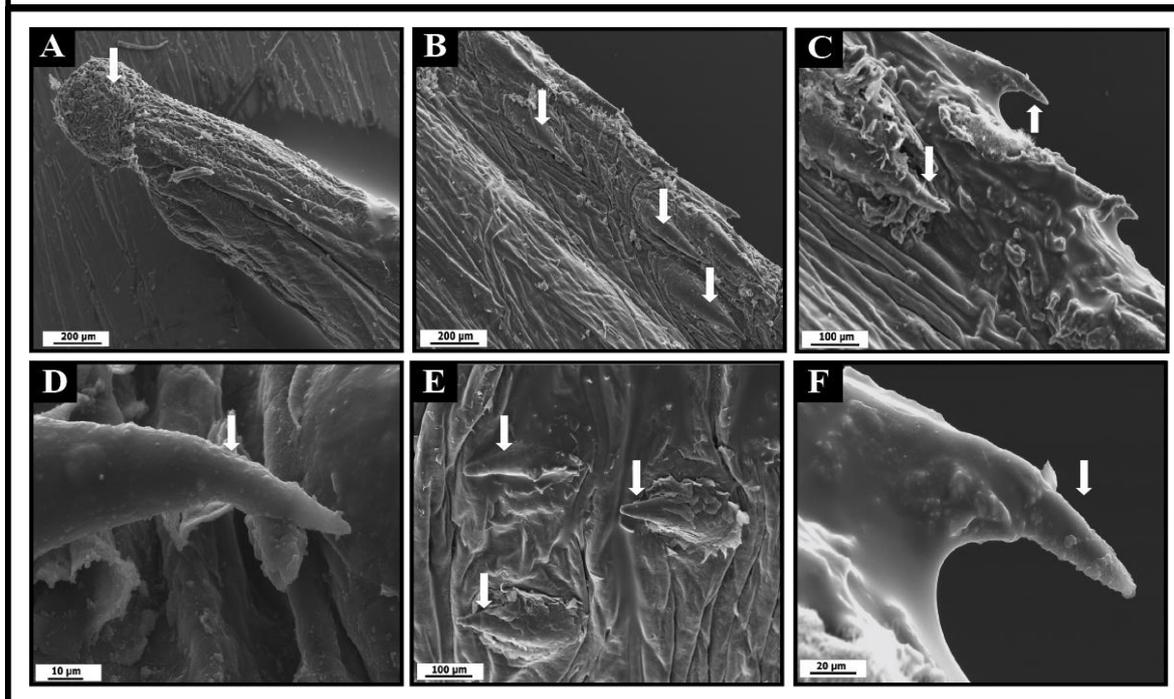
A) Extremo distal del pene con prepucio. Se observa la presencia de curvatura sigmoidea (flecha). B) Extremo distal del pene. Estilete con presencia de espículas peneanas sobre las bandas marrones (flechas). C y D- Visualización del pene a lupa. C) Presentación de un codo (1) entre el estilete y el resto del pene. Se visualizan espículas peneanas (flecha). D) Extremo medio del estilete. Observación de 2 hileras de espículas (flechas). Barra A: 1cm.

FIGURA 54. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL PENE DE *L. maximus*.



A) Estilete cartilaginoso central (1). Se visualiza uretra peneana con amplia luz (2) (10x). B) Detalle del cartilago hialino del estilete peneano (1) (10x). C) Se observa sobre superficie del estilete parte de espícula peneana (flecha) (40x). D) Cuerpos cavernosos (2) de la porción continua al codo, separados entre sí por un tabique completo (3) (4x). E) Uretra peneana con luz amplia, el epitelio no muy replegado (10x) (flecha). F) Cuerpos cavernosos (2) separados parcialmente por un tabique (3) (4x). G) Uretra con epitelio biestratificado, replegado (flecha) (10x). H) Paquete vasculonervioso (flecha) (4x). Barra A, B, D-H: 50 μ m. Barra C: 20 μ m. Tinción Hematoxilina-Eosina

FIGURA 55. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL PENE.



A) Extremo distal del pene. Se observa glánde (flecha). B y C) Superficie del estilete peneano con presencia de espículas (flechas). D) Espícula peneana. E) Observación de tres espículas sobre la superficie peneana (flechas). F) Detalle de una espícula donde se observa la dirección hacia caudal. Barra A y B: 200 μm . Barra C y E: 100 μm . Barra D: 10 μm . Barra F: 20 μm .

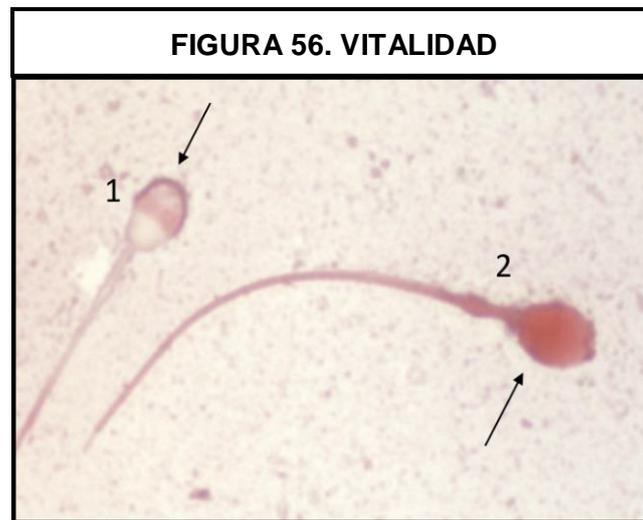
6.6.3 Estudio de los espermatozoides de *L. maximus*

6.6.3.1 Análisis de parámetros microscópicos de los espermatozoides

Los animales capturados en época reproductiva presentaron dos estadios: machos con alta concentración espermática ($\geq 4 \times 10^7$ espermatozoides) y alta vitalidad ($\geq 40\%$) en cola de epidídimo (n=6) y machos con alta concentración espermática y baja vitalidad ($< 40\%$) en cola de epidídimo (n=4). La vitalidad en espermatozoides de cola del epidídimo (Figura 56) de machos del primer grupo varió entre 43% y 52% y la mayoría presentaron integridad acrosomal (se encontraban vivos y no reaccionados).

Se evaluó la integridad acrosomal de espermatozoides de cola de epidídimo con la combinación de la tinción de Azul de Tripán y la microscopía de contraste interferencial diferencial (DIC). Se observaron espermatozoides vivos (transparentes o celestes) o muertos (azules) y espermatozoides intactos o con acrosomas reaccionados. Quedando

definidos los cuatro patrones que se observan en otras especies: I vivo intacto, II vivo reaccionado, III muerto intacto y IV muerto reaccionado.



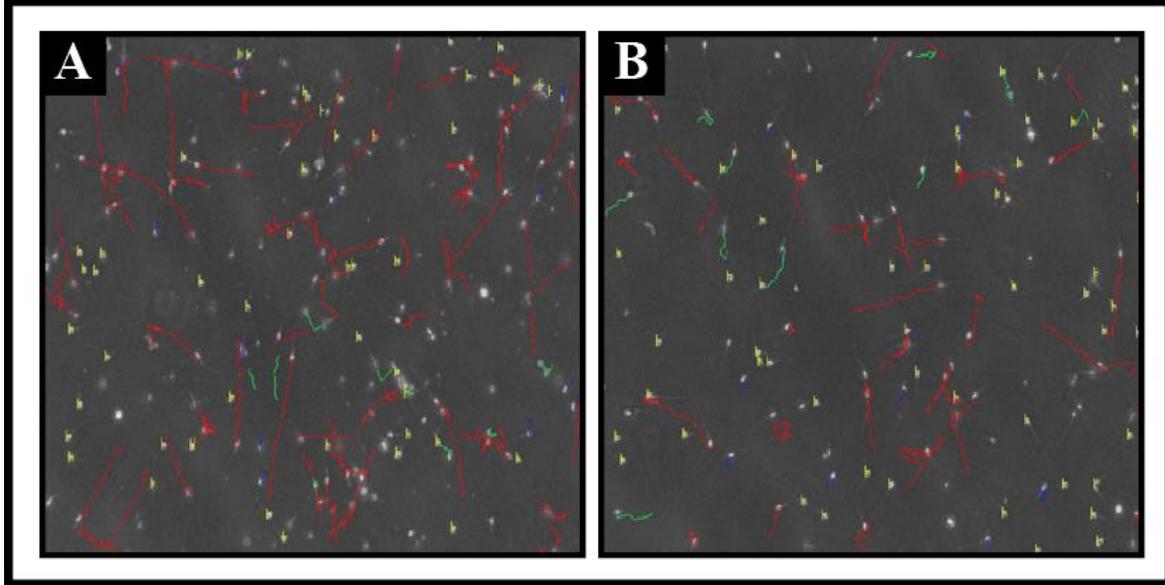
Técnica de eosina/nigrosina para evaluar vitalidad de espermatozoides de vizcacha. (1) Espermatozoide vivo visualizado transparente a la tinción. (2) Espermatozoide muerto visualizado rosado a la técnica de eosina-nigrosina.

6.3.2 Análisis seminal computarizado de la movilidad de los espermatozoides

La incubación sobre platina térmica termostata durante 10 minutos mejoraba los parámetros de movilidad en las muestras pre-centrifugadas.

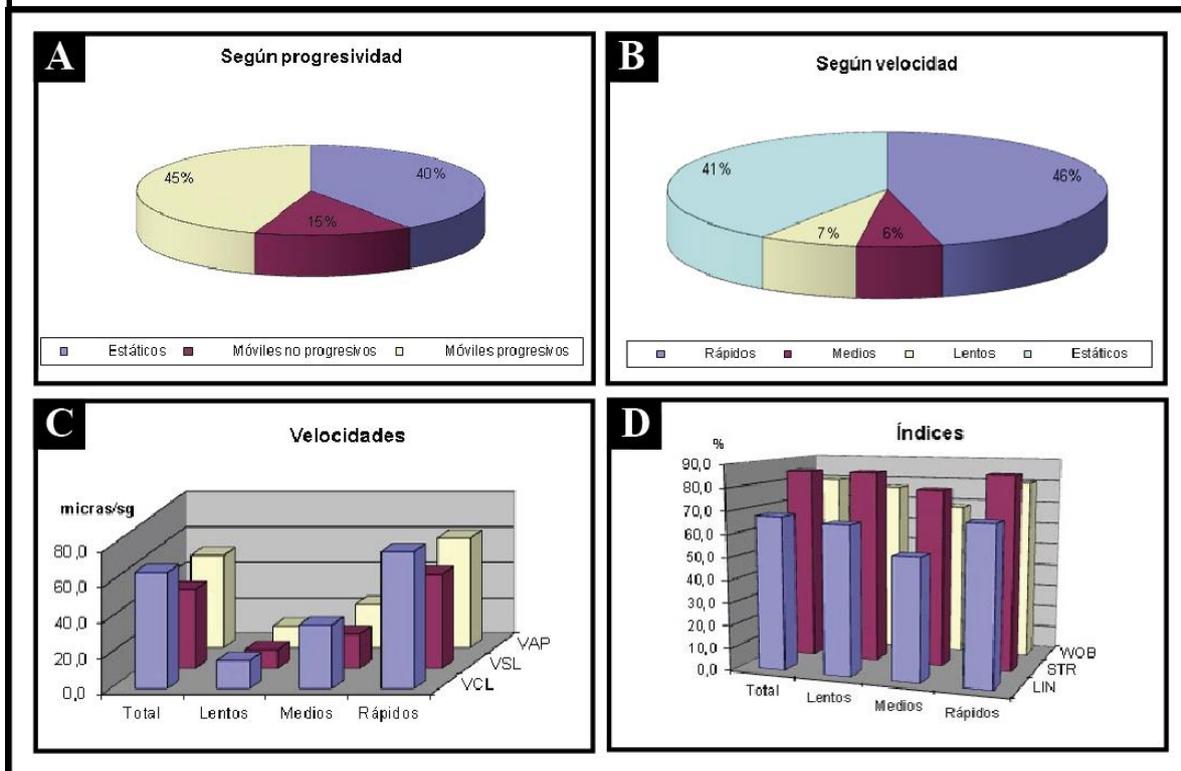
Se capturaron diferentes campos en los que se estudió la movilidad (Figura 57). En las muestras pre-centrifugadas se encontró un 46% de espermatozoides móviles progresivos rápidos. Dicho valor descendió a 33,7% en las muestras post-centrifugadas. En los espermatozoides rápidos pre centrifugados, el valor medio de amplitud media de desplazamiento lateral de cabeza (ALH) fue de 2,1 μm , la frecuencia de batido (BCF) fue de 8,6 Hz, la velocidad curvilínea (VCL) de 76,9 $\mu\text{m/s}$, el índice de linealidad (LIN) del 69%, el índice de rectitud (STR) de 85,6% y la velocidad rectilínea (VSL) de 52,7 $\mu\text{m/s}$ (Figura 58). En las muestras post-centrifugación, la VCL descendió a 67 $\mu\text{m/s}$, el LIN a 53,6% y la VSL a 36,3 $\mu\text{m/s}$. Luego de la centrifugación los espermatozoides rápidos fueron los más afectados, disminuyendo sus parámetros de velocidad (Figura 59).

FIGURA 57. ANÁLISIS COMPUTARIZADO DE LOS ESPERMATOZOIDES.



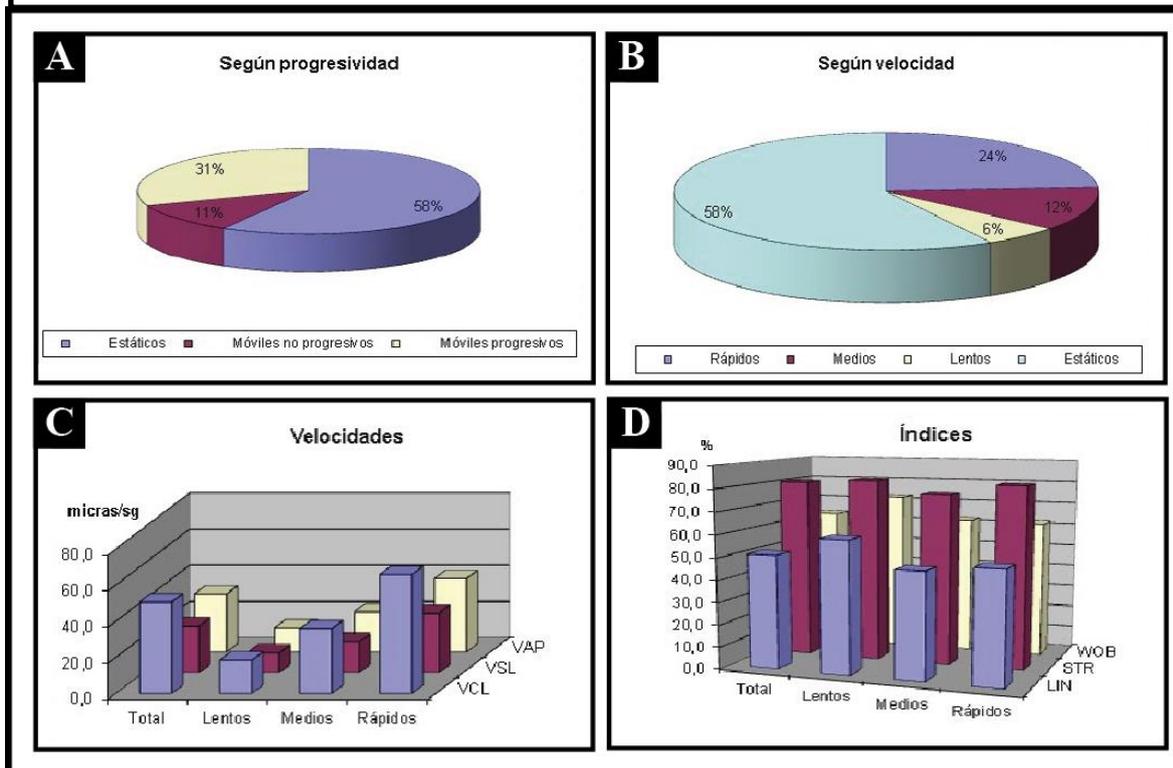
A) Campo estudiado con espermatozoides pre-centrifugados. B) Campo estudiado con espermatozoides post-centrifugados. Los marcados en rojo son los activos, los verdes los semimóviles, el amarillo son lentos y los azules son estáticos.

FIGURA 58. MUESTRAS PRE-CENTRIFUGADAS DE LOS ESPERMATOZOIDES.



Análisis seminal computarizado de muestras pre-centrifugadas de la cola del epidídimo. A) Gráfico sobre la progresividad. El 45% fue móvil progresivo. B) Gráfico según las velocidades. El 46% fueron rápidos. C y D) Índices en cada uno de los grupos según las velocidades.

FIGURA 59. MUESTRAS POST-CENTRIFUGADAS DE LOS ESPERMATOZOIDES.



Análisis seminal computarizado de muestras post-centrifugadas de la cola del epidídimo. A) Gráfico sobre la progresividad. El 31% fue móvil progresivo. B) Gráfico según las velocidades. El 24% fueron rápidos. C y D) Índices en cada uno de los grupos según las velocidades.

6.6.4 Evaluación de la participación del plasma seminal en la decidualización

6.6.4.1 Inseminación de hembras con macerados de próstata y conductos deferentes

En una primera aproximación se administró por vía intracornual un homogenato de glándulas anexas incluyendo próstata y conductos deferentes para detectar una posible acción de algunos componentes del plasma seminal en la decidualización. Esto se realizó en animales inducidos por administración exógena de hormonas (Ver Materiales y Métodos) seguida de una inseminación con homogenato o solución fisiológica (control).

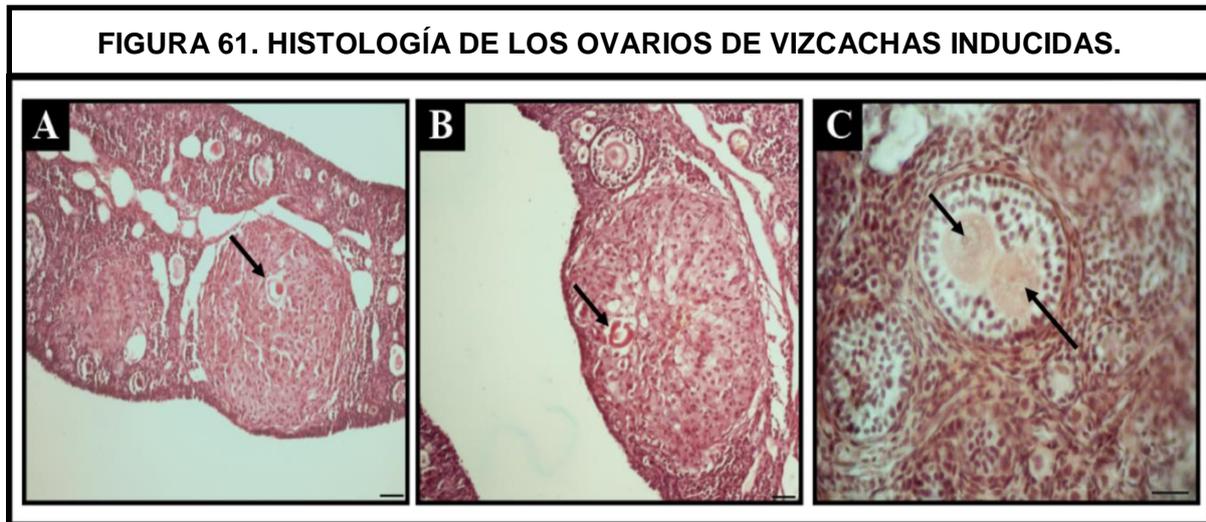
Al análisis macroscópico e histológico, los cuernos uterinos que se inseminaron con homogenatos presentaron diferencias entre los grupos. Las hembras control y las inseminadas sin tratamiento hormonal previo no manifestaron alteraciones en sus cuernos

uterinos (Figura 60A y B). El grupo inducido e inseminado mostró en la macroscopía halos rojizos (Figura 60C) del lado AMe. A la histología, dos de tres animales de este grupo presentaron cambios en el endometrio (Figura 60D y F). A la tinción de PAS las glándulas endometriales se encontraban secretoras y se evidenciaron los gránulos en la región basal (Figura 60F).



A) Macroscopía de un cuerno uterino inseminado sin tratamiento hormonal. No se observa ninguna alteración. B) Corte transversal del cuerno uterino de la foto A. Se conserva la estructura histológica del endometrio (4x). C) Macroscopía de un cuerno uterino inseminado y previamente inducido. Se observaron halos rojizos (señalado). D y E) Cortes histológicos de animales tratados. Se observó cambios histológicos en el endometrio como hemorragia (flecha) (D 4x y E 10x). F) Glándula endometrial con secreción, PAS + (flecha) (40x). Barra A y C: 0,5 cm. Barra B, D y E: 50 μ m. Barra F: 20 μ m. B, D y E- Tinción Hematoxilina-Eosina. F- Tinción Ácido periódico Schiff.

La histología de los ovarios de los animales que fueron inducidos mostraron formación de folículos pre-ovulatorios que se luteinizaron y en su interior retenían al oocito o parte del mismo (Figura 61A y B). Se ha visualizado en muchas ocasiones la presencia de dos ovocitos dentro de un mismo folículo de *L. maximus* (Figura 61C).



A y B) Se visualizan cuerpos lúteos accesorios que en su interior se muestran restos de la membrana del oocito (flechas) (10x). C) Folículo con dos oocitos en su interior (flechas) (40x). Barra A y B: 50 μ m. Barra C: 20 μ m. Tinción Hematoxilina-Eosina.

6.6.4.2 Componente del plasma seminal: IL-8

Sobre las diferentes secciones uterinas tratadas con el macerado, presentadas en la sección anterior, se hicieron homogenatos para medir IL-8 y se realizó un análisis estadístico sobre los niveles de esta citocina. En el grupo control y en el inseminado sin tratamiento hormonal, IL-8 no fue detectable en ninguno de los sectores uterinos analizados. El grupo inducido e inseminado mostró diferencias significativas en el nivel de IL-8 en sus diferentes secciones uterinas ($p < 1 \times 10^{-4}$), siendo el S1 el que presentó mayor nivel de IL-8 ($145,5 \pm 6,62$ pg/ml), seguido de S2 ($75,3 \pm 11,45$ pg/ml) y la sección S3 fue la que presentó menor nivel de esta citocina ($1,37 \pm 1,45$). Esto mostró un correlato directo con las observaciones histológicas (Ver Figura 60).

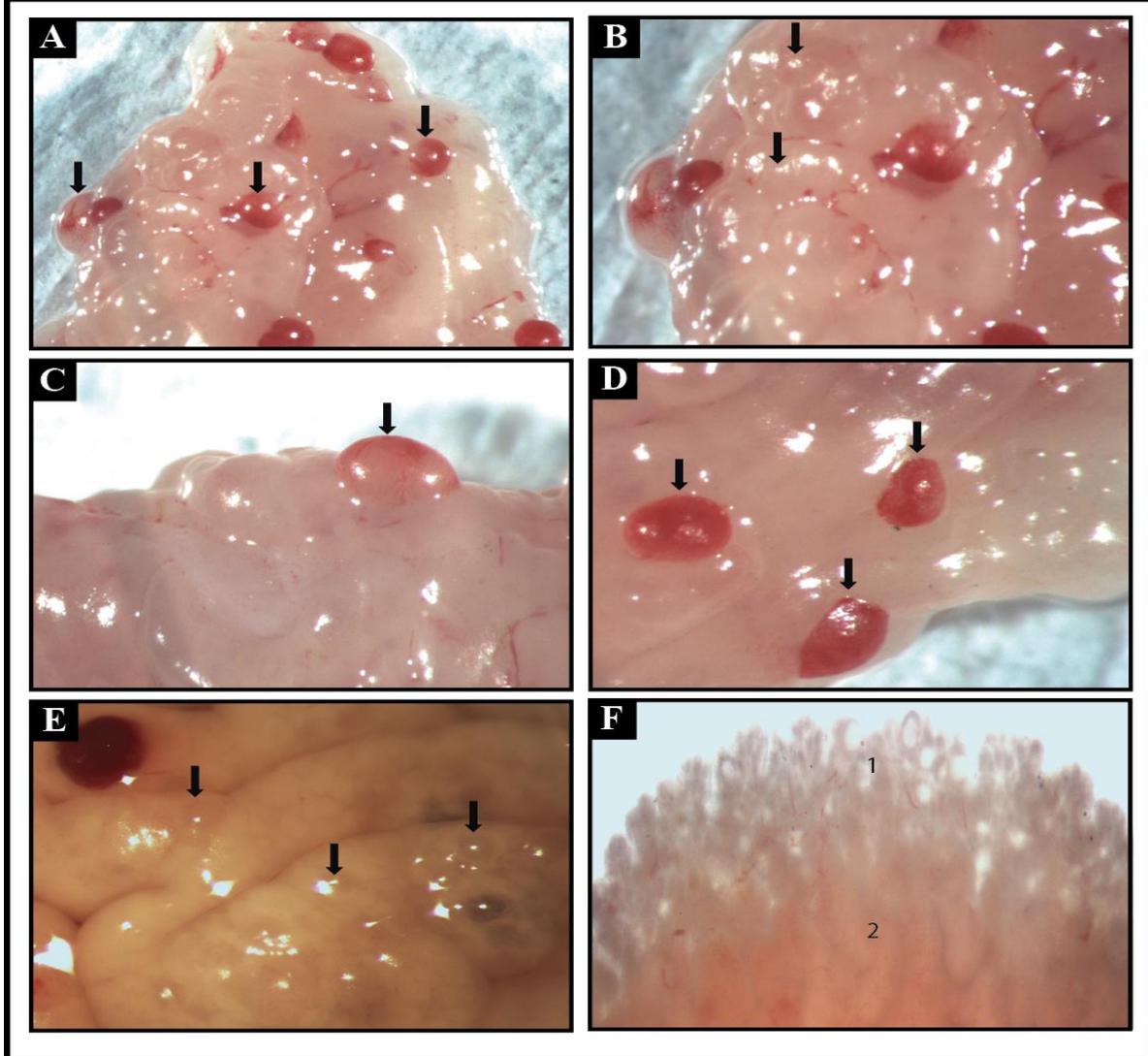
6.7 INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN POR PLASMA SEMINAL EN *L. maximus*

En una instancia posterior se analizó la posibilidad de inducción de la ovulación por inyección de plasma seminal IM (Ver materiales y métodos). Al análisis macroscópico de los ovarios de animales tratados con plasma seminal (Figura 62) se visualizó un importante desarrollo folicular, puntos rojizos sobre la superficie ovárica que podrían corresponderse con estigmas ovulatorios y también se observaron folículos que sobresalían y en su superficie más externa se visualizaban más irrigados. En este mismo análisis los controles presentaron únicamente desarrollo folicular sin estigmas ovulatorios que señale una posible ovulación.

Al realizar el lavado de los oviductos de los animales tratados con plasma seminal se detectó la liberación de oocitos rodeados de cumulus oophorus (Figura 63). Dispersando mecánicamente las células del cumulus se observó gametas femeninas con buena calidad morfológica.

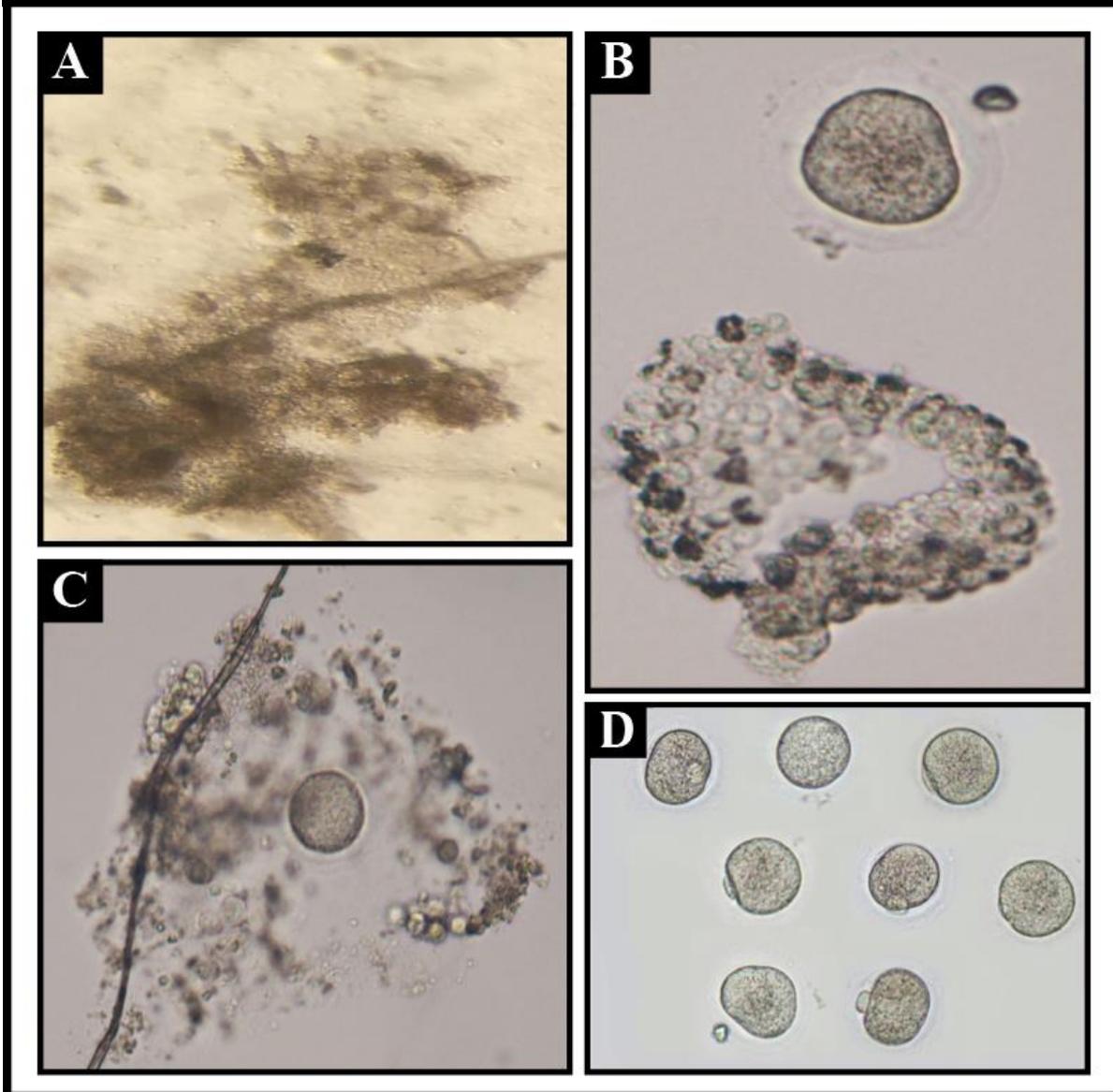
A la histología de los ovarios de animales tratados con plasma seminal se observó desarrollo folicular y la presencia de CL donde no se han encontrado restos de membrana pelúcida ni de oocitos, lo que indicaría que se trata de CL primarios (Figura 64). Los CL que se presentaron sobresaliendo de la superficie ovárica se mostraron pediculares, polarizados en dos sectores por la presencia de un proceso de capilarización: la región más externa congestiva y la región más cercana al ovario carente de tal congestión. Se visualizó la presencia de cistos que encerraban 2 o 3 folículos primordiales.

FIGURA 62. MACROSCOPIA DE LOS OVARIOS DE ANIMALES TRATADOS CON PLASMA SEMINAL (IM).



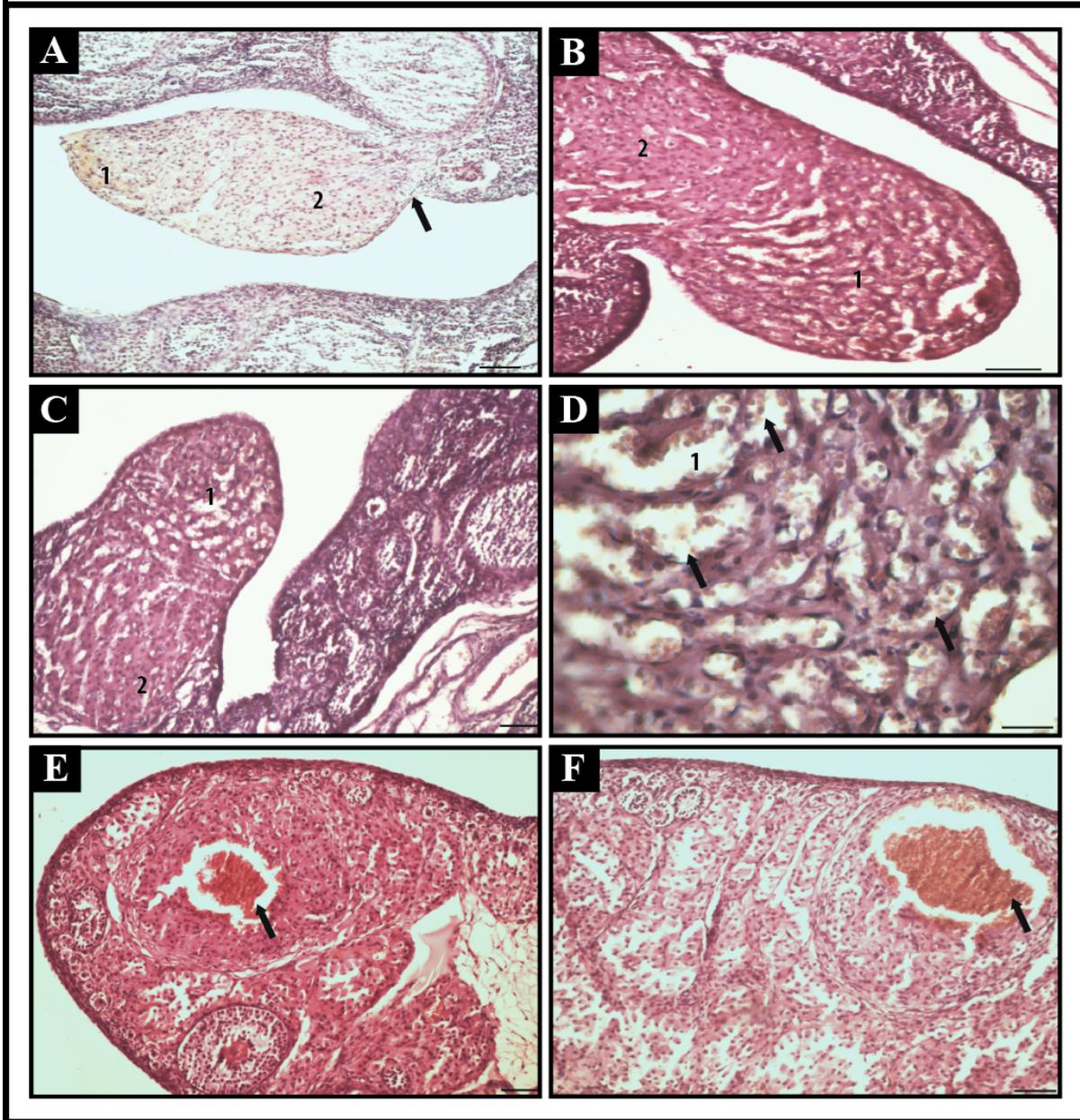
A-E) Superficie ovárica de animales tratados con plasma seminal. Se observa gran cantidad de estigmas ovulatorios y desarrollo folicular (flechas). F) Borde ovárico festoneado (1) que se diferencia macroscópicamente del resto del tejido ovárico (2). A: 4x, B-E: 6.3x, F: 3x.

FIGURA 63. LAVADO DE OVIDUCTO DE ANIMALES TRATADOS CON PLASMA SEMINAL (IM).



A) Cumulus obtenido de un lavado de oviducto. Se muestra gran cantidad de oocitos (flechas). B y C) Se señalan en cada una de las fotos un oocito con resto de cumulus (1). D) Agrupamiento de oocitos recolectados en el lavado de oviducto de un animal tratado que ha ovulado.

FIGURA 64. HISTOLOGÍA DEL OVARIO DE ANIMALES TRATADOS CON PLASMA SEMINAL.



A-C) Cuerpos lúteos pediculares. Se encuentran polarizados: región congestiva (1) y región más cercana al ovario no congestiva (2) (10x). D) Detalle de región congestiva (1) (flechas) (40x). E y F) Cuerpos hemorrágicos en folículos con proceso de luteinización sin restos de oocitos (10x). Barra A-C y E-F: 50 μ m. Barra D: 20 μ m. Tinción de Hematoxilina-Eosina.

7. DISCUSIÓN

L. maximus dentro de sus características reproductivas inusuales la más llamativa es la del proceso de reabsorción embrionaria selectiva. Luego de la implantación, durante la primera mitad del desarrollo se produce la reabsorción embrionaria selectiva (entre el día 26 y 70 de gestación). Este proceso sucede de manera secuencial progresiva a lo largo de sus cuernos uterinos. Los embriones se van eliminando desde los más cercanos al ovario hacia los más alejados; proceso que se detiene en mitad de la gestación dejando en desarrollo solamente a los embriones implantados cercanos al cérvix en cada cuerno uterino (Weir, 1971b). Este proceso de carácter fisiológico dentro de la gestación de esta especie puede deberse a múltiples causas nutricionales, endócrinas, inmunológicas e incluso de carácter anatómico-funcional del tracto reproductivo.

7.1 Morfohistología del tracto reproductivo y de la placenta de *L. maximus*

El análisis morfológico e histológico del tracto reproductor femenino permitió verificar las descripciones previas realizadas por otros autores (Flamini y col., 2011; Flamini y col., 2014; Roberts y Weir, 1973; Weir 1971a) y detectar características propias aún no conocidas.

En términos generales, las características anatómicas e histológicas del tracto reproductivo de *L. maximus* son compartidas con otros roedores histricomorfos como el coipo (Felipe, 2006), la chinchilla, el acuchi (Weir, 1971c) y el agutí (Weir, 1971d); sin embargo se diferencia de las mismas por características propias e inusuales.

El cérvix de *L. maximus* no fue muy marcado y presentó continuidad directa con el cuerno uterino por su escaso desarrollo muscular, al igual que en el acuchi (Weir 1971c).

Una característica particularmente llamativa fue la presencia de vénulas de endotelio alto (HEV) en la vagina de *L. maximus*. Este tipo de vasos son característicos de los tejidos linfoides, siendo inusual su presencia en el tracto reproductivo (Abbas, 2012). Sin embargo, ha sido descrito que pueden desarrollarse a partir de un epitelio normal en sitios de reacciones inflamatorias crónicas facilitando que las células T específicas tengan una vía directa de acceso a la zona inflamatoria (Abbas, 2012). Las células dendríticas son abundantes en la vagina y pasan del torrente sanguíneo al tejido a través de este tipo de vénulas (Flores Romo, 2001). La detección de este endotelio especializado sugiere una relación directa con los procesos de reabsorción embrionaria que las hembras sufren durante la gestación, habilitando una vía de acceso directo para linfocitos requeridos en dicho evento.

La administración exógena de P4, promovió en *L. maximus* la formación de quistes intraepiteliales en la vagina de vizcacha. En la rata, se ha observado que las dosis excesivas de hormonas ocasionan cambios endometriales atípicos por una extrema actividad secretoria asociada con cambios proliferativos (Arias Stella, 2014).

La vizcacha ha mostrado una tendencia a formar “microambientes” en su tracto reproductivo. Tanto en el oviducto como en el cuerno uterino se detectaron compartimientos diferenciados. En su oviducto presentó trabéculas que crean subunidades en el lumen de este órgano tubular comparables a las descritas en la yegua (Aguilar y col. 2012). Se desconoce la función de estos compartimientos que han sido vinculados con la capacidad de reserva espermática aunque no se ha podido confirmar tal función (Bosch y Wright, 2005). En el epitelio oviductal de la ampolla, principalmente, se ha observado una protrusión celular con desprendimiento de fragmentos citoplasmáticos que manifiesta una pérdida celular del epitelio oviductual. Este evento que también se presenta en la yegua (Steffl y col. 2008; Aguilar y col. 2012) y la cerda (Abe y Hoshi, 2007). Se desconoce, sin embargo, si se trata de un evento fisiológico, de renovación o un proceso apoptótico (Steffl y col. 2008). Incluso se ha propuesto que las células epiteliales enteras se extruyen a la luz oviductal como secreción apócrina (Steffl y col. 2008). Aunque, como en otros animales, queda por determinar la posible función de estas células, la presencia de “células en clavo” en *L. maximus* conforman un carácter constitutivo del epitelio oviductal en esta especie.

En los cuernos uterinos con preñez temprana se han identificado pseudotabiques entre las vesículas embrionarias que histológicamente se correspondieron con el tejido endometrial. Estos tabiques generan “ambientes diferenciales” que mantienen aislados a los embriones contiguos. Este aislamiento permitiría la simultaneidad de un proceso de muerte embrionaria, como ocurre en los embriones implantados proximalmente, con una gestación exitosa que transcurre en el embrión con implantación distal cercano al cérvix. Esto también se evidenció al retirar vesículas reabsorbidas, las cuales presentaron “forma de gancho” que se correspondía con el ojal que quedaba en el centro del pseudotabique. En las endoscopías de hembras no preñadas se observó que la mucosa cornual emite pliegues transversales que obstaculizan la luz uterina. Es razonable suponer que estos pliegues tengan un crecimiento como consecuencia de las modificaciones hormonales que ocurren durante la gestación y se desarrollen hasta dejar una mínima comunicación entre vesículas embrionarias adyacentes.

El proceso de reabsorción embrionaria estaría localizado en la vesícula embrionaria, dado que en el cuerno uterino S2-S3 lo único que se evidenció fueron prolongaciones uterinas que llegaban a formar colgajos hacia la luz, posiblemente como una reacción para incrementar la superficie de contacto con la vesícula implantada que sufrirá la reabsorción embrionaria.

Durante la involución uterina posparto de la vizcacha se produce una fuerte degradación de la hemoglobina a hemosiderina, la que es fagocitada por los macrófagos produciendo una hemosiderosis localizada (Yoshida y col. 2007), que se puede observar histológicamente después de la hemorragia en hembras en anestro. Esto se generaría, al igual que en caninos, por lesiones endometriales manifiestas a través de una gran cantidad de focos hemorrágicos en el endometrio y hematomas marginales en los sitios de implantación (Hafez, 1996; Gázquez, 1991; Arnold y col., 1996).

Flamini y col. (2011) ha descrito la placenta de *L. maximus* y dio a conocer que la barrera hemomonocorial se establece desde una etapa temprana de la gestación. La placenta presentó aspectos similares con el conejillo de indias, la chinchilla y otros roedores histricomorfos (Kanashiro y col., 2009). La placenta es lobulada y se sugiere que evolucionó para aumentar la eficacia del intercambio materno-fetal ampliando la región de intercambio (Mess 2001). La subplacenta está conformando parte de la placenta. Es una estructura muy plegada y a mediados de la gestación es reducida en comparación con el laberinto. En este trabajo se evidenció que la subplacenta en preñez intermedia y a término sufría un proceso de apoptosis. Esto coincidiría con lo descrito en algunos histricomorfos donde dicha parte de la placenta pierde tejido conectivo a partir de la mitad de la gestación, se vuelve más compacta y se producen cambios degenerativos (Bonatelli y col., 2005; Rodrigues y col., 2006). Por otra parte se detectó apoptosis en la decidua basal en la preñez intermedia temprana donde posteriormente se localizó el depósito mineral ocasionando la calcificación. La apoptosis es un proceso fisiológico normal a lo largo de la gestación, es necesaria para mantener la inmunosupresión en el útero gestante protegiendo al feto. Dicha muerte celular programada en la placenta del feto que llega a término estaría correctamente regulada ya que una alteración en dicho proceso alteraría su gestación y esto no se evidenció (Jerzak y Bischof, 2002).

El crecimiento fetal óptimo depende de una función placentaria eficiente. Una causa de restricción del crecimiento intrauterino del embrión, muerte fetal y subnutrición, puede deberse a una insuficiencia placentaria (Rossant y Cross, 2001). Al analizar las placentas de diferentes estadios gestacionales, se observó una clara calcificación placentaria desde el comienzo del estadio intermedio. Con el avance de la gestación, los densos agregados de minerales se fusionan y forman gránulos cada vez mayores en la decidua basal siendo más notorios por encima de la subplacenta. A diferencia de otros mamíferos, incluyendo el humano, donde la calcificación de la placenta es un evento fisiológico relacionado a su envejecimiento y ocurre al final de la gestación (Sarkar y col., 2007), en *L. maximus* la calcificación placentaria distrófica se presenta tempranamente, desde la mitad de la gestación. Sin embargo, esta calcificación temprana no parece interferir con el normal

desarrollo fetal dado que el mayor crecimiento del feto que llega a término transcurre en presencia de una placenta calcificada.

Sin embargo, la calcificación de la placenta es un indicador de pérdida de funcionalidad. La medición de E2 y P4 en las porciones de la placenta (decidua, subplacenta y laberinto) arrojaron bajas concentraciones. Esto nos sugiere que el ovario sería quien mantiene los niveles hormonales, particularmente de P4, para sostener la gestación. En este sentido, los bajos niveles de P4 placentaria sostienen la hipótesis previamente planteada por Jensen y col. (2008), que la generación de CL secundarios en la mitad de la gestación tendría como finalidad re-establecer los niveles de P4 para suplir una deficiencia placentaria. Asimismo, Heap (1981) midió los niveles de P4 séricos durante la gestación y observó que los niveles máximos de esta hormona en la vizcacha eran considerablemente menores a los observados en otros histricomorfos.

Otra característica inusual de *L. maximus* fue la presencia de “perlas” en la membrana extraembrionaria. Estas estructuras son conocidas en unas pocas especies. La naturaleza fibrosa y la ausencia de gránulos de glucógeno en las “perlas” hacen que sea difícil atribuir una función nutricional y descarta completamente la vinculación con un proceso patológico. Debido a esto, el término pústula que se ha empleado en las pocas especies que las presentan, puede llevar a la confusión al asociarlo con un proceso infeccioso y, en verdad, su presencia es parte de una gestación exitosa. Su aparición puede ser tenida en cuenta como un nuevo parámetro gestacional para la especie, ya que permite determinar la edad gestacional; su presencia indica una gestación mayor a 90 días. Si bien no se conoce la función de estas estructuras, su histología permitiría asociarlas con excrecencias mesodérmicas. Dentro de los roedores histricomorfos *L. maximus* y la rata de caña (*Thryonomys swinderianus*) (Oduor-Okelo and Gombe, 1982), son las únicas especies en las que se han descrito estas estructuras. Las excrecencias en el mesodermo de las membranas fetales han sido descritas en otras especies filogenéticamente no relacionadas como ser el elefante (Amoroso 1952; Amoroso y Perry, 1964), el eland (Oduor-Okelo, 1979), el cerdo hormiguero (*Orycteropus afer*) (Taverne, 1970) y el hipopótamo (Amoroso, 1952). Entre ellos, a su vez, estas excrecencias difieren en su localización. A diferencia de lo que ocurre en la vizcacha que presenta estas estructuras en el saco vitelino, pero el amnios y el cordón umbilical están libres de ellas, en estas especies no emparentadas se ubican en el amnios como “pústulas amnióticas”.

Simpson (1974) planteó que los roedores caviomorfos de América del Sur tuvieron su origen en el Eoceno de África y probablemente llegaron a Sudamérica cuando los continentes se separaron. El grupo de los histricomorfos sudamericanos (caviomorfos) pudo haberse establecido a partir de histricomorfos africanos llegados por el Océano Atlántico en el Mioceno (Hershkovitz 1972) o a finales del Eoceno (Pascual, 1996). La presencia de las

excrecencias mesodérmicas en *L. maximus* y el histicognato africano *Thryonomys swinderianus* se suma a otras características reproductivas compartidas entre ambas especies como la poliovulación y abogan en favor del origen africano de los caviomorfos sudamericanos (Addo y col., 2002).

7.2 Proceso de reabsorción embrionaria selectivo

En roedores, el primer signo de que ocurre una implantación es el aumento de permeabilidad vascular (Psychoyos, 1973). Al evaluar la implantación en la vizcacha mediante azul de tripán, se encontró que la decidualización se inicia primero en zonas más cercanas al cérvix continuándose a lo largo del cuerno uterino. Las zonas más cercanas al ovario son las últimas que pierden su permeabilidad vascular. A su vez, en estas zonas comenzaría la reabsorción embrionaria dado que al análisis histológico presentaron un avanzado proceso en el cual no se reconocían partes embrionarias mientras que en S2 se encontraron restos del saco vitelino con células inflamatorias. Esto nos permite suponer que la implantación ocurriría de manera progresiva desde S1 a S3.

En *L. maximus* LIF, que es un factor esencial que induce la receptividad uterina y permite la decidualización para producir la implantación (Chen y col. 2000), se expresó en las glándulas endometriales y no hubo diferencias en sus concentraciones entre las diferentes secciones uterinas ni dentro de la misma entre el lado Me y AMe; por lo que no se justificaría las pérdidas embrionarias en esta especie por concentraciones diferenciales de LIF.

VEGF se expresó en células que rodean la vasculatura en expansión, cumpliendo su función como factor angiogénico, aumentando la neovascularización del endometrio, post-decidualización, formando un lecho vascular (Neufeld y col., 1999; Vonnahme y col., 2001). Tampoco en este caso se encontraron diferencias entre los sectores uterinos que puedan influir en la reabsorción embrionaria.

L. maximus muestra una irrigación uterina ascendente desde el cérvix hacia las proximidades del ovario, provocando que las zonas más cercanas al cérvix sean las primeras en irrigarse. De esto se deduce que en un cuerno uterino preñado, el embrión más cercano al cérvix (Em1) es el que recibe sangre rica en nutrientes, hormonas, etc.

Los restantes embriones, los cuales serán reabsorbidos, son irrigados por otras ramas segmentares en una posición más ascendente. Esto concuerda con el hecho de que no se pudo realizar las angiografías en el estadio de preñez a término dado que ante la aplicación de contraste en S1 en el estadio anterior, preñez intermedia, se absorbía todo en la placenta de Em1 no permitiendo continuar el recorrido arterial hacia proximal del ovario. Este acontecimiento podría ser la representación de lo que sucede durante la gestación en la

nutrición de los embriones, donde todo lo que llega por vía sanguínea se consume mayormente en el embrión que termina su desarrollo con éxito.

La irrigación dada por la arteria uterina, rama de la arteria ilíaca, coincide con la estudiada en especies relacionadas como la chinchilla (Cevik-Demirkan y col. 2010) y el carpincho (Pradere y col 2006). La remodelación vascular en el tracto reproductor en cuanto al número y grosor de los vasos sanguíneos, en diferentes estadios reproductivos, sugiere como se ha reportado en otras especies (Céspedes y col., 2006; Pradere y col., 2006) que las hormonas esteroideas pueden jugar un papel importante en la organización vascular del aparato genital.

Al presentar una irrigación ascendente, se midió los niveles de P4 y E2 para detectar si realmente sucedía lo que se evidenció en la angiografía. La mayor concentración de P4 se encontró en el sector del cuerno uterino más cercano al cérvix donde implanta el único embrión que sobrevive y llega a término. Las vesículas que sufren reabsorción embrionaria presentaron concentraciones menores de E2 y P4. Además, durante la preñez intermedia se produce una pseudo-ovulación que genera cuerpos lúteos accesorios que tienen como efecto incrementar la P4 circulante (Dorfman y col., 2013; Fraunhoffer et al., 2017), precedida por un aumento de E2. Mossman y Duke (1973) sostienen que el fenómeno de poliovulación tiene como objetivo la producción de un abundante número de CL que en el caso de los roedores histicognatos garantiza probablemente cantidades importantes de P4 para mantener la gestación.

En el puercoespín africano (*Atherurus africanus*) está descrito que existe un período crítico a las 6 semanas de la gestación, en el cual se da un proceso de mortalidad embrionaria, que coincide con niveles bajos de P4 plasmática (Adjanohoun, 1988).

Los niveles hormonales de RIA in situ en el ovario muestran un descenso de P4 con un aumento de E2 que generaría el fenómeno de pseudovulación que, a su vez, permitiría la continuación del desarrollo de los embriones más cercanos al cérvix (Jensen y col., 2008). Por los niveles elevados de hormonas esteroideas encontrados in situ en ovario y los bajos niveles detectados en placenta como se mencionó previamente, es factible suponer que el ovario es el mayor responsable de mantener la preñez en la vizcacha.

Las vesículas embrionarias que sufren reabsorción en etapas tempranas de este proceso muestran muerte celular programada (MCP) con mayor marcación en comparación con el embrión que sobrevive. Si bien se conoce que la MCP es un proceso normal en la implantación de roedores y lagomorfos (Parr y col. 1987), una MCP exacerbada podría ser la causante de la reabsorción embrionaria. Se sabe que en condiciones patológicas se acompaña este fenómeno con necrosis (Formigli y col. 2000). En *L. maximus*, al análisis histológico en estadios más avanzados cuando ya no hay apoptosis se visualiza una zona hemorrágica, material fibrinoide, necrótico y células inflamatorias dentro de la vesícula. La

necrosis se genera cuando se alteran las condiciones fisiológicas tisulares como hipoxia o isquemia (Kufmann, 1997) donde participan los macrófagos que son activados por el IFN- γ . El material fibrinoide sería parte de la remodelación que sucede en las áreas de implantación como respuesta uterina para que se produzca la adhesividad del blastocisto (Sherman y col., 1978) durante la decidualización, pero ante la desorganización del trofoblasto se produce un exceso de su producción. Es de destacar la poca respuesta que presenta el endometrio frente a lo que sucede en su luz; no manifestó apoptosis incrementada como las vesículas a reabsorber, y a la histología solo mostró un crecimiento en forma de colgajos hacia la luz.

7.3 Modulación de la inmunología de la gestación de *L. maximus*

Para una gestación exitosa ha sido postulado que se requiere un balance Th1/Th2 fuertemente inclinado hacia la actividad Th2 que probablemente se genere por cambios hormonales (Holmes y col., 2003).

En la vizcacha, el proceso de reabsorción embrionaria no generó una respuesta sistémica dado que las fracciones de proteínas séricas evaluadas no presentaron variaciones durante este proceso. Por tanto, la pérdida de embriones se produciría por mecanismos locales en el cuerno uterino. Los cuernos uterinos presentaron niveles altos de IFN- γ , mostrando una respuesta inmunológica Th1 activa. Esta citocina tiene una función proinflamatoria y se considera que es perjudicial para el feto en altas concentraciones (Costeas y col., 2004). La prevalencia de la respuesta Th1 sobre la Th2 está asociada con tasas mayores de reabsorciones fetales y fallos en la implantación (Dealtry y col. 2000).

Por otra parte, los valores mínimos de IL-10 que se han detectado en los cuernos uterinos de vizcacha, coincidirían con que pertenece a una respuesta Th2 que sería inhibida por los altos valores de INF- γ . La presencia de INF- γ activaría a los macrófagos que realizarían la fagocitosis de las vesículas embrionarias que sufren la reabsorción (Ashkar y col. 2010).

En el humano, se ha estudiado que la prevalencia de la respuesta Th1 sobre la Th2 se asocia con tasas mayores de reabsorciones fetales y una acción citotóxica directa sobre el embrión (Reinhard y col. 1998), contrariamente a lo que sucede si se presenta un ambiente Th2 donde se contribuye a la implantación del embrión, desarrollo de la placenta y supervivencia del feto hasta el término de la gestación (Dealtry, 2000). La causa de la presencia de IFN- γ durante la preñez temprana de *L. maximus* podría estar asociada con la inmunomodulación hormonal durante la gestación. En humanos, se ha estudiado que el E2 y la P4 estimulan la producción de citocinas Th2, contribuyen a la tolerancia materna al promover la respuesta Th2 sobre la Th1 (Saito, 2010).

Los bajos niveles de P4 podrían no ser suficientes para realizar su efecto inmunomodulador no pudiendo generar la inmunosupresión para proteger al feto y en un descenso comprobado de P4, durante la gestación, se daría la secreción de citocinas de Th1 perjudiciales para el feto que al momento de generar los CL accesorios y dar un nuevo pico de P4 podría salvar al único feto más cercano al cérvix en cada cuerno uterino.

7.4 Mecanismo de ovulación: ¿espontánea o inducida?

Las especies domésticas han sido clasificadas de acuerdo a su mecanismo de ovulación en “ovuladores espontáneos” u “ovuladores inducidos” (Conaway, 1971). Diversos factores participan de la ovulación tales como ambientales, químicos y/o mecánicos (Vethranniam y col., 2010). La ovulación espontánea sucede en la mayoría de los roedores, primates y otros órdenes. En los animales con ovulación inducida, por ejemplo el conejo y el gato, el estímulo que libera GnRH está ligado a la cópula. En estos animales se han descrito espículas peneanas que serían los responsables de generar un estímulo mecánico sobre las paredes vaginales para que la hembra ovule.

Se ha sugerido que la vizcacha podría representar un estadio intermedio de ovulación espontánea/inducida (Rowlands y Weir, 1974). Sin embargo, el hallazgo de espículas peneanas en los machos de esta especie hace sospechar que es un animal con ovulación inducida por coito. Esta característica también son compartida con el histicognato africano *Thryonomys swinderianus*.

L. maximus presentó en la parte más distal de su pene un estilete de 3 cm de tejido cartilaginoso que le da rigidez al extremo. El largo del pene nos hace pensar que la cópula podría realizarse intracornual y “el codo” que une el estilete con el resto del pene podría ser el que contribuye a poder sortear el septum vaginal y alcanzar ambos cuernos uterinos.

El plasma seminal tiene propiedades anti-inflamatorias desencadenadas principalmente por la IL-8 e IL-10 (Denison y col., 1999). En las hembras que se han inseminado intracornual con homogenatos de próstata y conductos deferentes, previamente tratados con eCG y hCG, fueron los únicos animales en los que se detectaron niveles IL-8. El mayor nivel se presentó en el S1 diferenciado significativamente de los otros dos sectores uterinos (S2 y S3). Esto podría representar lo que sucede en el coito, donde si el macho deposita el semen intracornual en cada cérvix, el sector más cercano al cuello uterino contactaría con el plasma seminal. De esta manera podría presentar la citocina IL-8 pro-inflamatoria. Antiguamente, esta citocina se la relacionaba con procesos infecciosos en el tracto reproductivo del macho pero hoy se conoce que promueve la angiogénesis y que regula la

producción de proteínas de adhesión, funciones indispensables para que suceda una implantación exitosa (Harada y col. 1994).

El plasma seminal por mucho tiempo fue considerado un vehículo para transportar espermatozoides pero nuevos estudios aseguran que contiene un factor de ovulación inducida que puede ocasionar la ovulación al inyectarlo en la hembra, teniendo un efecto luteotrófico (Ratto Fuster, 2016).

En la actualidad, se está estudiando un rol de mayor importancia para el plasma seminal interviniendo en la inducción de la ovulación en diferentes especies (Tanco, 2008). Si bien se conoce, hoy en día, que la ovulación en el felino, por ejemplo, se realiza por un estímulo físico de las espículas peneanas, con estos nuevos experimentos realizados en especies con este tipo de ovulación como ser los camélidos sudamericanos surge el replanteo de un viejo paradigma: ¿Son las

espículas peneanas las que generan el estímulo mecánico que induce la ovulación? o la ovulación inducida por cópula es el plasma seminal el que se requiere para generar un estímulo químico que ocasione la ovulación. ¿Por qué ovulan algunas especies al inyectar IM plasma seminal?. Está comprobado que una fracción del plasma seminal induce la ovulación ya que contiene el factor inductor de ovulación (FIO) que es capaz de contribuir en la formación de un CL de características similares al que se forma en la cópula (Vásquez y col. 2008). El mecanismo de acción de FIO aún se desconoce.

En la vizcacha, la calidad de los oocitos liberados en cada ciclo estral es extremadamente baja, con altas tasas de alteraciones morfológicas y activación partenogénica espontánea (Willis, 2012). La gran mayoría de los oocitos son ovulados desnudos (sin cumulus) y transitan libremente por el oviducto y los cuernos uterinos. Este proceso se extiende por 3 días aproximadamente y en este lapso una pequeña población es ovulada como complejo cumulus-oocito, proponiéndose a ésta como una “eu-ovulación” apta para la fecundación, en medio de una eliminación masiva de oocitos inviábiles (Willis, 2012).

La inyección de plasma seminal IM en vizcacha provocó la ovulación. En los ovarios de los animales tratados con plasma seminal se encontraron CL con presencia de capilarización, no se evidenciaron restos de oocitos y las gametas femeninas obtenidas por lavado del oviducto se encontraron en complejos cumulus-oocito, con buena calidad oocitaria. Este hallazgo refuerza la idea de la existencia de una ovulación apta para la fecundación (eu-ovulación) de carácter inducible en medio de una liberación espontánea de oocitos de baja calidad no fecundables.

La presencia de espículas peneanas sumado a que la inyección de plasma seminal ocasiona la ovulación, permite suponer que *L. maximus* es una especie con ovulación inducida, aun cuando la eliminación masiva de oocitos con alteraciones morfológicas, activados y desprovistos de cúmulo, no aptos para la fecundación pueda ocurrir de manera

espontánea. Se ha postulado que los ovuladores espontáneos evolucionaron a partir de los ovuladores inducidos (Conaway, 1971); en este sentido, el carácter de ovulador inducido de la vizcacha se suma a las restantes características reproductivas ancestrales ya descritas para la especie.

8. CONCLUSIONES

Este trabajo ha revisado experimentalmente conceptos asociados al estudio del aparato reproductivo de *L. maximus* y particularmente del proceso de reabsorción embrionaria selectiva, abarcando el análisis de la inmunología en la preñez, que hoy es un campo en crecimiento aún en especies que han sido muy estudiadas en otros aspectos de su reproducción. Estas nuevas observaciones sobre el proceso fisiológico de reabsorción embrionaria en la especie hacen que a futuro pueda ser un buen modelo para estudios experimentales sobre pérdidas embrionarias.

Durante la realización de este trabajo se han implementado técnicas que hasta el momento no se habían aplicado en esta especie, como ser los estudios de diagnóstico por imagen (videoendoscopía, angiografía), el moldeado vascular con látex, el análisis seminal computarizado y la electroforesis con densitograma. Se ha diseñado y fabricado un electroeyaculador exclusivo para vizcacha que ha permitido incorporar nuevos conocimientos sobre el tipo de ovulación de esta especie. Tanto el diseño de un electroeyaculador específico como la puesta a punto del análisis seminal computarizado representa desarrollos transferibles que pueden mejorar y maximizar la producción comercial en criaderos de esta especie.

La profundización en el conocimiento histológico y ultraestructural del tracto reproductor de la hembra gestante y no gestante de *L. maximus* ha permitido establecer características propias y constitutivas no conocidas hasta ahora, como por ejemplo las células en clavo típicas del epitelio oviductal y las estructuras “perladas” de la membrana extraembrionaria.

La gran actividad detectada en el primer tercio de gestación conlleva a un envejecimiento precoz de la placenta que transcurre mediante un proceso de calcificación distrófica.

Se determinó que la decidualización y la reabsorción embrionaria son dos procesos que suceden a lo largo del cuerno uterino de manera diferida y en sentido inverso. La decidualización comienza desde las regiones más cercanas al cérvix y se extiende progresivamente hacia las regiones más próximas al ovario. Contrariamente, la reabsorción embrionaria comienza en las regiones más próximas al ovario y progresa hacia las regiones más distales al mismo.

El estudio anatomo-histológico permitió determinar la existencia de compartimentos del cuerno uterino que generan un microambiente particular para cada saco embrionario. Esto permite la coexistencia de un proceso de reabsorción junto al desarrollo embrionario normal sin que se afecten mutuamente.

Logró establecerse que la reabsorción embrionaria selectiva podría suceder debido a que hay un balance Th1/Th2 fuertemente inclinada hacia la respuesta Th1 que se la vincula con pérdidas embrionarias.

Finalmente el embrión implantado más cercano al cérvix que sobrevive, dada la trayectoria del sistema de irrigación vascular se encuentra nutricionalmente beneficiado pudiendo sobrellevar su desarrollo aún con una placenta altamente calcificada.

Por último, el hallazgo de espículas peneanas en el macho de *L. maximus* permitió establecer el probable carácter de ovulación inducida, aun cuando la eliminación masiva de oocitos con alteraciones morfológicas, activados y desprovistos de cúmulo, no aptos para la fecundación pueda ocurrir de manera espontánea.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. K. (2012). Migración del leucocito a los tejidos. Abbas, A. K.; Lichtman, A.H.H; Pillai, S. Inmunología celular y molecular. Elsevier. 3: 37-54.

Abe, H.; Hoshi, H. (2007). Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. *Reproduction in Domestic Animals*. 42: 292-298.

Addo, P.; Dodoo, A.; Adjei, S.; Awumbila, B.; Awotwi, E. (2002). Determination of the ovulatory mechanism of the grasscutter (*Thryonomys swinderianus*). *Animal Reproduction Science*. 71: 125-137.

Adjanooun E. (1988). Contribution au développement de l'élevage de l'aulacode (*Thryonomys swinderianus* TEMMINCK, 1927) et à l'étude de sa reproduction. Tesis. *Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort*.

Aguilar, J. J.; Cuervo-Arango, J.; Mouguelar, H.; Losinno, L. (2012). Histological characteristics of the equine oviductal mucosa at different reproductive stages. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32: 99-105.

Amoroso, E. C. (1952) Placentation. En: Parkes, A.S. (Ed.). *Marshall's Physiology of Reproduction*, Vol. 2. Boston: Little Brown and Co. pp. 127-311.

Amoroso, E. C.; Perry, J. S. (1964). The foetal membranes and placenta of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 248: 1-34.

Arias Stella, J. (2014). Cambios endometriales anormales producidos en la rata por estrógenos y hormona coriónica. *Anuales de la Facultad de Medicina*. 40: 457-472.

Arnold, E.N. (1984). Evolutionary aspects of tail shedding in lizards and their relatives. *Journal of Natural History*. 18: 127-169.

Arnold, S.; Hubler M.; Hauser R.; Kaser-Hotzt B.; Kusch P. (1996). Uterine Serosal Inclusion Cysts in a Bitch. *Journal of Small Animal Practice*. 37: 235-237.

Ashkar, A.; Di Santo, J.; Croy, B. (2010). Interferon-gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *The Journal of Experimental Medicine*. 192: 259-270.

Baker, T.G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 158: 417-433.

Baraño, R.I. (2009). Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva. XVI: 20-30.

Barkley, M.S.; Geschwind, I.I.; Bradford, G.E. (1979). The gestational pattern of Estradiol, Testosterone, and Progesterone Secretion in selected strains of mice. Biology of Reproduction. 20: 733-738.

Bazer, F. W.; Spencer, T.E.; Johnson, G.A.; Burghardt, R.C.; Wu, G. (2009). Comparative aspects of implantation. Reproduction. 138: 195-209.

Bianchi MS, Catalano PN, Bonaventura MM, Silveyra P, Bettler B, Libertun C; Lux-Lantos VA. (2004). Effect of androgens on sexual differentiation of pituitary gamma-aminobutyric acid receptor subunit GABA (B) expression. Neuroendocrinology. 80: 129-42.

Bonatelli M.; Carter A.M.; Machado M.R.F.; Oliveira M.F.; Lima M.C.; Miglino M.A. (2005). Placentation in the paca (*Agouti paca* L.). Reproductive Biology and Endocrinology. 3:1-12.

Borthwick, J.M.; Charnock-Jones, D.S.; Tom, B.D.; Hull, M.L.; Teirney, R.; Phillips, S.C.; Smith, S.K. (2003). Determination of the transcript profile of human endometrium. Molecular Human Reproduction. 9: 19-33.

Bosch, P.; Wright Jr, R. W. (2005) The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. Archivos de Medicina Veterinaria. 37: 95-105.

Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Branch, L. C.; Villarreal, D.; Fowler, G. S. (1993). Recruitment, dispersal, and group fusion in a declining population of the plains vizcacha (*Lagostomus maximus*; Chinchillidae). Journal of Mammalogy. 74: 9-20.

Cabrera, A. L. (1961) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". Ciencias Zoológicas. 4: 309-732.

Cabrera, A. L.; Yepes, J. (1960). Mamíferos sudamericanos. Buenos Aires: Ediar. 347 pp.

Carson, D.D. (2000). Embryo implantation. Developmental Biology. 223: 217-237.

CCAC. (2003). Guidelines on: the care and use of wildlife. National Academy Press. Ottawa. Canadá.

Cerro, J. A.; Pintar, J. E. (1997). Insulin-like growth factor binding protein gene expression in the pregnant rat uterus and placenta. *Developmental Biology*. 184: 278-295.

Céspedes, R.; Pradere, J.; Bermúdez, V.; Díaz, T.; Perozo, E.; Riera, M. (2006). Irrigación arterial y venosa del útero y los ovarios de la perra (*Canis familiaris*) y su relación con la actividad ovárica. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. 16: 353-363.

Cevik-Demirkam, A.; Ozdemir, V.; Demirkan I. (2010). The ovarian and uterine arteries in the chinchilla (*Chinchilla lanígera*). *Journal of the South African Veterinary Association*. 81: 54-57.

Chakraborty, I.; Das, S. K.; Wang, J.; Dey, S. K. (1996). Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *Journal of Molecular Endocrinology*. 16: 107-122.

Challis, J. R. G.; Heap, R. B.; Illingworth, D. V. (1971). Concentration of oestrogen and progesterone in the plasma of non-pregnant, pregnant and lactating guinea pigs. *Journal of Endocrinology*. 51: 333-345.

Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 168: 697-98.

Charif, S. E.; Inserra, P. I.; Di Giorgio, N. P.; Schmidt, A. R.; Lux-Lantos, V.; Vitullo, A. D; Dorfman, V. B. (2016). Sequence analysis, tissue distribution and molecular physiology of the GnRH preprogonadotrophin in the South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *General and Comparative Endocrinology*. 232: 174-184.

Chen, J. R.; Cheng, J. G.; Shatzer, T.; Sewell, L.; Hernandez, L.; Stewart, C.L. (2000). Leukemia Inhibitory Factor Can Substitute for Nidatory Estrogen and Is Essential to Inducing a Receptive Uterus for Implantation But Is Not Essential for Subsequent Embryogenesis. *Endocrinology*. 141: 4365-4372.

Conaway, C.H. (1971). Ecological adaptation and mammalian reproduction. *Biology of Reproduction*. 4: 239-247.

Costeas, P. A.; Koumouli, A.; Giantsiou-Kyriakou, A.; Papaloizou, A.; Koumas, L. (2004). Th2/Th3 cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. *Human Immunology*. 65:135-41.

Cuesta-Montero, L.; Belinchón, I. (2011). Conectivopatías y psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 102: 487-497.

Cullinan E. B.; Abbondanzo S. J.; Anderson P. S.; Pollard J. W.; Lessey B. A.; Stewart C. L. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potencial autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 93: 3115-3120.

De León Nava, M.A.; Morales Montor, J. (2006). Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2?. *Revista de Investigación Clínica.* 58: 161-169.

Dealtry, G. B.; O'Farrell, M. K.; Fernandez, N. (2000). The Th2 cytokine environment of the placenta. *International Archives of Allergy and Immunology.* 123: 107-119.

Dekel, N.; Gnainsky, Y.; Granot, I.; Mor, G. (2010). Inflammation and Implantation. *Journal of Reproductive Immunology.* 63: 17-21.

Denison F. C.; Grant, V. E.; Calder, A. A.; Rodney, W. K. (1999). Seminal plasma components stimulate interleukin-8 and interleukin 10 release. *Molecular Human Reproduction* 5: 220-226.

Dey, S.; Lim, H.; Das, S.; Reese, J.; Paria, B.; Daikoku, T.; Wang H. (2004). Molecular Cues to Implantation. *Endocrine.* 25: 341-373.

Dong, Y. L.; Gangula, P. R. R.; Yallampalli, C. (1996). Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *Journal of Reproduction and Fertility.* 107: 249-254.

Dorfman, V. B.; Fraunhofer, N.; Inserra, P. I. F.; Loidl, C. F.; Vitullo, A. D. (2011). Histological characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus of the South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Journal of Molecular Histology.* 42: 311-321.

Dorfman, V. B.; Saucedo, L.; Di Giorgio, N. P.; Inserra, P. I. F.; Fraunhofer, N.; Leopardo, N. P.; Halperin, J.; Lux-Lantos, V.; Vitullo, A. D. (2013). Variation in Progesterone Receptors and GnRH Expression in the Hypothalamus of the Pregnant South American Plains Vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). *Biology of Reproduction.* 89: 1-12.

Druckmann, R.; Druckmann, M. A. (2005). Progesterone and the immunology of pregnancy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 97: 389-396.

Espinosa, C. (2011). Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos. *Revista Veterinaria*. 22: 131-138.

Espinosa, M. B.; Fraunhoffer, N.; Leopardo, N.; Vitullo, A.; Willis, M. (2011). The ovary of *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia): an analysis by confocal microscopy. *Biocell*. 35: 37-42.

Felipe, A. E. (2006). Un modelo descriptivo del sistema reproductor hembra del coipo (*Myocastor coypus*) II: los órganos tubulares. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 1-19.

Flamini, M. A.; Barbeito, C. G.; Portiansky, E. L. (2014). A morphological, morphometric and histochemical study of the oviduct in pregnant and non-pregnant females of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Acta Zoologica*. 95: 186-195.

Flamini, M. A.; Portiansky, E. L.; Favaron, P. O; Martins D. S; Ambrosio, C. E.; Mess, A. M; Miglino, M. A.; Barbeito C. G. (2011). Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Acaviomorph rodent with natural polyovulation. Placenta*. 32: 963-968.

Flaws, J. A.; Hirshfield, A. N.; Hewitt, J. A.; Babus, J. K.; Furth, P. A. (2001) Effect of Bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*. 64: 1153-1159.

Flores Romo, L. (2001). *In vivo* maturation and migration of dendritic cells. *Immunology*. 102: 255-262.

Forabosco, A.; Sforza, C.; De Pol, A.; Vizzotto, L.; Marzona, L.; Ferrario, V.L. (1991). Morphometric study of the human neonatal ovary. *The Anatomical Record*. 231: 201-208.

Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G. E.; Capaccioli, S.; Orlandini, S. Z. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology*. 182: 41-49.

Fouladi-Nashta, A. A.; Jones, C. J. P.; Nijjar, N.; Mohamet, L.; Smith, A.; Chambers, I.; Kimber, S. J. (2005). Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Developmental Biology*. 281: 1-21.

Fraunhofer, N.; Jensen, C. F.; Leopardo, N. P.; Inserra, P. I. F.; Meilerman, A.; Espinosa, M. B.; Charif, S. E.; Dorfman, V. B.; Vitullo, A. D. (2017). Hormonal behavior correlates with follicular recruitment at mid-gestation in the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *General and Comparative Endocrinology*. 250: 162-174.

Gagioti, S.; Scavone, C.; Bevilacqua, E. (2000). Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. *Biology of Reproduction*. 62: 260-268.

Gardner, R. L. (1968) Mouse chimaeras obtained by injection of cells into the blastocyst. *Nature*. 220: 596-597.

Gázquez, A. (1991). *Patología Veterinaria*. Madrid: McGraw- Hill Interamericana. pp. 480.

Ginsburg, M.; Snow, M. H. L.; McLaren A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 110: 521-528.

Gonzalez, C. R.; Muscársel Isla, M. L.; Leopardo, N. P.; Willis, M. A.; Dorfman, V. B.; Vitullo, A. D. (2012). Expression of androgen receptor, estrogen receptors alpha and beta and aromatase in the fetal, perinatal, prepubertal and adult testes of the South American plains Vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). *Journal of Reproduction and Development* 58: 629-635.

Guzeloglu-Kayisli, O.; Basar, M.; Arici, A. (2007). Basic aspects of implantation. *Reproductive BioMedicine Online*. 15: 728-39.

Hafez, E. (1996). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. México: Interamericana McGraw-Hill. pp. 542.

Halperin, J.; Dorfman, V. B.; Fraunhofer, N.; Vitullo, A. D. (2013). Estradiol, progesterone and prolactin modulate mammary gland morphogenesis in adult female plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Journal of Molecular Histology*. 44: 299-310.

Hanna, N.; Hanna, I.; Hleb, M.; Wagner, E.; Dougherty, J.; Balkundi, D.; Padbury, J.; Sharma, S. (2000). Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *The Journal of Immunology*. 164: 5721-5728.

Harada, A.; Sekido, N.; Akahoshi, T.; Wada, T.; Mukaida, N.; Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 56: 559-64.

Heap, R. B.; Ackland, N.; Weir, B. J. (1981). Progesterone-binding proteins in plasma of guinea-pigs and other hystricomorph rodents. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63: 477-489.

Hernandez Divers, S. J. (2004). Small mammal endoscopy. En: Quesenberry, K. E.; Carpenter, J. W. (Eds). *Ferrets, Rabbits and rodents. Clinical medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 392-394.

Hershkovitz, P. (1972). The Recent mammals of the Neotropical Region: A zoogeographic and ecological review. En: Keast, A.; Erk, F. C.; Glass, B. (Eds). *Evolution, Mammals and Southern Continents*. Albany: State University of New York Press. pp. 311-431.

Hirschfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 121: 43-101.

Holmes, V.; Wallace, J.; Gilmore, W.; Mc Faul, P.; Alexander, H. (2003). Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: A longitudinal study. *Cytokine*. 21: 265-269.

Hood, J. D; Meininger, C. J.; Ziche, M.; Granger H. J. (1998). VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *American Journal of Physiology*. 274:1054-1058.

Hoozemans, D. A.; Schats, R.; Lambalk, C. B.; Homburg, R.; Hompes, P. G. (2004). Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reproductive BioMedicine*. 9: 692-715.

Hu, W.; Feng, Z.; Teresky, A. K.; Levine, A. J. (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*. 450: 721-724.

Hunt, J. S.; Petroff, M.G.; Burnett, T.G. (2000). Uterine leukocytes: key players in pregnancy. En *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press. 127-137.

Inoue, T.; Kanzaki, H.; Imai, K. (1996). Progesterone stimulates the induction of human endometrial CD56+ lymphocytes in an in vitro culture system. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81: 1502-1507.

Inserra, P. I.; Leopardo, N. P.; Willis, M. A.; Freysselinard, A. L.; Vitullo, A. D. (2014). Quantification of healthy and atretic germ cells and follicles in the developing and post-natal

ovary of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*: evidence of continuous rise of the germinal reserve. *Reproduction*. 147: 199-209.

Jackson, J. E.; Branch, L. C.; Villareal, D. (1996). *Lagostomus maximus*. *Mammalian Species*. 543: 1-6.

Jackson, J.E. (1986). Determinación de edad en la vizcacha (*Lagostomus maximus*) en base al peso del cristalino. *Vida Silvestre*. 1:41-44.

Jensen, F. C.; Willis, M. A.; Leopardo, N. P.; Espinosa, M. B., Vitullo, A. D. (2008). The ovary of the gestating South American plains viscacha (*Lagostomus maximus*): suppressed apoptosis and corpora lutea persistence. *Biology of Reproduction*. 79: 240-246.

Jensen, F.; Willis, M. A.; Albamonte, M. S.; Espinosa, M. B.; Vitullo, A. D. (2006). Naturally suppressed apoptosis prevents follicular atresia and oocyte reserve decline in the adult ovary of *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Reproduction*. 132: 301-308.

Jerzak, M.; Bischof, P. (2002). Apoptosis en la placenta humana durante el primer trimestre: papel para mantener el privilegio inmune en la superficie materno-fetal y en el remodelado del trofoblasto. *Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2: 142-146.

Kanashiro, C.; Santos, T. C.; Miglino, M. A.; Mess, A. M.; Carter, A. M. (2009). Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7: 57.

Kaufmann, H.S. (1997). Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. Academic Press. 640p.

King, A. (2000). Uterine leukocytes and decidualization. *Human Reproduction*. 6: 28-36.

King, A.; Gardner, L.; Loke Y. W. (1996). Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. *Human Reproduction*. 11: 1079-1082.

Koncurat, M.A. (2003). Estudio inmunoendócrino de la preñez porcina. Papel de la placenta. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Leavitt, W.W.; Blaha, G.C. (1970). Circulating Progesterone Levels in the Golden Hamster during the estrus cycle, Pregnancy, and Lactation. *Biology of Reproduction*. 3: 353-361.

Leopardo, N. P.; Jensen, F.; Willis, M. A.; Espinosa, M. B.; Vitullo, A. D. (2011). The developing ovary of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia,

Rodentia): Massive proliferation with no sign of apoptosis-mediated germ cell attrition. *Reproduction*. 141: 633-641.

Leopardo, N. P.; Vitullo, A. D. (2017). Early embryonic development and spatiotemporal localization of mammalian PGC-associated proteins in the basal rodent *Lagostomus maximus*. *Scientific Reports*. 7:594.

Lim, H.; Gupta, R. A.; Ma, W.; Paria, B. C.; Moller, D. E.; Morrow, J. D.; Dey, S. K. (1999). Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . *Genes & Development*. 13: 1561-1574.

Lim, H.; Paria, B. C.; Das, S. K.; Dinchuk, J. E.; Langenbach, R.; Trzaskos, J. M.; Dey, S. K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell*. 91: 197-208.

Llanos, A. C. y Crespo, J. A. (1952). Ecología de la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus Blainv.*) en el nordeste de la Provincia de Entre Ríos. *Revista de Investigaciones Agrícolas*. 6: 289-378.

Loke, Y. W.; King, A. (1996). Immunology of human implantation: an evolutionary perspective. *Human Reproduction*. 11: 283-286.

Maro, B.; Pickering, S. (1984). Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 84: 217-232.

Mess, A.; Denys, C.; Granjon, L.; Poulet, A. (2001). Evolutionary differentiation of placental organisation in hystricognath rodents. En: Denys C.; Granjon, L.; Poulet, A. (Eds). *African small mammals*. Paris: IRD Éditions, Collection Colloques et Séminaires. pp. 279-292.

Miyaura, H.; Iwata, M. (2002). Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *The Journal of Immunology*. 168: 1087-1094.

Mor, G.; Straszewski-Chavez, S. L.; Abrahams, V. M. (2006). Macrophage-trophoblast interactions. *Methods in Molecular Medicine*. 122: 149-163.

Mossman, H. W.; Duke, K. L. (1973). Comparative morphology of the mammalian ovary. Wisconsin: University of Wisconsin Press. pp. 461.

Muscarsel Isla, M. L. (2016). Rol de la proliferación y de la muerte celular en la dinámica testicular de dos modelos fisiológicos - reversible e irreversible - de alteración del epitelio seminífero. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Nasu, K.; Narahara, H.; Matsui, N.; Kawano, Y.; Tanaka, Y.; Miyakawa, I. (1999). Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction*. 5: 548-53.

National Institutes of Health. (1985). Health Research Extension Act of 1985, Public Law Animals in Research. Office of Laboratory Animal Welfare. Estados Unidos. 99-158.

National Institutes of Health. (2001). Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions.

Neufeld, G.; Cohen, T.; Gengrinovitch, S.; Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*.13: 9-22.

Novaro, V.; Gonzalez, E.; Jawerbaum, A.; Rettori, V.; Canteros, G.; Gimeno, M. F. (1997). Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reproduction, Fertility and Development*. 9: 557-564.

Oduor-Okelo, D. (1979). A study of the foetal membranes and placenta of the African cane rat (*Thryonomys swinderianus*), with some observations on the placentation in the elephant shrews-family macroscelididae. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 111: 191-196.

Oduor-Okelo, D.; Gombe, S. (1982) Placentation in the cane rat (*Thryonomys swinderianus*). *African Journal of Ecology*. 20: 49-66.

Owen, R. (1839). Notes on the anatomy of the viscacha (*Lagostomus trichodactylusbrookes*). *Proceedings of the Zoological Society of London*. 175.

Parr, E. L.; Tung, H. N.; Parr, M. B. (1987). Apoptosis as the Mode of Uterine Epithelial Cell Death during Embryo Implantation in Mice and Rats. *Biology of reproduction*. 36: 211-225.

Pascual, R. (1996). Late Cretaceous-Recent land-mammals. An approach to South American geobiotic evolution. *Mastozoología Neotropical*. 3: 133-152.

Peltier, M.R (2003). Immunology of term and preterm labor. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1:122.

Perona, R.M.; Wassarman, P.M. (1986). Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoctoderm. *Developmental Biology*. 114: 42-52.

Piccinni, M.; Giudizi, M.; Biagiotti, R.; Beloni, L.; Giannarini, L.; Sampognaro, S. (1995). Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *The Journal of Immunology*. 155: 128-133.

Plevyak, M.; Hanna, N.; Mayer, S.; Murphy, S.; Pinar, H.; Fast, L.; Sharma, S. (2002). Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile. *American Journal of Reproductive Immunology*. 47: 242-250.

Poole, J. A.; Claman, H. N. (2004). Immunology of pregnancy. Implications for the mother. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 26:161-170.

Pradere, J. D.; González, F. M.; Ruiz, E. A.; Correa, A. (2006). Anatomía del Útero y Ovarios del Capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*): Irrigación Arterial. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 47: 25-32.

Prasad, M. R. N.; Orsini, M. W.; Meyer, R. K. (1960). Nidation in progesterone-treated, estrogen-deficient hamsters, *Mesocricetus auratus* (Waterhouse). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 104: 48-51.

Psychoyos, A. (1973). Endocrine control of egg implantation. En: Greep, R. O.; Astwood, E. G.; Geiger, S. R. *Handbook of Physiology*, Vol. II, Part. 2. Washington: American Physiological Society. pp. 187-215.

Ratto Fuster, M. (2016). Luteotrophic effect of OIF/NGF in llamas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 24: 2.

Reinhard, G.; Noll, A.; Schlebusch, H.; Mallmann, P.; Ruecker, A.V. (1998). Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 245: 933-938.

Rezende, L. C; Kuckelhaus, S. A. S; Galdos-Riveros, A. C; Ferreira, J. R.; Miglino, M. A. (2013). Vascularization, morphology and histology of ovary in armadillo *Euphractus sexcinctus* (Linnaeus, 1758). *Archivos de Medicina Veterinaria*. 45: 191-196.

Roberts, C. M. y Weir, B. (1973). Implantation in the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 33: 299-307.

Roberts, C. M.; Perry, J. S. (1974). Hystricomorph Embryology. *Symposia of the Zoological Society of London*. 34: 333-360.

Rodrigues, R. F.; Carter, A. M.; Ambrósio, C. E.; Santos, T. C.; Miglino, M. A. (2006). The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine* L). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4: 1-31.

Rossant, J.; Cross, J.C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nature Reviews Genetics*. 2: 538-548.

Rowlands, I.W.; Weir, B.J. (1974). Reproductive characteristics of hystricomorph rodents. En: Rowlands, I. W.; Weir, B. J. (Eds). *The biology of hystricomorph rodents*. London: London Academy Press. pp. 265-301.

Runft, L.L.; Jaffe, L.A.; Mehlmann, L.M. (2002). Egg activation at fertilization: Where it all begins. *Developmental Biology*. 245: 237-254.

Saavedra Rodríguez, C. A. (2014). Estructura interna del área de distribución geográfica: el caso de la Guagua loba (*Dinomys branickii* Peters 1843). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Colombia.

Saito, S.; Nakashima, A.; Shima, T.; Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and regulatory T- cell paradigm in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*. 63: 601:610.

Sarkar M.; Ingole I.V.; Ghosh S.K.; Bhakta A.; Das R.S.; Tandale S. (2007). Calcification in placenta. *Journal of the Anatomical Society of India*. 56: 1-6.

Shen, M. M.; Leder, P. (1992). Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 8240-8244.

Sherman, M. I. (1978) Implantation of mouse blastocyst in vitro. En: Daniel, J. C. Jr (Ed). *Methods in Mammalian Reproduction*. New York: Academic Press. pp. 247-257.

Shweiki, D.; Itin, A.; Neufeld, G.; Gitay-Goren, H.; Keshet, E. (1993). Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 91: 2235-2243.

Silveyra, P.; Lux-Lantos, V.; Libertun, C. (2007). Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *American Journal of Physiology*. 293: 977-985.

Srivastava, M. D.; Thomas, A.; Srivastava, B. I.; Check, J. H. (2007). Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in

human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leukemia & Lymphoma*. 48: 1610-1617.

Steffl, M.; Schweiger, M.; Sugiyama, T.; Amselgruber, W. M. (2008). Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct. *Annals of Anatomy*. 190: 46-52.

Stewart, J. A.; Bulmer, J. N.; Murdoch, A. P. (1998). Endometrial leucocytes: expression of steroid hormone receptors. *Journal of Clinical Pathology*. 51: 121-126.

Szekeres-Bartho, J.; Polgar, B.; Kozma, N.; Miko, E.; Par, G.; Szereday, L. (2005). Progesterone-dependent immunomodulation. *Chemical Immunology and Allergy*. 89: 118-125.

Tanco, V. M. (2008). Biological characterization of ovulation-inducing factor (OIF) en llama seminal plasma. Tesis Master of Science Department of Veterinary Biomedical Sciences. Universidad de Saskatchewan.

Taverne, M. A. M.; Bakker-Slotboom, M. F. (1970). Observations on the delivered placenta and fetal membranes of the aardvark, *Orycteropus afer* (Pallas, 1766). *Bijdragen tot de Dierkunde*, 40: 154-162.

Vásquez, M. E.; Huanca, W.L.; Huanca, T. M.; Ratto, M. F.; Adams, G. (2008). Efecto de fracciones del plasma seminal, según su peso molecular, sobre la inducción de la ovulación en llamas (*Lama glama*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 19: 20-25.

Vermeulen, M. (2005). Inmunidad mediada por células T. Fainboim, L.; Geffner, J. *Introducción a la Inmunología humana*. Panamericana 235-260.

Vetharaniam, I; Peterson, A.; McNatty, K.; Soboleva, T. (2010). Modelling female reproductive function in farmed animals. *Animal Reproduction Science*. 122: 164-173.

Vives, A.; Balasch, J.; Yague, J.; Quinto, L.; Ordi, J.; Vanrell, J. A. (1999) Type-1 and Type-2 Cytokines and Human Decidual Tissue and Trophoblasts from Normal and Abnormal Pregnancies Detected by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *American Journal of Reproductive Immunology*. 42: 361-368.

Vonnahme, K. A.; Wilson, M. E.; Ford, S. P. (2001). Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biology of Reproduction*. 64: 1821-1825.

Wang, H.; Dey, S. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews. Genetics*. 7: 185-199.

Weir, B. J. (1970). The management and breeding of some more hystricomorph rodents. *Laboratory Animal*. 4: 83-97.

Weir, B. J. (1971a). The reproduce organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 25: 365-373.

Weir, B. J. (1971b). The reproductive physiology of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 25: 355-363.

Weir, B. J. (1971c). Some observations on reproduction in the female Green acouchi, *Myoprocta pratti*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 24: 193-201.

Weir, B. J.(1971d). Some observations on reproduction in the female agouti, *Dasyprocta aguti*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 24: 203-211.

Whitaker, M. (2006). Calcium at fertilization and in early development. *Physiological Reviews*. 86: 25-88.

Willis, M. A. (2012). Calidad y funcionalidad de las gametas femeninas en un modelo mamífero con poliovulación masiva y supresión de apoptosis folicular. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Wood, G. A.; Fata, J. E.; Watson, K. L.; Khokha, R. (2007). Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 133: 1035-1044.

Yoshida, S.; Kikuchi, A.; Sunagawa, S.; Takagi, K.; Ogiso, Y.; Yoda, T.; Nakamura, T. (2007). Pregnancy complicated by diffuse chorioamniotic hemosiderosis: Obstetric features and influence on respiratory diseases of the infant. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 33: 788-792.

10. ANEXOS

10.1 REGISTRO DEL PESO DE LAS PLACENTAS Y PESO Y MEDIDA DE LOS FETOS.

Animal	Peso de feto (g)	Peso placenta (g)	Feto (mm)
1	25.49	6.24	72.6
	18.34	5.89	67.5
2	19.28	6.01	66.4
	17.03	5.73	62.2
3	8.39	1.86	50.8
	8.18	2.01	50
4	18.9	5.83	68
	22	6.33	71.6
5	31.5	6.86	72.8
	23.85	5.61	73
6	2.22	1.05	27
	2.84	1.21	30.4
7	47.69	6.47	90.6
	48.24	8.52	92.4
8	70.54	11.52	105
	68.57	9.78	110.2
9	75.58	7.73	107.2
	77.52	9.08	111
10	63.91	8.41	94.7
	58.03	6.49	103.2
11	67.33	7.44	98

	59.41	7.84	99
12	76.56	6.29	112
	74.38	6.04	100.7
13	105.52	8.9	120.3
	107.83	8.76	123.9
14	97.95	8	120.3
	104.25	9.38	120.2
15	90.29	6.48	118.2
	86.37	7.61	119.4
16	97.08	7.27	125
	103.92	9.18	125.6
17	124.34	10	129.5
	87.76	7.02	119.3
18	166.52	10.41	147.6
	144.7	11.88	167.84
19	160.65	12.21	136.2
	140.27	12.98	132.8
20	229.75	15.11	155.8
	202.93	14.16	150
21	124	12.15	207
	220	8.98	130
22	83.18	7.83	101
	87.56	8.02	100
23	85.04	6.03	103
	84.64	7.24	100

24	104.43	13.64	107
	119.1	13.9	111
25	89.97	8.48	105
	83.14	7.58	105
26	93.35	8.72	110
	114.9	10.25	121
27	127.72	8.03	125
	135.3	8.04	122
28	133.71	14.68	122
	137.06	14.1	121
29	25.8	14.15	80
	27.5	12.21	75
30	19.65	10.7	65
	19.55	10.14	68
31	18.51	9	70
	21.2	15.03	68
32	13.89	14.81	61
	14.15	9.33	61
33	22.34	12.71	67
	23.53	14.22	68
34	59.8	14.61	100
	65	17.48	95