

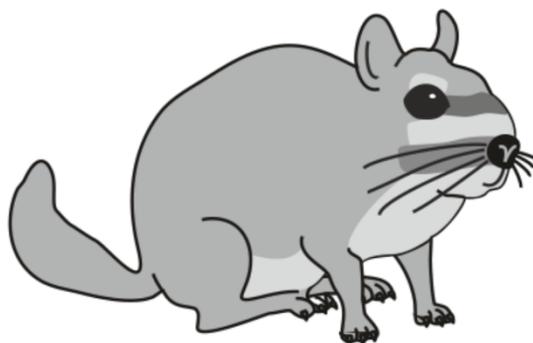


Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias



TESIS DOCTORAL

Origen de la muerte embrionaria espontánea en un modelo natural: *Lagostomus maximus* (vizcacha de llanura)



Requisito para acceder al título de posgrado

Doctor en Ciencias Veterinarias

Francisco Acuña
Licenciado en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada, FCV-UNLP
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, CCT - La Plata

Directora: Prof. Dra. Mirta A. Flamini (FCV-UNLP)
Co-Directora: Prof. Dra. María A. Miglino (FMVZ-USP)

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

“Origen de la muerte embrionaria espontánea en un modelo natural: *Lagostomus maximus* (vizcacha de llanura)”

Trabajo de tesis realizado para optar al título Doctor en Ciencias Veterinarias

Francisco Acuña
Licenciado en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Directora

Prof. Dra. Flamini, Mirta Alicia

Co-Directora

Prof. Dra. Miglino, María Angélica

Miembros del Jurado

Dra. Machuca, Mariana

Dr. Lombardo, Daniel

Dra. dos Santos Martins, Daniele

AGRADECIMIENTOS

A Claudio, mi maestro, por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación y, luego, darme la oportunidad en dar continuidad a la docencia universitaria. Por acompañarme en cada momento, responder mis curiosidades, ayudarme a pensar, condensar ideas y, también, sus anécdotas.

A Alicia, que estando cerca de su jubilación, me aceptó, guió, ayudó y acompañó en cada momento.

A María Angelica, por aceptar ser mi codirectora de tesis, su calidez y enseñanzas.

A Enrique, por sus enseñanzas y palabras de apoyo.

A mis jurados, Daniel, Mariana y Daniele, por cada comentario que condujo a fortalecer esta tesis de posgrado.

Al Dr. Anthony Carter, por los artículos científicos compartidos y la ayuda en la identificación de la mesoplacenta.

A mi madre Silvia y hermano Joaquín.

A mis tíos Pedro y Guillermo.

A mi abuela Coca y abuelo Pedro, mis referentes en calidez, humildad, responsabilidad y respeto.

A mis amistades de Carhué, Bahía Blanca y La Plata, por el cariño y los momentos compartidos.

A Martín, por su amor y compañía en cada momento.

A mis colegas de docencia e investigación por lo compartido.

Al CONICET por haberme otorgado una beca doctoral para este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional de La Plata por darme el espacio físico para ejercer dos grandes pasiones como la investigación y la docencia.

A mis estudiantes, con quienes siempre disfruto cada momento.

A la universidad pública, de calidad e inclusiva.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados parcialmente en congresos y, posteriormente, publicado en revistas científicas, tanto nacionales como internacionales. Además, se recibieron dos premios (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos y Sociedad Argentina de Patología Veterinaria, en el marco de los eventos Jornadas Argentinas de Mastozoología y Reunión Argentina de Patología Veterinaria) y un subsidio para jóvenes investigadores (UNLP).

Publicaciones en congresos científicos nacionales e internacionales

Año 2017

Acuña F, Tano de la Hoz MF, Díaz AO, Portiansky EL, Barbeito CG & Flamini MA. 2017. Estudio histoquímico de la zona pelúcida de folículos ováricos de vizcachas de llanura preñadas y no preñadas. XXX Jornadas Argentinas de Mastozoología. Publicado en libro de resúmenes SAREM, pág 127. 13-17/11/2017, Bahía Blanca, Arg.

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL & Flamini MA. 2017. Resorciones embrionarias en *Lagostomus maximus*: estudio lectinohistoquímico preliminar. XXX Jornadas Argentinas de Mastozoología. Publicado en libro de resúmenes SAREM, pág 128. 13-17/11/2017, Bahía Blanca, Arg.

Año 2018

Acuña F, Barbeito CG & Flamini MA. 2018. Expresión de residuos glicosídicos endometriales en *Lagostomus maximus* (vizcacha de llanura). XXXI Jornadas Argentinas de Mastozoología. Publicado en libro de resúmenes SAREM, pág 80. 23-26/10/2018, La Rioja, Arg.

Acuña F, Barbeito CG & Flamini MA. 2018. Morfometría de las implantaciones viables y las reabsorciones embrionarias de la vizcacha de llanura: *Lagostomus maximus* (Rodentia, Hystricognathi). XXXI Jornadas Argentinas de Mastozoología. Publicado en libro de resúmenes SAREM, pág 81. 23-26/10/2018, La Rioja, Arg.

Acuña F, Barbeito CG & Flamini MA. 2018. Estudio histoquímico a lo largo de los cuernos uterinos de vizcachas de llanura (*Lagostomus maximus*) no preñadas. XX Congreso de Ciencias Morfológicas y 17 Jornadas de Educación. Publicado en libro de resúmenes, pág 34. 25-26/10/2018, La Plata, Arg.

Acuña F, Nishida F, Barbeito CG & Flamini MA. 2018. Histometría de los cuernos uterinos de la vizcacha de llanura, *Lagostomus maximus*. XX Congreso de Ciencias Morfológicas y 17 Jornadas de Educación. Publicado en libro de resúmenes, pág 34. 25-26/10/2018, La Plata, Arg.

Año 2019

Acuña F, Barbeito CG, Ranea G, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2019. Natural embryonic death in the plains viscacha *Lagostomus maximus*: are there previous anatomo-histological variations that would intervene in the differential survival of the implantation? International Federation of Placenta Associations 2019 (IFPA2019) and 8th Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (VIII SLIMP). Published in *Placenta* 83, page e25. 10-13/09/2019, CABA, Arg.

Acuña F, Barbeito CG, Nishida F, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2019. Role of the uterine glands in the early death of mammals using natural model: the plains viscacha *Lagostomus maximus* (Rodentia, Chinchillidae). International Federation of Placenta Associations 2019 (IFPA2019) and 8th Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (VIII SLIMP). Published in *Placenta* 83, page e29. 10-13/09/2019, CABA, Arg.

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2019. Uterine vascularization in *Lagostomus Maximus*: Implications for embryonic survival. Xth Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. Publicado en libro de resúmenes, pág xx. 28-31/10/2019, CABA, Arg.

Acuña F, Ranea G, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2019. Ultrasonographic characterization of implantations in a physiological embryonic death model: *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia, Histricongnathi). Xth Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology. Publicado en libro de resúmenes, pág xx. 28-31/10/2019, CABA, Arg.

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2019. *Lagostomus maximus*, un modelo de supervivencia embrionaria diferencial en mamíferos: implicancias del histotrofo. XXXI Jornadas Argentinas de Mastozoología. Publicado en libro de resúmenes SAREM, pág 91. 12-15/11/2019, Puerto Madryn, Arg.

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2019. Expresión de los receptores de estrógeno- α y progesterona en el útero no grávido de *Lagostomus maximus* y su relación con la muerte embrionaria fisiológica. XXXI Jornadas Argentinas de Mastozoología. Publicado en libro de resúmenes SAREM, pág 279. 12-15/11/2019, Puerto Madryn, Arg.

Año 2020

- Acuña F**, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2020. El potencial rol de las glándulas uterinas y la vascularización durante el desarrollo embrionario temprano de *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Publicado en libro de resúmenes, pág 213. 9-15/09/2020, Mendoza, Arg. Modalidad: virtual.
- Acuña F**, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2020. Caracterización macro y microscópica de la gestación temprana de *Lagostomus maximus* y su relación con la muerte embrionaria. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Publicado en libro de resúmenes, pág 213-214. 9-15/09/2020, Mendoza, Arg. Modalidad: virtual.
- Acuña F**, Carril J, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. 2020. Glicotipo placentario de *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviidae): análisis lectinohistoquímico y evolutivo dentro de los euteria. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Publicado en libro de resúmenes, pág 214. 9-15/09/2020, Mendoza, Arg. Modalidad: virtual.
- Acuña F**, Flamini MA & Barbeito CG. 2020. Origen de la muerte embrionaria espontánea en un modelo natural: *Lagostomus maximus* (vizcacha de llanura). Encuentro de Becarios UNLP 2020. Publicado en: <https://congresos.unlp.edu.ar/ebec2020/becarie/francisco-acuna/> 12/11/2020, La Plata, Arg. Modalidad virtual, asincrónico.

Año 2021

- Acuña F**, Barbeito CG, Portiansky EL, Ranea G, Miglino MA & Flamini MA. Heterogeneidad uterina, poli-implantación y muerte embrionaria temprana y fisiológica en *Lagostomus maximus*, un caso único entre los mamíferos euterios. X Jornadas de Jóvenes Investigadores. 3-4/06/2021, FCV-UBA, CABA, Arg. Modalidad Virtual.
- Acuña F**, Cristofolini A, Barbeito CG, Portiansky EL, Merkis C, Miglino MA & Flamini MA. Estudio del útero del roedor poliovular *Lagostomus maximus* mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica de alta resolución. Jornadas Internacionales Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. 25-27/08/2021. CABA, Arg. Modalidad virtual.
- Acuña F**, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. Muerte embrionaria espontánea en *Lagostomus maximus*. 11-14/10/2021. XII Reunión Argentina de Patología Veterinaria, 14º Seminario de la Fundación C.L. Davis - S.W. Thompson. INTA Balcarce, Arg. Modalidad virtual.

Publicaciones en revistas científicas internacionales

Año 2019

Acuña F, Tano de la Hoz MF, Díaz AO, Portiansky EL, Barbeito CG & Flamini MA. (2019). Histochemistry of the zona pellucida of the ovary of a species with natural polyovulation: *Lagostomus maximus* (Rodentia, Hystricomorpha, Chinchillidae). *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 207–215. <https://doi.org/10.1111/rda.13333>

Año 2020

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL, Ranea G, Nishida F, Miglino MA & Flamini MA. (2020). Early and natural embryonic death in *Lagostomus maximus*: Association with the uterine glands, vasculature, and musculature. *Journal of Morphology*, 281(7), 710–724. <https://doi.org/10.1002/jmor.21127>

Año 2021

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL, Miglino MA & Flamini MA. (2021). Prenatal development in *Lagostomus maximus* (Rodentia, Chinchillidae): A unique case among eutherian mammals of physiological embryonic death. *Journal of Morphology*, 282(5), 720–732. <https://doi.org/10.1002/jmor.21341>

Barbeito CG, **Acuña F**, Miglino MA, Portiansky EL & Flamini MA. (2021). Placentation and embryo death in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Placenta*, 108, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.03.006>

Acuña F, Barbeito CG, Miglino MA, Ranea G, Nishida F, Portiansky EL & Flamini MA. Estudio de la muerte embrionaria en mamíferos a través de un modelo no convencional: *Lagostomus maximus*, vizcacha de llanura (Rodentia, Chinchillidae). *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, LXXIV (74): 1-9.

Acuña F, Barbeito CG, Portiansky EL, Ranea G, Miglino MA & Flamini MA. Spontaneous embryonic death in *Lagostomus maximus* (Rodentia) among other eutherian mammals, as a species with unique reproductive characteristics. Bajo revision.

Premios

- Premio “Osvaldo Reig” para estudiantes doctorales otorgado por la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos al miembro de la sociedad Francisco Acuña, en el marco de las Jornadas Argentinas de Mastozoología, La Rioja, 2018. Proyecto: “Muerte embrionaria espontánea en mamíferos, especie modelo: *Lagostomus maximus* (vizcacha de llanura)”.
- Premio 1^{ra} mención al trabajo Muerte embrionaria espontánea en *Lagostomus maximus*. autores: **Acuña F**, Barbeito CG, Portiansky EL, Merkis C, Miglino MA & Flamini MA. 11-14/10/2021. XII Reunión Argentina de Patología Veterinaria, 14^o Seminario de la Fundación C.L. Davis - S.W. Thompson. INTA Balcarce, Arg. Modalidad virtual.

Subsidios

- Subsidio de Jovenes Investigadores otorgado por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata. Convocatoria 2019, categoría Ciencias Naturales, beneficiario Francisco Acuña. Proyecto: “Rol del LIF (Leukemia Inhibitory Factor) durante la preñez temprana en un modelo natural de muerte embrionaria”.

RESUMEN

En la década del 70, Barbara Weir describió las características del sistema reproductor de la hembra de *Lagostomus maximus*, vizcacha de llanura, como así también ciertos eventos reproductivos y gestacionales como la poliovulación de 200-800 ovocitos/estro y la muerte embrionaria de múltiples implantaciones (las ubicadas en los segmentos craneales y medias de los cuernos uterinos) a partir de los 26 dpc. Esta autora concluyó que la muerte embrionaria no se debía a factores endógenos (diferencias morfológicas, vasculares, y superfetación) o exógenos (agentes etiológicos). A partir del año 2000 se realizaron estudios morfológicos y endocrinológicos con la finalidad de comprender con mayor profundidad dicho evento. A partir de los resultados preexistentes, se desarrolló esta tesis doctoral con el fin de investigar el origen de la muerte embrionaria espontánea en *L. maximus*. Para ello, se diseñó un estudio cuya hipótesis fue “existen diferencias morfológicas y moleculares en las distintas porciones de los cuernos uterinos de la vizcacha que determinan la supervivencia de aquellas implantaciones más próximas al cuello uterino”. Los resultados obtenidos a partir de la metodología planteada corroboran la hipótesis. Las similitudes en la morfología microscópica de los segmentos uterinos sin preñez en aspectos como la expresión de los glicoconjugados, los residuos glicosídicos, los marcadores de renovación celular y los receptores hormonales demuestran la capacidad del órgano en permitir la implantación en toda su extensión. Sin embargo, se observan diferencias significativas en cuanto al espesor de la pared uterina y sus tunicas, y en las áreas glandular y vascular a lo largo del eje craneocaudal que podrían relacionarse con las diferencias regionales uterinas en la posibilidad de permitir la continuidad de la preñez. Estas similitudes y diferencias se mantienen en las hembras con implantaciones tempranas, en donde además se encuentra que el sitio de implantación caudal de cada cuerno

tiene un aspecto viable, lo que no ocurre en el craneal y el medio que se caracterizan por la presencia de infiltración leucocitaria, hemorragia y depósito de fibrina. Por su parte, en las hembras con gestación intermedia se observaron mayores diferencias en el estado de las implantaciones. Algunas de estas características, como la desorganización y la desintegración tisular, actuarían como DAMPs, promoviendo una respuesta inflamatoria esteril en la que hay infiltración neutrofílica, mastocitos, macrófagos, células gigantes de cuerpo extraño y fibrosis. Por otro lado, los estudios amplían las características del desarrollo prenatal de la vizcacha, siendo algunas de ellas exclusivas para los histricomorfos. Por otro lado, se describen nuevas estructuras como la mesoplacenta.

De esta manera, se concluye que los cuernos uterinos de *L. maximus* presentan aspectos heterogéneos en su sentido craneocaudal a diferentes niveles de organización, y que estas diferencias son, al menos parcialmente, las causantes del origen de la muerte embrionaria espontánea y sectorizada de la especie. Si bien la muerte embrionaria espontánea es un evento reproductivo conservado entre los diferentes taxones de mamíferos, en ninguno de ellos se observa la masividad y la sectorización presente en *L. maximus*. En consecuencia, esta especie representa un modelo no convencional de muerte embrionaria espontánea, cuyas características permiten el diseño de múltiples estudios para comprender la biología reproductiva de otras especies con este tipo de muerte, como así también enfermedades relacionadas con la preñez, principalmente, durante periodos tempranos.

Palabras claves: Mamíferos, Roedores, Reproducción, Muerte embrionaria espontánea.

ABSTRACT

In the 1970s, Barbara Weir described the characteristics of the female reproductive system of *Lagostomus maximus*, plains viscacha, as well as certain reproductive and gestational events such as poliovulation of 200-800 oocytes / estrus and embryonic death from multiple implantations (those located in the cranial and middle segments of the uterine horns) from 26 dpc. At that time and with fewer techniques than the current ones, this author concluded that this embryonic death was not due to endogenous factors (morphological and vascular differences, and superfetation) or exogenous (etiological agents). Since 2000, morphological and endocrinological studies have been carried out in order to understand this event in greater depth. Consequently, and starting from the pre-existing results, this doctoral thesis was developed in order to investigate the origin of spontaneous embryonic death in *L. maximus*. So, a study was designed whose hypothesis was “there are morphological and molecular differences in the different portions of the uterine horns of the viscacha that determine the survival of those implantations closest to the cervix”. The results obtained from the proposed methodology corroborate the hypothesis. The similarities in the microscopic morphology of the uterine segments without pregnancy in aspects such as the expression of glycoconjugates, glycosidic residues, cell renewal markers, and hormone receptors demonstrate the organ's ability to allow implantation to its full extent. However, significant differences are observed in terms of the thickness of the uterine wall and its tunics, and in the glandular and vascular areas along the craniocaudal axis that could be related to regional uterine differences in the possibility of allowing pregnancy to continue. These similarities and differences are maintained in females with early implantations, where it is also found that the caudal implantation site of each horn has a viable appearance, which does not

occur in the cranial and the middle, which are characterized by the presence of infiltration leukocyte, hemorrhage, and fibrin deposition. On the other hand, in females with intermediate gestation, greater differences were observed in implantation status. Some of these characteristics, such as tissue disorganization and disintegration, would act as DAMPs, promoting a sterile inflammatory response in which there is neutrophilic infiltration, mast cells, macrophages, foreign body giant cells, and fibrosis. On the other hand, the studies broaden the characteristics of the prenatal development of the viscacha, some of them being exclusive for histricomorphs. On the other hand, new structures such as the mesoplacenta are described.

In this way, it is concluded that the uterine horns of *L. maximus* present heterogeneous aspects in their craniocaudal axis at different levels of organization, and that these differences are, at least partially, the cause of the origin of the spontaneous and sectorized embryonic death of the species. Although spontaneous embryonic death is a conserved reproductive event among the different mammalian taxa, the massiveness and sectorization present in *L. maximus* is not observed in any of them. Consequently, this species represents an unconventional model of spontaneous embryonic death, whose characteristics allow the design of multiple studies to understand the reproductive biology of other species with this type of death, as well as diseases related to pregnancy, mainly during periods early.

Keywords: Mammals, Rodents, Reproduction, Spontaneous embryonic death.

INDICE	Páginas
---------------	----------------

<u>CAPÍTULO I</u>	1
--------------------------	----------

Introducción

- a. Reproducción en mamíferos
- b. Ontogenia prenatal del sistema reproductor de la hembra
- c. Morfología del sistema reproductor de la hembra en mamíferos euterios
- d. Fisiología del sistema reproductor de la hembra en mamíferos euterios
- e. Generalidades del desarrollo embrionario temprano en mamíferos euterios
- f. *Lagostomus maximus*, sistemática y ecología
- g. Reproducción de *Lagostomus maximus*

Hipótesis**Objetivos**

<u>CAPÍTULO II</u>	72
---------------------------	-----------

Materiales y métodos

- a. CICUAL
- b. Obtención de muestras
- c. Analgesia y anestesia
- d. Ultrasonido
- e. Necropsia
- f. Observación macroscópica
- g. Procesamiento histológico
- h. Coloraciones histológicas clásicas y especiales
- i. Histoquímica
- j. Lectinhistoquímica
- k. Inmunohistoquímica
- l. Morfometría
- m. Microscopia óptica

- n. Microscopía óptica de alta resolución
- o. Microscopía electrónica de barrido
- p. Análisis estadístico

CAPÍTULO III **98**

Estudios en úteros de hembras no preñadas

- a. Introducción
- b. Materiales y métodos
- c. Resultados
- d. Discusión

CAPÍTULO IV **123**

Estudios en sitios de implantación de hembras con preñez temprana

- a. Introducción
- b. Materiales y métodos
- c. Resultados
- d. Discusión

CAPÍTULO V **149**

Estudios preliminares en hembras con gestación intermedia

- a. Introducción
- b. Materiales y métodos
- c. Resultados
- d. Discusión

CAPÍTULO VI **173**

Conclusiones

Consideraciones finales

Referencias bibliográficas

CAPÍTULO I

Introducción

a. Reproducción en mamíferos

La clase Mammalia comprende a un grupo diverso de organismos en cuanto a su morfología, fisiología y reproducción (Behringer y col., 2006), como consecuencia de una historia evolutiva extensa y compleja. Es así, que los mamíferos presentan diferentes estrategias en la reproducción de la hembra necesarias para la continuidad de la vida, la preservación de la especie y la transmisión de variaciones de una generación a la siguiente (Hayssen y Orr, 2017; Flaws y Spencer, 2018; William y Johnston, 2018). Los mamíferos se clasifican en dos grupos: Prototheria (monotremas) y Theria. A su vez, los Theria se subdividen en Metatheria (marsupiales) y Eutheria (euterios). Por lo tanto, los mamíferos comprenden a: Prototheria (monotremas), Metatheria (marsupiales) y Eutheria (euterios) (Behringer y col., 2006; Ferner y col., 2017) (Figura 1). Esta clasificación se basa en las diferencias del desarrollo pre y postnatal, las características y la duración de la preñez, el parto, la lactancia, y las características morfológicas y fisiológicas del sistema reproductor de la hembra (Renfree y Shaw, 2001; Murphy, 2012; Guernsey y col., 2017; Renfree y Fenelon, 2017; Frankenberg, 2018).

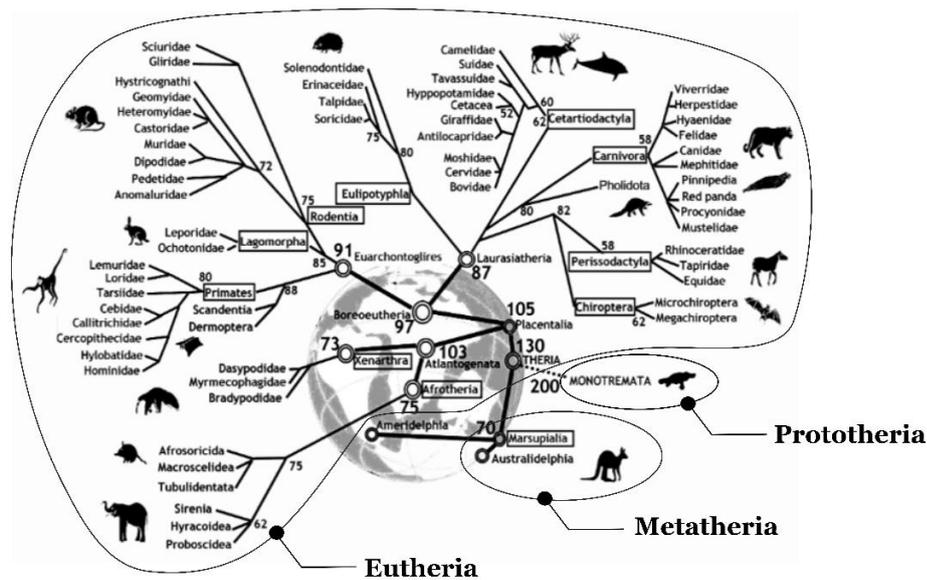


Figura 1. Los tres linajes de Mammalia: Prototheria, Metatheria y Eutheria. Imagen extraída y modificado de Graphodatsky, y col., 2011.

Los monotremas tienen una gestación corta de 15 a 21 días después de la ovulación (Griffith y col., 2017), son ovíparos, y el huevo contiene un embrión en estadio somítico (neurulación) que se nutre a partir de las grandes cantidades de vitelo que posee (Behringer y col., 2006). La hembra ovipone en un lugar propicio e incuba a los huevos durante el último tercio del desarrollo embrionario (Ferner y col., 2017). Posteriormente, en la post-eclosión, las crías altriciales¹ continúan su desarrollo a expensa de los nutrientes que incorporan de la leche (Grant 1989; Griffith 1989; Mate y col., 2000; Ferner y col., 2017). En cuanto al sistema reproductor de la hembra, este consta de dos cuernos uterinos que se abren directamente al seno urogenital. En proximidad a estas aberturas se encuentran las correspondientes a los uréteres. Otra característica exclusiva del sistema

¹ Altricial: en mamíferos, neonato que al momento del parto se encuentra desnudo, con ojos cerrados, estado relativamente indefenso y, a menudo, permanece en el mismo sitio del parto para el cuidado de sus progenitores durante un período posnatal especie-específico (Ferner y col., 2017).

reproductor de la hembra de este clado es la ausencia de una vagina (Griffith 1968, 1978; Taggart y col., 1998; Temple-Smit y Grant, 2001).

Los marsupiales y euterios son vivíparos. Los embriones tienen un desarrollo intrauterino que depende de las placentas coriovitelina y corioalantoidea. Los marsupiales al igual que los monotremas tienen una descendencia con una altricialidad extrema, cuya morfología externa recuerda, en algunas características, al de los embriones de los euterios, por lo que requieren de una gran protección en las primeras fases de la etapa posnatal (Ferner y col., 2017). La gestación en los marsupiales ocurre en el útero, pero el desarrollo de los neonatos se continúa en el interior del marsupio (Edwards y Deakin, 2012) y su nutrición es mediante una lactación muy característica (Behringer y col., 2006). Luego de la unión entre el pezón de la hembra y la región bucal del neonato, ambos se fusionan. Esta fusión se produce como consecuencia de que el pezón se hincha dentro de la cavidad bucal y, posteriormente, se fusiona con la región oral mediante una membrana queratinizada, el *epitricum*, que también cubre los ojos y oídos para protegerlos. El *epitricum* desaparece al avanzar el desarrollo. Para que el neonato pueda succionar y respirar simultáneamente, tanto la cavidad nasal como la lengua están muy diferenciadas. El desarrollo del cráneo de los marsupiales en los primeros años de vida está influenciado por los requisitos funcionales que surgen de esta lactación particular. Algunos estudios sobre el desarrollo han demostrado que, como adaptación a la succión, se acelera el ritmo relativo del desarrollo de los huesos y la musculatura de las regiones oral y facial. El desarrollo anterior de la región oral y el complejo comportamiento de amamantamiento llevaron a considerar que esta región está particularmente restringida en los marsupiales (Spiekman y Werneburg, 2017). Goswami y col., (2016) cuantificaron la ontogenia craneal utilizando un análisis de trayectoria fenotípica para comparar la disparidad en el desarrollo craneal entre marsupiales y euterios con una

profundización especial en la región oral. Demostraron que el desarrollo de los huesos de esta región está restringido en los marsupiales en comparación con los euterios, y que guarda relación con el amamantamiento. La composición química de la leche varía entre los marsupiales e incluso durante la lactancia de cada especie. Esta secreción no solo aporta nutrientes sino también factores humorales y celulares, estos últimos resultan relevantes ya que en los neonatos no se genera respuesta inmune hasta un tiempo después del nacimiento (Stannard y col., 2020). Además, los metaterios presentan un complejo vaginal que está dividido en tres sectores, dos laterales y uno medio. Los laterales se abren al seno urogenital, y en este también se vierte la orina desde la uretra, ya que a diferencia de lo que ocurre en monotremas los uréteres desembocan en una vejiga desde la que sale la uretra. Los sectores laterales están relacionadas con el pene bífido del macho y, por lo tanto, con el proceso de cópula; en cambio, la vagina media es parte del canal de parto (Tyndale-Biscoe y Renfree, 1987; Wick y Kress, 2002; Schimming y col., 2018). En los euterios, al igual que en los marsupiales, la gestación ocurre en el útero, e implica una mayor interacción entre este órgano y el embrión durante la placentación (Wagner, 2018). El desarrollo temprano de los euterios implica una fijación e implantación más temprana del blastocisto, a diferencia de lo que ocurre en monotremas y marsupiales. Por otro lado, el útero de los euterios es el sitio del desarrollo prenatal. Luego del tiempo de gestación especie-específico, nacen crías altriciales o precociales² (Ferner y col., 2017), cuyo desarrollo posnatal es mayor en comparación con las crías de los marsupiales. Las crías de los euterios también dependen de la lactación, pero no del mismo modo que las de los marsupiales

² Precocial: en mamíferos, neonato que al momento del parto presenta pelaje, ojos abiertos, desarrollo avanzado y capacidad de alcanzar una rápida maduración locomotora, logrando así la independencia de sus progenitores en un periodo relativamente temprano (Ferner y col., 2017).

(Guernsey y col., 20117). Incluso entre los euterios que viven en entornos similares, existen diferencias muy marcadas en los períodos de lactancia que reflejan diversas alimentaciones y ecologías reproductivas. Por ejemplo, en los pinnípedos (Carnivora), los períodos de lactancia son muy cortos en Phocidae (con un extremo de 4 días en la foca encapuchada) y prolongados en Otariidae (4 a 24 meses en lobos y leones marinos) y Odobenidae (1 a 2 años en morsas) (Griffiths y col., 2015). Estas diferencias guardan relación con el modo de vida y también el número de crías.

Estas variaciones muestran los diferentes modos de reproducción que existen entre monotremas, marsupiales y euterios como resultado de la evolución, y, en todos los casos, evidencian el rol fundamental de la hembra en el éxito de la gestación, independientemente si el desarrollo es intra o extrauterino (Figura 2).

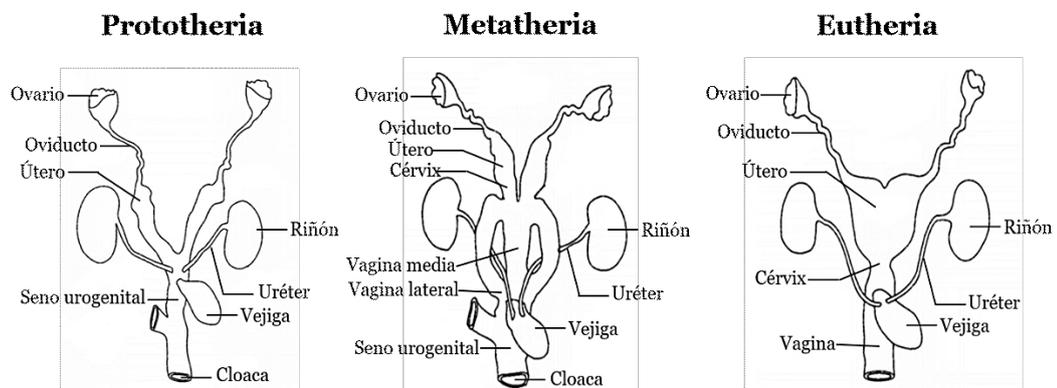


Figura 2. Comparación anatómica de los sistemas genital y urinario de la hembra entre los tres linajes de Mammalia, Prototheria, Metatheria y Eutheria. Imagen extraída y modificada de Taggart, y col., 1998.

b. Ontogenia prenatal del sistema reproductor de la hembra

El sistema reproductor de la hembra tiene funciones esenciales, entre ellas, ser el sitio donde ocurre la formación de las gametas femeninas, la fertilización, la implantación del embrión y el desarrollo del embrión/feto (Mullen y Behringer, 2014). El sistema reproductor se relaciona estrechamente con el sistema urinario

en su desarrollo y aspectos anatómicos. Ambos sistemas se originan a partir de los gononefrotomos, estructuras pares que se forman en el mesodermo intermedio, a ambos lados de la línea media del embrión en desarrollo. El mesodermo intermedio origina las crestas urogenitales, las que luego se diferencian y se dividen en crestas gonadales (mediales) y crestas urinarias (laterales). Durante el periodo indiferenciado del desarrollo, las crestas genitales (esbozos de las gónadas) son bipotenciales, es decir, pueden dar origen a testículos u ovarios según la constitución genética del individuo. En posición paralela a cada gononefrotomo, una invaginación del epitelio celómico en el borde lateral de cada cresta urogenital origina al conducto paramesonéfrico o de Müller (Gilbert y Barresi, 2018). A partir de la diferenciación de este conducto se originan las trompas uterinas, el útero (cuernos uterinos, cuerpo y cuello) y la porción craneal de la vagina. En cambio, la porción caudal de la vagina junto con la vulva y el clítoris derivan de la cloaca y la membrana cloacal (Mullen y Behringer, 2014; Gilbert y Barresi, 2018) (Figura 3).

La morfogénesis y la diferenciación de los conductos de Müller son procesos dinámicos, ya que involucran a diferentes eventos moleculares y tisulares con algunas características comunes y otras específicas entre los mamíferos (Roly y col., 2018). Por ejemplo, se requiere la expresión de factores de transcripción (Pax2, RAR α , β , γ , β -catenina, Dlg1, Emx2 y Lim1) e inductores (Wnt4) tal como se ha observado en ratones (Mendelsohn, 1994; Arango, 2005; Yin y Ma, 2005; Deutscher y Hung-Chang Yao, 2007; Iizuka-Kogo y col., 2007). Además, durante la organogénesis de los mamíferos también se expresan los genes Hox bajo un patrón espacial y temporal específico, proveyendo información posicional a lo largo del eje corporal del embrión (Kmita y Duboule, 2003; Major et al., 2021). Es así como se observó la expresión de los genes AbdominalB Hox a lo largo del eje antero-posterior del conducto de Müller en desarrollo. La expresión del gen Hoxa9 se detectó en la región futura de las trompas uterinas, mientras que la de Hoxa10

en la unión útero-tubárica. Por otro lado, *Hoxa11* se expresó fuerte y levemente en el útero y cérvix, respectivamente. En cambio, *Hoxa13*, se expresó únicamente en el cérvix y la parte superior de la vagina (Taylor y col., 1997; Lynch y col., 2004). Estas variaciones en la expresión de los genes durante la diferenciación del conducto de Müller requieren la interacción tisular entre el epitelio del conducto y el mesénquima circundante, como así también de la acción de las hormonas esteroideas (Massé y col., 2009). Esto último guarda relación con la determinación primaria o cromosómica del sexo. Al presentar las células embrionarias dos cromosomas X, los primordios gonadales se diferencian a ovarios y, por lo tanto, no hay secreción de las hormonas testosterona y anti-Mülleriana (AMH). La AMH, también conocida como sustancia inhibidora de Müller (SIM), es una glicoproteína dimérica que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), que juega un rol en la diferenciación sexual del feto debido a que desencadena la regresión de los conductos de Müller por inducir la apoptosis de sus células (Edelsztein y col., 2016). Por otra parte, los ovarios secretan estrógenos que inducen la diferenciación del conducto a trompas uterinas, útero, cérvix y región craneal de la vagina (MacLaughlin y col., 2001).

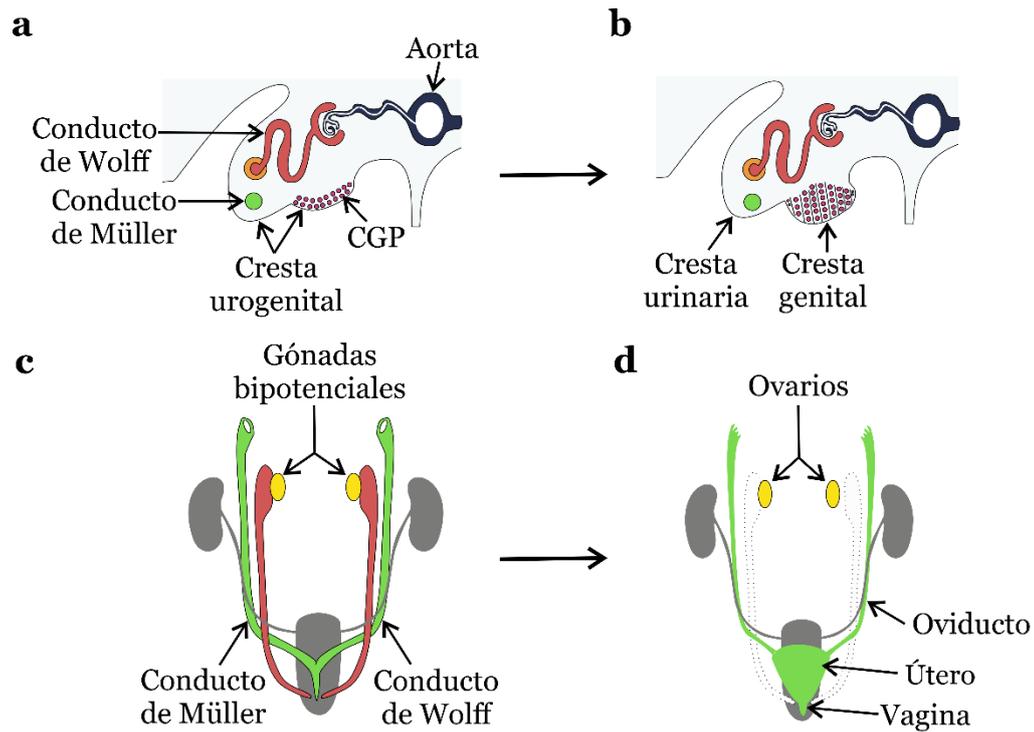


Figura 3. Secuencia del desarrollo del sistema reproductor de la hembra. a. Cresta urogenital en un corte transversal del embrión; **b.** Diferenciación de la cresta urogenital en cresta urinaria (lateral) y cresta genital (medial); **c.** Período indiferenciado; **d.** Diferenciación de las gónadas bipotenciales y del conducto de Müller. Abreviaturas: CGP, células germinales primordiales. Imagen extraída y modificada de Woudwyk, y col., 2021.

c. Morfología del sistema reproductor de la hembra en mamíferos euterios

En los mamíferos euterios, la preñez es un evento reproductivo complejo que involucra a la fertilización, la implantación, la placentación, el desarrollo del *conceptus*³ y el parto (Spencer y col., 2016). Estas funciones, al igual que otras, las realizan los órganos que constituyen al sistema reproductor de la hembra: los ovarios, las trompas uterinas, el útero, la vagina y los genitales externos (Hafez y Hafez, 2016) (Figura 4). Tal como se dijo al inicio de este capítulo, entre los mamíferos existen diferentes estrategias reproductivas (Hayssen y Orr, 2017; Holt

³ *Conceptus*: embrión/feto y sus membranas extraembrionarias (Spencer y col., 2016).

y Johnston, 2018), y estas se deben, en parte, a las características morfológicas del sistema reproductor de la hembra.

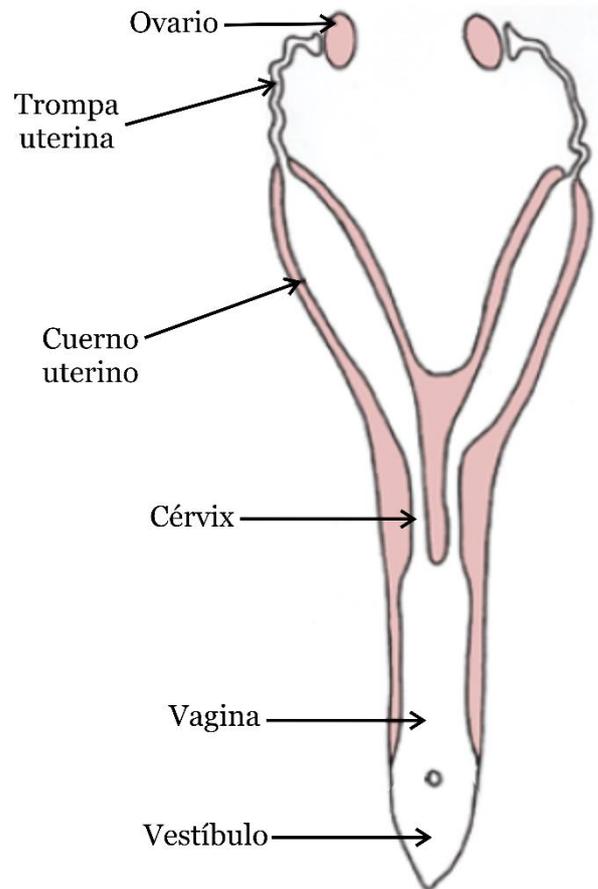


Figura 4. Sistema reproductor de la hembra de *Mus musculus*. Imagen extraída y modificada de McGeady y col., 2017.

Los ovarios, son las gónadas de la hembra y entre sus funciones se encuentran la generación de las gametas (ovocitos) y la síntesis de hormonas que regulan las funciones reproductivas (Bahr, 2018). Estas gónadas son variables en cuanto a tamaño, pero su estructura morfológica es similar entre los mamíferos. Estos órganos son pares, macizos y constan, en la mayoría de las especies, de una corteza periférica o zona parenquimatosa y una médula central o zona vascular. Externamente están tapizados por tejido epitelial simple que puede ser plano, cúbico o cilíndrico, según la especie, y que se denomina epitelio superficial. Este

epitelio es un mesotelio y se continúa con el mesovario (pliegue de peritoneo que sostiene al órgano en la cavidad abdominal). Adyacente al epitelio, se encuentra la túnica albugínea, rica en tejido conectivo denso. El estroma ovárico está compuesto por tejido conectivo predominantemente laxo, vasos sanguíneos y linfáticos, y nervios, que se distribuyen tanto en la corteza como en la médula. El parénquima está formado por los folículos ováricos y sus derivados, como el cuerpo lúteo (Geneser, 2000; Köning y Liebich, 2011) que se encuentran en la corteza. Algunas variaciones en la morfología ovárica se pueden observar entre mamíferos de distintos órdenes e inclusive, en algunos casos, entre las especies de un mismo orden. Entre los Xenarthra, los ovarios de *Chaetophractus vellerosus* (piche llorón) y *Zaedyus pichiy* (pichi) son cilíndricos y con extremos redondeados. Presentan dos zonas, parenquimatosa ventral "corteza" y vascular dorsal "médula", con estructura típica. En cambio, en *Dasypus hybridus* (mulita) son reniformes, correspondiendo la concavidad a la zona parenquimatosa y la convexidad a la vascular (Codón y Casenave, 2000). Por su parte, los ovarios del perisodáctilo *Equus ferus caballus* (equino) poseen un borde libre denominado fosa de ovulación, que es el único sitio donde los folículos se acercan hacia la superficie ovárica y se produce la ovulación⁴ (Alves y col., 2018).

Otro componente del sistema reproductor de la hembra son las trompas uterinas u oviductos⁵. Estos órganos son pares, huecos y con un recorrido tortuoso que se extiende desde el ovario hasta los cuernos uterinos. Las trompas uterinas constan de tres segmentos, que en sentido craneocaudal son: el infundíbulo, la

⁴ El concepto adecuado sería ovocitación, ya que en la mayoría de las especies es un ovocito lo que se libera desde el ovario. Para este trabajo, ovocitación y ovulación se tomarán como palabras equivalentes.

⁵ A lo largo de esta tesis se utilizará el término trompa uterina, para evitar confusiones, ya que oviducto en vertebrados no mamíferos refiere a toda la porción tubular del sistema reproductor de la hembra.

ampolla y el istmo. El infundíbulo tiene forma de embudo y en su borde libre presenta proyecciones digitiformes, largas y delgadas denominadas fimbrias. Una de las funciones del infundíbulo es recibir a los ovocitos que son expulsados del ovario en la ovulación. El segmento siguiente al infundíbulo es la ampolla, y su función es ser el sitio donde ocurren la fecundación, primer evento del desarrollo embrionario. Por último, se encuentra el istmo, que funciona como reservorio de espermatozoides tras la cópula. Este segmento se une al útero mediante la unión útero-tubárica (Brüssow y col., 2008; Köning y Liebich, 2011; Hafez y Hafez, 2016). Esta unión no está presente en todas las especies. Las trompas uterinas, además de transportar a las gametas y los cigotos, en una eventual preñez, son el sitio de capacitación espermática, proceso en el que el espermatozoide maduro adquiere la capacidad fecundante mediante cambios estructurales y funcionales que le permiten llegar hasta el ovocito y unirse a él (Leemans y col., 2019). Internamente, las trompas uterinas se organizan, desde la luz al exterior, en tres túnicas: mucosa, muscular y serosa. La túnica mucosa presenta pliegues finos, denominados primarios, secundarios y terciarios, según su origen, que se proyectan hacia la luz del órgano, generando que esta sea irregular. Estos pliegues de la mucosa decrecen en número desde el infundíbulo hasta el istmo, además disminuye su complejidad y su altura. El epitelio de la mucosa es cilíndrico simple, compuesto por células ciliadas y no ciliadas secretoras. La actividad ciliar y, en algunas especies, la contracción de las fibras musculares lisas facilitan el transporte de las gametas de la hembra y, en caso de ocurrir cópula, también de las del macho. Además, si ocurre la fecundación, estos movimientos dirigen al cigoto hacia el útero. Por otro lado, las células secretoras proveen nutrientes al ovocito y el cigoto. Además, la túnica mucosa carece de glándulas y muscular de la mucosa. La lámina propia es de tejido conectivo laxo con abundantes células plasmáticas, mastocitos y eosinófilos. La túnica muscular está constituida por fibras musculares lisas y se encuentra

organizada en una capa circular interna y una capa longitudinal externa. La túnica serosa consiste en un mesotelio y una capa delgada de tejido conectivo laxo muy vascularizado (Geneser, 2000; Pawlina, 2015). El tamaño y la disposición de estas tres túnicas es diferente según la región de la trompa uterina, la especie y la fase del ciclo estral debido a la influencia de las hormonas sexuales (Leese y col., 2001; Guérin y Ménézo, 2011; Coy y Yanagimachi, 2015; Mouguelar y col., 2015; Coy Fuster y col., 2018).

El útero es el órgano de la preñez ya que está involucrado en la implantación, la placentación, el desarrollo y el crecimiento del *conceptus*, y el parto (Cook y col., 2018). La anatomía uterina varía entre las especies mamalianas. Esta variabilidad depende, especialmente, del grado de fusión que han alcanzado los conductos de Müller durante el desarrollo (Massé y col., 2009). El útero dúplex carece de cuerpo, por lo tanto, está compuesto por dos cuernos uterinos que se abren independientemente en dos cérvix. Esta variedad se encuentra en roedores y lagomorfos. Por su parte, el útero bipartido presente, por ejemplo, en equinos y carnívoros, consta de dos cuernos uterinos, un cuerpo prominente y un cérvix. En cambio, la variedad uterina bicorne está conformada por dos cuernos uterinos que se continúan con un cuerpo pequeño y este a un único cérvix, se encuentra en porcinos, rumiantes y cetáceos. El útero simple presente en primates y quirópteros está caracterizado por la ausencia de cuernos uterinos y la presencia de un cuerpo prominente y un único cérvix (Kobayashi y Behringer, 2003; Chavette-Palmer y Tarrade, 2016).

Aunque la morfología macroscópica uterina varía entre los diferentes grupos de mamíferos, la microscópica está altamente conservada (Cook y col., 2018). La pared uterina consta de las mismas túnicas que la de las trompas uterinas, pero en el útero presentan nombres específicos: endometrio (mucosa),

miometrio (muscular) y perimetrio (serosa). El endometrio está conformado por tejido epitelial de revestimiento cúbico o cilíndrico simple, con células ciliadas y no ciliadas secretoras. El batido de las células ciliadas está dirigido hacia la vagina. A partir de este epitelio, se originan las glándulas uterinas como invaginaciones hacia la lámina propia de tejido conectivo laxo. Las glándulas uterinas pueden ser tubulares simples o ramificadas (Woudwyk y col., 2021). La localización de las glándulas es variable. Por ejemplo, en *Mus musculus* (ratón), las glándulas uterinas están dispuestas en las regiones laterales a anti-mesometrial del útero como producto de las diferencias regionales en la expresión de los miembros de la vía de señalización Wnt. Como consecuencia de estas variaciones, la implantación en el ratón es siempre anti-mesometrial (Goad y col., 2017). En las glándulas también existen células con cilias que mueven la secreción hacia la luz uterina; en cambio, las cilias de las células superficiales lo hacen hacia la vagina. En la lámina propia se encuentran diferentes tipos celulares del tejido conectivo, células residentes y transitorias (Woudwyk y col., 2021). Estas últimas, intervienen en la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. En mujeres, por ejemplo, existen cambios en el perfil inmunológico de macrófagos, neutrófilos, células T y células natural killer uterinas (*uNK*) relacionados con la menstruación, el embarazo y, en menor medida, con la regeneración endometrial saludable después del parto o la menstruación (Flynn y col., 2000). En las especies domésticas podemos observar variaciones en cuanto al tiempo en que las *uNK* participan durante la gestación. En rumiantes, la actividad de las células *uNK* se demostró en el endometrio uterino durante la gestación media y tardía (Segerson y Beetham, 2000; Tekin y Hansen, 2002). Particularmente en los bovinos, los datos sobre la presencia de células *uNK* en el endometrio son limitados (Oliveira y col., 2013). No así los que refieren a la presencia de macrófagos, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el útero durante el ciclo estral y la preñez (Cobb y Watson, 1995; Oliveira y Hansen, 2009; Kamat y col.,

2016). En el endometrio ovino también se encontraron linfocitos de las subpoblaciones T citotóxicas CD8⁺ y $\gamma\delta^+$ durante la gestación media y tardía, con aumento de las T $\gamma\delta^+$ cerca del momento del parto (Meeusen y col., 1993). A diferencia de los ovinos, en el útero porcino se observaron estas células en la primera etapa de la preñez (Croy y col., 1988). Las uNK y los linfocitos T son los tipos celulares predominante durante determinados momentos del ciclo estral y en la gestación. Estas células tienen funciones especializadas en el crecimiento del *conceptus*, el establecimiento y el mantenimiento de una gestación normal, la remodelación de los vasos uterinos durante la placentación y la regulación de la invasión trofoblástica del endometrio, entre otros procesos (Meeusen y col., 2001; Leonard y col., 2006; Vasudevan y col., 2017). El tejido conectivo de la lámina propia, próximo al miometrio, es denso y el fibroblasto es el tipo celular predominante. Aunque la estructura microscópica del endometrio es similar entre las diferentes especies, podemos encontrar algunas variaciones. El endometrio de los rumiantes presenta protuberancias denominadas carúnculas, estas son aglandulares y altamente vascularizadas, y constituyen el componente materno de la placenta junto a los cotiledones embrionarios. En *Equus ferus caballus* y *Sus scrofa domestica* (cerda) el endometrio está muy plegado en comparación con otras especies. En los primates, el endometrio está dividido en las capas funcional y basal (Cook y col., 2018). La capa funcional se desprende durante la menstruación. Previamente a la menstruación, la capa endometrial tiene afluencia de células inmunitarias innatas y actividad enzimática por parte de las metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular, especialmente a las fibras colágenas (Critchley y col., 2020). Hacia la superficie externa del endometrio está el miometrio. Este está conformado por dos capas de tejido muscular liso, una interna y otra externa, en las que las fibras musculares se disponen, en la mayoría de las especies, en sentido circular y longitudinal, respectivamente. Entre ambas

capas hay tejido conectivo laxo y vasos sanguíneos de diferentes calibres, que en su conjunto conforman al estrato vascular. Por último, en el exterior del órgano, se localiza el perimetrio, formado por tejido conectivo laxo y un epitelio plano simple (mesotelio) (Woudwyk y col., 2021).

La diferenciación de los tejidos que forman el útero no es completa en todas las especies al momento del parto. Por ejemplo, en roedores de laboratorio *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, animales domésticos y mujeres, se completa en la vida posnatal (Spencer y col., 2005; Lopez Merlo y col., 2017). Estas variaciones son consecuencia del tiempo en que se producen ciertos eventos vinculados al desarrollo uterino, entre ellos, la organización y la estratificación del estroma endometrial, la diferenciación y el crecimiento del miometrio, y el crecimiento coordinado de las glándulas uterinas. Independientemente de las variaciones uterinas interespecíficas, la capacidad funcional de este órgano en la hembra adulta queda definida, en gran medida, por los eventos del desarrollo asociados a la programación de los tejidos uterinos durante las etapas pre y posnatal (Kobayashi y Behringer, 2003).

Estas características histológicas del útero son variables durante el ciclo menstrual o estral, la preñez y el parto, por lo cual, es un órgano dinámico. El remodelado del útero en los eventos reproductivos es posible por la existencia de células madres propias del órgano (Teixeira y col., 2008) o extrauterinas. Con respecto a este último caso, se demostró la existencia de una fuente extrauterina de células madre adultas que presumiblemente se reclutan en el útero con cada ciclo menstrual o estral, y que son las responsables de la reparación del útero después de la menstruación o el parto. Una fuente posible podrían ser las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (Bruscia y col., 2006).

En la mayoría de las especies domésticas, con excepción de lagomorfos y roedores, el útero se encuentra conformado por dos cuernos uterinos, un cuerpo y un cuello o cérvix (Köning y Liebich, 2011). La estructura microscópica del cuerpo uterino no difiere de la descrita para los cuernos uterinos. El otro componente uterino es el cérvix o cuello. Este consta de dos zonas, endocérvix y exocérvix. En relación a su estructura histológica, la mucosa del endocérvix es similar a la de los cuernos uterinos, mientras que la del exocérvix se asemeja a la de la vagina. El cuello regula el ingreso de los espermatozoides. Por otro lado, algunas células de su mucosa son secretoras de moco en cantidades abundantes durante el estro. Este moco, en caso de cópula y posterior gestación, forma un tapón mucoso que impide el ingreso de microorganismos que pudieran afectar el normal desarrollo del *conceptus* (Adnane y col., 2018).

Además, el sistema reproductor de la hembra de los mamíferos euterios consta de una vagina, un órgano hueco que se extiende desde el cérvix hasta el vestíbulo vaginal. La vagina es el órgano copulador de la hembra y forma parte del canal de parto. La pared vaginal presenta pliegues longitudinales de la túnica mucosa. La mucosa vaginal consta de un tejido epitelial plano estratificado que puede ser cornificado o no, según la especie. La lámina propia está constituida por tejido conectivo laxo muy vascularizado, con abundantes leucocitos, en particular, linfocitos; y tiene una gran vascularización. Esta variedad de tejido conectivo no es homogénea en toda la extensión de la lámina propia, ya que en su parte más profunda el tejido conectivo es denso. Por otra parte, la mucosa vaginal no presenta muscular de la mucosa. En cuanto a las otras túnicas, la muscular es muy gruesa y consta de dos o tres capas de tejido muscular liso, cuya disposición y espesor son variables según la especie. Cranealmente, la túnica más externa es la túnica serosa, mientras que en la porción caudal de la vagina se observa una túnica adventicia

con un gran plexo venoso, nervios simpáticos y ganglios nerviosos (Geneser, 2000; Köning y Liebich, 2011; Pawlina, 2015).

Otros componentes del sistema reproductor de la hembra son los genitales externos. El vestíbulo vaginal se extiende desde la desembocadura de la uretra, caudalmente, hasta los labios vulvares. En las cerdas y las rumiantes, ventral al orificio uretral externo se encuentra el divertículo suburetral. La estructura histológica del vestíbulo es similar a la de la porción caudal de la vagina. En la perra y la yegua, la mucosa vestibular posee tejido eréctil y plexos venosos que se congestionan durante el estro. En la luz del vestíbulo vaginal desembocan glándulas cuyo tamaño y estructura varían de acuerdo con la especie. Una de sus funciones es la lubricación del canal durante el coito y la secreción de feromonas durante el estro. La túnica muscular del vestíbulo es una continuación del tejido muscular liso de la vagina. Externamente a esta túnica se encuentra el músculo constrictor del vestíbulo, que es de tipo estriado esquelético. Por su parte, la vulva está formada por dos labios que se unen en las comisuras dorsal y ventral. La piel que recubre los labios vulvares posee abundantes glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas apocrinas. En la hipodermis, se encuentran fibras musculares estriadas esqueléticas que corresponden al músculo constrictor de la vulva. El clítoris se encuentra en la comisura ventral de la vulva, ubicado en una depresión denominada fosa del clítoris. Este órgano está formado por dos pilares que se originan en el arco isquiático, el cuerpo del clítoris y el glande. Este último es la porción visible, está formado por tejido funcionalmente eréctil en la yegua y la perra, y por tejido fibroelástico no eréctil en ovejas, gatas y cerdas. El prepucio del clítoris es un pliegue cutáneo que rodea al glande. El clítoris está muy inervado, mediante nervios autónomos y sensitivos (Hafez y Hafez, 2016; Woudwyk y col., 2021). Además de estos órganos, en la hembra posee glándulas mamarias que, si bien son glándulas apocrinas modificadas del sistema tegumentario, están

relacionadas funcionalmente con el sistema reproductor. Estas glándulas son exclusivas de los mamíferos y su producto de secreción es la leche, destinada a la alimentación de las crías. La estructura y las funciones de las glándulas mamarias son muy dinámicas, varían según la edad, el estado del ciclo estral y, eventualmente, la gestación (Woudwyk y col., 2021).

Además de los órganos permanentes del sistema reproductor de la hembra, existe otro, la placenta, cuyo desarrollo ocurre, en parte, a partir del útero (Roberts y col., 2016). La placenta es un órgano transitorio debido a que solo se desarrolla durante la gestación y también mixto porque resulta de la interacción de los tejidos maternos y fetales (Mossman, 1937, 1991; Barbeito, 2008; Chavette-Palmer y Tarrade, 2016). La placentación, formación de la placenta, representa uno de los hitos evolutivos de la transición oviparidad-viviparidad, e involucró cambio morfofisiológicos en el sistema reproductor de la hembra (Van Dyke y col., 2014; Blackburn, 2015), como así también la pérdida de genes relacionados con la provisión de vitelo a los ovocitos (Brawand y col., 2008). El conocimiento de estas y otras características permiten reconstruir la historia evolutiva de la placenta de los vertebrados, y en relación con esta tesis, en la clase Mammalia (Roberts y col., 2016; Griffith, 2021).

Entre los euterios, la placenta es el órgano más variable (Wagner, 2018), y como consecuencia de ello, se han establecido diferentes sistemas de clasificación. A continuación, se describe una modificación de los criterios de clasificación propuestos por Chavette-Palmer y Tarrade (2016). Clasificación según la:

1. Distribución de las vellosidades coriales sobre el saco fetal: placenta difusa (porcinos, equinos, camélidos y cetáceos), cotiledonaria (rumiantes), zonal (carnívoros) y discoide (insectívoros, lagomorfos, roedores, monos y humanos).

2. Por la interdigitación de los componentes: placenta plegada (cerdos), vellosa (rumiantes, equinos, primates y mujeres) y laberíntica (roedores, lagomorfos, carnívoros y murciélagos).
3. Las capas celulares que separan la circulación fetal de la materna y el grado de invasión del endometrio: placentas epiteliochorial (cerdos y equinos), sinepiteliochorial (rumiantes), endoteliochorial (carnívoros) y hemocorial (roedores, lagomorfos, monos y humanos) (Figura 5).

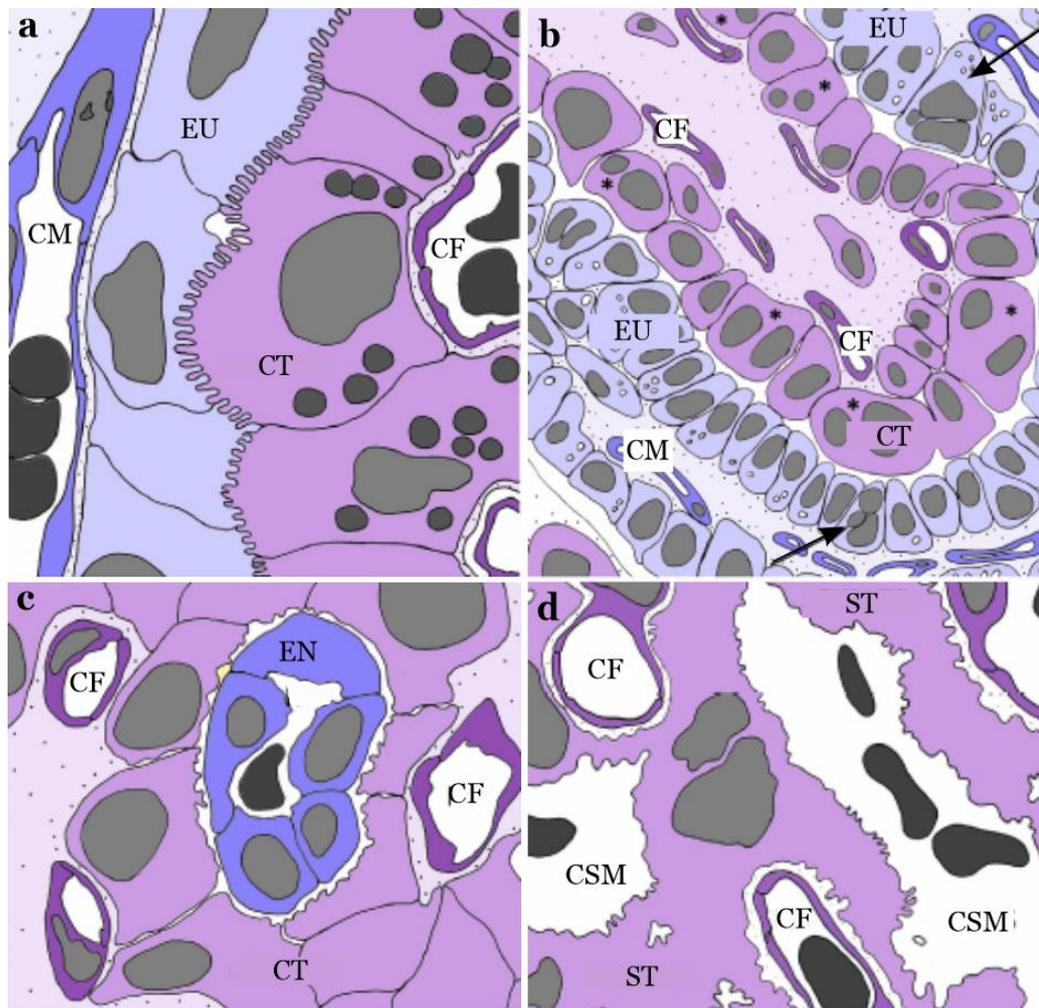


Figura 5. Variedades de interfase materno-fetal según el criterio de clasificación 3. a. Epiteliochorial; b. Sinepiteliochorial; c. Endoteliochorial; d. Hemocorial. Abreviaturas: CF, capilar sanguíneo fetal; CM, capilar sanguíneo materno; CSM, cámara sanguínea materna; CT, citotrofoblasto; EN, endotelio materno; ST, sincitiotrofoblasto; Flechas, células bi-trinucleadas. Imagen extraída y modificada de Carter, 2018.

Diferentes estudios, en cuyos análisis se utilizaron estos criterios de clasificación, han permitido generar hipótesis con respecto al estado placentario basal de los euterios. Por ejemplo, mediante estudios que combinan filogenia molecular y reconstrucción del estado del carácter ancestral se determinó que el ancestro común a los euterios presentó una placenta invasiva, siendo este el carácter plesiomórfico o basal (Wildman y col., 2006; Mess y Carter, 2007; Martin, 2008; Elliot y Crespi, 2009; Capellini, 2012); mientras que las placentas con menos y nulo grado de invasividad los caracteres derivados (Wagner, 2018). Este sentido de aparición en la historia evolutiva guarda relación con la invasividad del trofoblasto sobre el endometrio y esto último con el grado de desarrollo con que nacen las crías (altriciales o precociales, y sus espectros) y también con los cuidados de la hembra sobre las mismas. Por ejemplo, es frecuente que las placentas con menor grado de invasión se relacionen con crías precociales y dependientes de la nutrición histotrófica durante su desarrollo embrionario temprano. En cambio, en las especies con placentas altamente invasivas las crías son, generalmente, altriciales (Smith, 2014).

Independientemente del tipo de placenta que posea cada especie, este órgano permitirá al desarrollo, el crecimiento y la supervivencia del *conceptus* a través de sus múltiples funciones (Wooding y Burton, 2008). Conforme avanza la gestación en los mamíferos, el *conceptus* tendrá mayores demandas hacia la madre y será la placenta quien medie esas necesidades (Chavette-Palmer y Tarrade, 2016). De esta manera, la placenta contribuye al éxito de la preñez, es decir, el parto de crías que aseguran la continuidad de la especie.

d. Fisiología del sistema reproductor de la hembra en mamíferos euterios

Los eventos reproductivos en la hembra, tales como, la pubertad, la ciclicidad ovárica, la inactividad sexual, la preñez y la lactancia, son coordinados

por el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal (HHG) (Padmanabhan, Puttabyatappa y Cardoso, 2018). Cada uno de los órganos del eje HHG secreta diferentes hormonas; el hipotálamo a la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la hipófisis a las hormonas folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), y los ovarios a las hormonas sexuales estrógenos, progesterona y andrógenos. Este sistema actúa en cascada debido a que la GnRH promueve la secreción de FSH y LH. La FSH estimula la foliculogénesis y la esteroidogénesis, mientras que la LH induce la esteroidogénesis, la ovulación y el desarrollo de los cuerpos lúteos (Levine y Hadley, 2007).

La funcionalidad del eje HHG no es continua ya que existe un delicado y preciso equilibrio de señales estimulantes e inhibidoras entre sus componentes; por lo tanto, está regulada por ciclos de retroalimentación hormonal positivos y negativos. Así, las hormonas secretadas por los ovarios, específicamente la progesterona (P4) y el estradiol (E2), retroalimentan el hipotálamo y la hipófisis e inhiben la secreción de GnRH o la FSH y LH, respectivamente. Sin la estimulación de las hormonas GnRH, FSH o LH, las hormonas ováricas no se secretan y generan retroalimentación negativa en el hipotálamo y la hipófisis (Flaws y Spencer, 2018) (Figura 6). Además de esta regulación hormonal, hay otros factores que influyen en el funcionamiento del sistema reproductor de la hembra, entre ellos, la nutrición (Cardoso y col., 2020), el estado metabólico (Navarro y Kaiser, 2013) y la estacionalidad (Li y col., 2012).

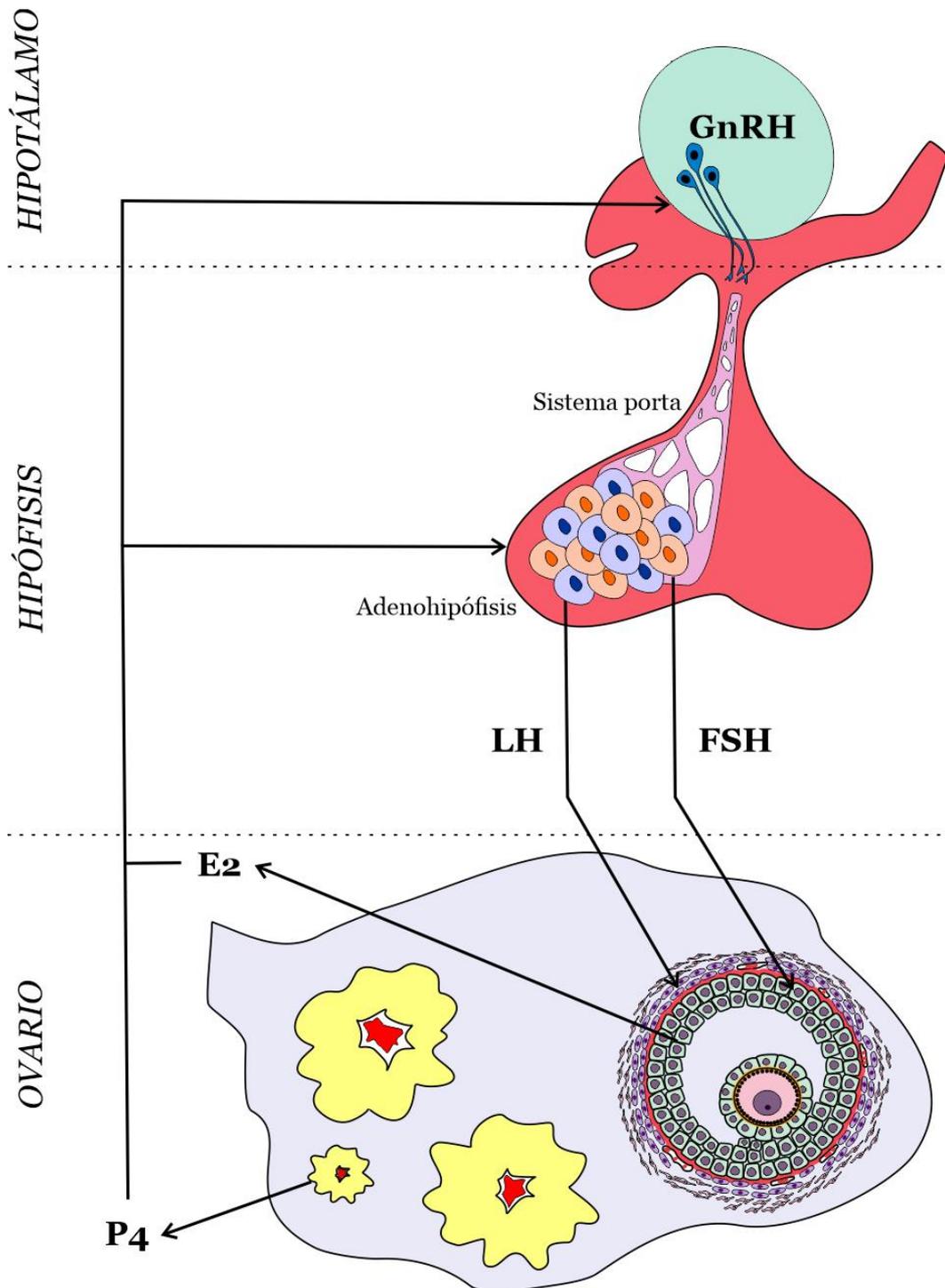


Figura 6. Eje hipotálamo-hipofisario-ovárico en mamíferos euterios. Abreviaturas: E2, estrógeno; FSH, hormona foliculoestimulante; GnRH, hormona liberadora de gonadotrofinas; LH, hormona luteinizante; P4, progesterona. Imagen extraída y modificada de Woudwyk y col., 2021.

El eje HHG está relacionado con la pubertad, periodo del desarrollo en que se alcanza la capacidad reproductiva, es decir, la producción de gametas (Parent,

2003). Una vez que la hembra alcanza la pubertad se da inicio al primer ciclo estral. Este ciclo se define como el conjunto de cambios morfológicos en los órganos reproductivos inducidos por las variaciones en los niveles séricos de las hormonas reproductivas (Goldman y col., 2007). Los ciclos estrales son discontinuos, porque están interrumpidos por periodos de anestro (inactividad sexual) y preñez (Woudwyk y col., 2021). En algunos grupos de mamíferos, entre ellos, los primates, el insectívoro *Elephantulus myurus* y ciertas familias de murciélagos, las hembras tienen ciclos menstruales (Emera y col., 2012; Catalini y Fedder, 2020). El ciclo menstrual ocurre cada mes, y los cambios morfológicos inducidos por las hormonas ováricas implican el desprendimiento del endometrio, la menstruación (Woudwyk y col., 2021). La menstruación está conformada, principalmente, por restos de endometrio y sangre (Maybin y Critchley, 2015).

El ciclo estral se divide en las fases folicular y luteal dependiendo cual sea la estructura dominante en el ovario. A su vez, cada una de estas se subdivide en estados. De esta forma, la fase folicular incluye a los estados proestro y estro, mientras que la fase luteal al metaestro y diestro (Paccola y col., 2013; Gobello, 2019). La fase folicular se caracteriza por la luteólisis (destrucción del cuerpo lúteo) y el consecuente descenso de los niveles de P4. Este descenso sérico de P4 genera retroalimentación negativa sobre el hipotálamo. En consecuencia, el hipotálamo secreta GnRH que induce la secreción hipotalámica de FSH y LH. También en esta fase se incrementa la concentración sérica de E2 debido a su secreción desde los folículos ováricos en desarrollo, estructuras ováricas predominantes en esta fase. El E2 estimula a los órganos del sistema reproductor de la hembra, tales como, las trompas uterinas, el útero y la vagina, siendo, además, el responsable de la conducta de celo en la mayoría de las especies. En el útero promueve cambios para preparar al órgano frente a una eventual gestación. Entre ellos se encuentran, el incremento del espesor del endometrio, el aumento de la vascularización y el

mayor desarrollo de las glándulas uterinas (Losordo y Isner, 2001; Dobrzycka y col., 2009; Cook y col., 2013; Sugiura y col., 2018). En cambio, en el miometrio induce un incremento del tono muscular (Mueller y col., 2006; Zhang y col., 2019). La fase luteal comienza una vez que ha ocurrido la ovulación e incluye la formación, la actividad y la regresión del cuerpo lúteo. Esta estructura, predominante en esta fase, secreta a la P4 que induce el acondicionamiento del sistema reproductor de la hembra, particularmente del útero, para la preñez. En el endometrio promueve la ramificación de las glándulas uterinas y la secreción de histotrofo por parte de las mismas (Kelleher y col., 2019), y en el miometrio una disminución del tono muscular (Yin y col., 2018). Además, inhibe la receptividad sexual. Estas dos fases no solo se diferencian por la estructura dominante en el ovario y la hormona secretada, sino también por su duración. La fase luteal es más extensa, en la mayoría de los mamíferos, que la folicular y ocupa alrededor del 80% del ciclo estral (Gobello, 2019).

La frecuencia anual de ciclos estrales permite clasificar a las hembras en monoéstricas y poliéstricas. Las hembras monoéstricas, tales como, las zorras, lobas y osas, tiene un único ciclo estral en donde el estro es prolongando, por lo que se incrementa la probabilidad de ocurrencia de la cópula y eventual preñez. En cambio, las hembras poliéstricas tienen ciclos estrales sucesivos durante todo el año (poliéstricas continuas), entre ellas, vacas, cerdas y roedores, o en cierta estación del año (poliéstricas estacionales) como ocurre en la oveja, cabra, yegua, perra⁶ y gata (Cook y col., 2018).

En relación con el útero, sus funciones durante el ciclo menstrual o estral y la preñez no dependen exclusivamente de los cambios que promueven las hormonas ováricas. En los últimos años se ha demostrado que este órgano tiene una

⁶ Como consecuencia de la domesticación.

microbiota asociada y que ciertas variaciones en esta se relacionan con fallas durante la implantación como así también con la pérdida de la preñez (Moreno y Franasiak, 2017).

e. Generalidades del desarrollo embrionario en mamíferos euterios

Tal como se mencionó en la sección anterior, la preñez de los mamíferos euterios es un evento reproductivo complejo que involucra a la fertilización, la implantación, la placentación, el desarrollo del *conceptus* y el parto (Spencer y col., 2016).

La fertilización requiere de una adecuada interacción entre diferentes moléculas de las gametas. Algunas de estas moléculas están conservadas en los vertebrados, mientras que otras varían entre las especies. Algunas de las sustancias involucradas en este reconocimiento son, la progesterona, la fertilina (Blobel y col., 1992), el CD46 (Taylor y col., 1994), la IZUMO1 (Inoue y col., 2005), la zonadhesina (Tardif y col., 2010), la CRISP1, los péptidos natriuréticos (Armon y Eisenbach, 2011) y las glicoproteínas ZP (Gupta y col., 2012). Las interacciones ocurren durante las etapas sucesivas que conforman a la fertilización: la penetración del cúmulo oóforo, la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, la penetración de la zona pelúcida y la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (Okabe, 2013). En los euterios, la fertilización ocurre en la ampolla de las trompas uterina y, además, allí se inicia del desarrollo embrionario (Coy y col., 2012) ya que el ambiente de este órgano cuenta con condiciones estables de pH, temperatura y composición química (Li y Winuthayanon, 2017) (Figura 7 a). Otras condiciones son variables, por ejemplo, las fuentes nutricias a partir de las cuales los embriones pre-implantatorios obtienen energía mediante el metabolismo oxidativo. En el caso de los cerdos, la fuente son los ácidos grasos (Sturme y col., 2009) mientras que, en conejos, ratones y en el humano pueden

ser el lactato, el piruvato y los aminoácidos (Absalón-Medina y col., 2014). Además de nutrientes, también hay otras moléculas involucradas, entre ellas, los factores de crecimiento. Por ejemplo, el factor embriotrófico-3 de células de las trompas uterinas humanas promueve la proliferación e inhibe la apoptosis en el embrión pre-implantatorio (Xu y col., 2004). El fluido de las trompas uterinas también presenta moléculas que evitan la pérdida de la calidad del embrión por efecto del estrés oxidativo (Hansen y Harris, 2015) o la baja concentración de oxígeno (Catt y Henman, 2000), entre otros factores.

El resultado de la fertilización es el cigoto, embrión conformado por una única célula con el material genético del macho y la hembra, rodeado por la zona pelúcida y con totipotencialidad para dar origen a un nuevo individuo (Gilbert y Barresi, 2018; Boiani y col., 2019). Este cigoto, tras sucesivas divisiones mitóticas en diferentes planos (Gumus y col., 2010) da origen a las blastómeras, etapa denominada segmentación (Figura 7 b). Las blastómeras conforman al siguiente estado embrionario, la mórula. Este evento se denomina morulación (Figura 7 c). En primeras instancias las blastómeras no están unidas estrechamente, por lo que, se habla de mórula laxa. Tras un proceso de compactación, la mórula laxa origina a la mórula compacta (Ducibella y Anderson, 1975). La compactación depende de la expresión de moléculas de adhesión celular como la cadherina-E (Fleming y col., 2001). Estos eventos se producen en las trompas uterinas en la mayoría de las especies. El tiempo de formación de la mórula varía entre los mamíferos (Ducibella y col., 1975; Edwards y col., 1981; Reima y col., 1993). Posteriormente, las secreciones uterinas inducen a que las blastómeras de la mórula compacta se diferencien en centrales y periféricas. Las células periféricas se diferencian a epiteliales cúbicas bajas o planas que en conjunto forman una estructura en forma de anillo en la cara interna de la zona pelúcida, el trofoectodermo o trofoblasto (Tr). Las células centrales son cúbicas y constituyen el embrioblasto. Las células del Tr

a través de la bomba ATP Na⁺/K⁺ ATPasa y las acuaporinas realizan un intercambio activo de iones y pasivo de agua, respectivamente, generando un gradiente osmótico hacia el interior de la mórula. Como consecuencia de la entrada de líquido ocurre la cavitación y se origina una cavidad, el blastocele. Además, la formación del blastocele genera que las células del embrioblasto se localicen en el polo animal del embrión y conformen al macizo celular interno (MCI). Este estado embrionario que consta de Tr, MCI y blastocele se conoce como blastocisto⁷, y al proceso se lo denomina blastulación (Oback y McLean, 2018) (Figura 7 d). A partir de estudios en roedores múridos, mujeres y animales de producción, se ha observado que en los procesos de compactación, polarización, cavitación y diferenciación participan vías de señalización, entre ellas, Hippo y WNT, como así también diferentes factores de transcripción como OCT4, NANOG, CDX2, GATA6 y SOX17 que intervienen en momentos específicos de estos eventos tempranos del desarrollo (Nishioka y col., 2008, 2009; Madeja y col., 2013; Anani y col., 2014; Posfai y col., 2017; Frum y col., 2018, 2019).

Estos eventos morfogénicos del desarrollo están altamente conservados en los Animalia, ya que conducen a la formación de las tres capas germinales que originan a los tejidos definitivos del organismo. Aunque en los mamíferos euterios es diferente, ya que la primera diferenciación origina al Tr y el MCI (Marikawa y Alarcón, 2009). Además, las características de adaptación a la gestación y la consecuente reducción secundaria del vitelo originaron que los mamíferos terios presenten peculiaridades en el desarrollo dentro de Animalia (Arendt y Nübler-Jung, 1999; Brawand y col., 2008; Abbot y Rokas, 2017). Por otro lado, la secuencia

⁷ El blastocisto de los mamíferos no guarda equivalencia completa con la blástula de otros taxa de animales. En otros grupos, la totalidad de las células embrionarias de este estadio formarán parte del cuerpo del organismo; en cambio, en los mamíferos, el trofoblasto no forma componentes del futuro animal sino células placentarias.

cronológica de los principales eventos morfogénicos del desarrollo embrionario temprano de los euterios (compactación, morulación, cavitación, formación del MCI y separación de hipo-epiblasto) es similar entre los grupos en que han sido estudiados con profundidad: roedores (marmota, ratón y rata), primates (humano y macaco), artiodáctilos (vaca, oveja, cerda y cierva) y carnívoros (gata y perra). Sin embargo, el tiempo que requieren la segmentación, compactación, blastulación y especificación de los linajes celulares es diferente entre los distintos euterios (Oback y McLean, 2018). La nutrición y la supervivencia del cigoto, la mórula y el blastocisto, como así también el desplazamiento hasta el útero se ven facilitados por las trompas uterinas como se mencionó anteriormente. Una vez que el blastocisto llega al útero, este se libera de su matriz extracelular circundante, la zona pelúcida, poniendo fin a la embriogénesis preimplantacional (Oback y McLean, 2018). El útero es el órgano de la preñez y debe ser competente para aceptar la implantación del blastocisto. Esto ocurre durante un periodo de tiempo conocido como ventana de implantación (Psychoyos, 1973) (Figura 7 e). En las ratonas, la sensibilidad del útero al blastocisto se clasifica en tres estados: prereceptivo, receptivo y fase refractaria. Durante el estado prereceptivo, el útero presenta condiciones para el desarrollo del embrión, pero no adecuadas para la implantación. En cambio, durante el estado receptivo (ventana de implantación) está preparado para la implantación. Por último, en la fase refractaria, el blastocisto competente no puede implantarse y el ambiente uterino se vuelve desfavorable para la supervivencia y el desarrollo del embrión. Estas etapas demuestran que la continuidad del desarrollo depende del útero, y para ello se requiere de cambios morfológicos y funcionales del órgano promovidos por las hormonas esteroideas estrógenos y progesterona (Wang y Dey, 2006). La fase de receptividad puede evidenciarse a través de la presencia de los pinópodos (protrusiones apicales de las células epiteliales de revestimiento del endometrio)

que se han observado en la mujer, rata y ratona (Quinn y Casper, 2009), y también mediante la retracción de microvellosidades apicales (Murphy, 2004).

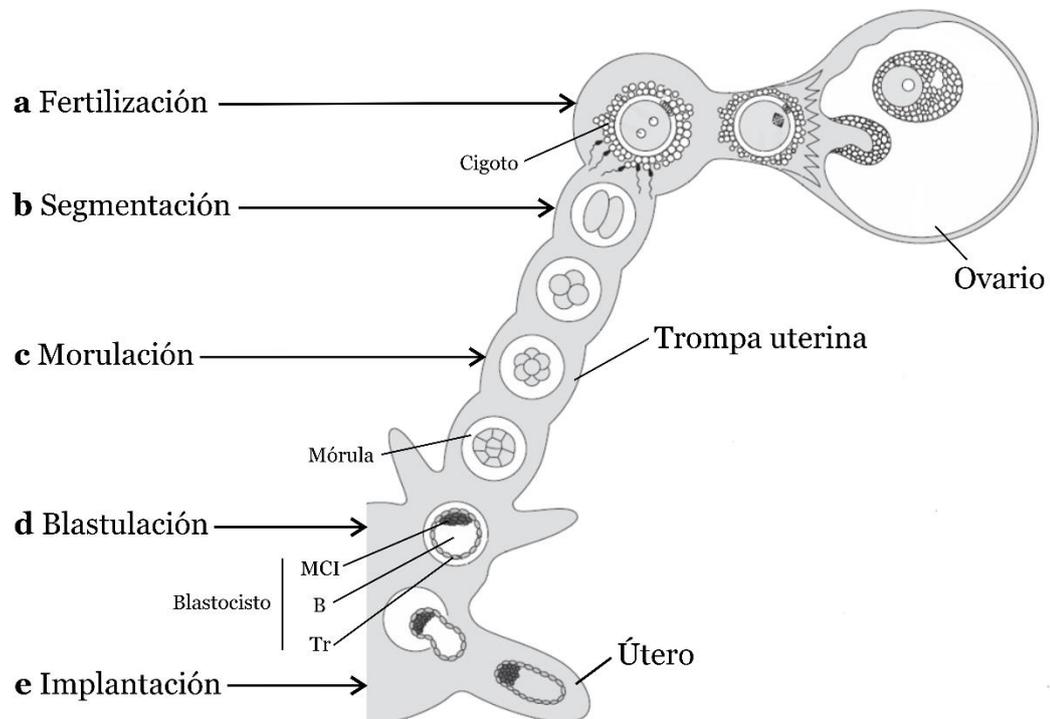


Figura 7. Eventos del desarrollo embrionario temprano en *Mus musculus*. Abreviaturas: B, blastocele; MCI, macizo celular interno; Tr, trofoblasto. Imagen extraída y modificada de Werneburg y Spiekman, 2018.

En la etapa receptiva ocurre la implantación, un proceso que involucra interacciones moleculares y celulares desencadenadas por la inducción de E2 y P4 (Zhang y col., 2013). La implantación es variable entre las especies, y en algunas involucra a las siguientes etapas: aposición, adhesión e invasión. En la aposición ocurren uniones lábiles entre las células del Tr y el epitelio de revestimiento endometrial, en la que intervienen glicoproteínas como la mucina MUC-1, encontrada, por ejemplo, en mujeres y conejos (Hey y col., 1994; Hoffman, y col., 1998; Meseguer y col., 2001). Mientras que, en la adhesión, las uniones son fuertes y en ellas intervienen diferentes moléculas de adhesión celular (CAM), como las integrinas, las selectinas, las cadherinas y las de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Kim y Kim, 2017). Por ejemplo, en la oveja participan las

proteínas endometriales GlyCAM-1, Galectina-15, integrinas y osteopontina (Spencer y col., 2004a). Además, durante la adhesión hay un marcado incremento de la permeabilidad vascular en el sitio de unión blastocisto-epitelio luminal, mediado por prostaglandinas derivadas de la acción catalítica de las ciclooxigenasas. Esta característica, entre otras, permite considerar a la implantación como una reacción pro-inflamatoria (Griffith y col., 2017; Kim y Kim, 2017). Luego de la adhesión, en algunas especies, ocurre la invasión. En esta etapa también se observan signos de inflamación. Entre ellos, infiltración de neutrófilos, reclutamiento de células inmunes regulatorias y remodelado vascular (Chavan y col., 2021). Las características de la inflamación durante la implantación son de importancia para el estudio evolutivo de este proceso reproductivo en los vertebrados gnatostomados. Las etapas iniciales en la evolución de la implantación de los embriones implicaron cambios evolutivos en la fisiología materna, que se modificaron a partir de una inflamación mucosa genérica ancestral en respuesta a la presencia del embrión (Stadtmauer y Wagner, 2020).

La invasión implica una gran participación del Tr que utiliza los mismos mediadores bioquímicos para facilitar la invasión que las células de los tumores malignos. Estos incluyen a colagenasas como las metaloproteasas (MMP) que degradan la matriz extracelular (Zhu y col., 2012). Las MMP-2 y MMP-9 son algunas de las MMP involucradas en la remodelación del endometrio por corrosión de sustratos tales como, colágenos de diferentes tipos, fibronectina, laminina, elastina, para que el blastocisto se introduzca en la pared uterina mientras ocurre la remodelación de la misma (Diessler y col., 2017). Este tipo de invasión se denomina intramural o intersticial y se observa, generalmente, en aquellas especies con placentas invasivas. Sin embargo, hay especies con este tipo de placenta, como la rata y la ratona, en donde el blastocisto no se aloja en la pared endometrial sino en cavidad específicas y, por lo tanto, la implantación es

excéntrica (Lee y DeMayo, 2004; Zhang y col., 2018). Por otro lado, en aquellas especies con placentas no invasivas, epiteliocorial y sinepiteliocorial, la implantación involucra a la aposición y la adhesión, en tal caso, la implantación se denomina central ya que ocurre en la luz de los cuernos uterinos (Spencer y Hansen, 2015). En un contexto evolutivo de estos tres tipos de implantación, la central es considerada como el carácter plesiomórfico o basal, mientras las implantaciones intersticial y excéntrica se consideran como caracteres derivados (McGowen y col., 2014; Paulson y Comizzoli, 2021). La implantación requiere de procesos celulares como la apoptosis para la invasión del trofoblasto, tal como se ha observado en la mujer (Carson y col., 2000). En los distintos mamíferos existen diversas sustancias específicas que son necesarias para la implantación. Por ejemplo, en los muridos ratón y rata se requiere la participación del factor inhibitorio de la leucemia LIF (por sus siglas en inglés, leukemia inhibitory factor) (Kobayashi y col., 2014) y las hormonas lactogénicas (Soares, 2004), en los rumiantes del INF-tau (Forde y Lonergan, 2017; Basavaraja y col., 2019), en cerdos de los estrógenos (Meyer y col., 2019) y en primates, tal como *Papio anubis* (babuino de Anubis), de la gonadotrofina coriónica (Cameo y col., 2004). Estos antecedentes, junto con muchos otros, demuestran la gran variabilidad de la implantación entre los euterios (Wimsatt, 1975). Esto ha motivado la realización de diferentes estudios para conocer los aspectos evolutivos de la implantación en la transición ovoparidad-viviparidad dentro de este clado (McGowen y col., 2014; Chavan y col., 2021; Stadtmauer y Wagner, 2020).

En muchas especies en las que se desarrolla una placenta invasiva, como rata, ratona, mujer, y en las zonas invasivas de la placenta de la yegua (copas endometriales), el tejido conectivo del endometrio reacciona en respuesta a la implantación y los fibroblastos se diferencian a células deciduales. Este proceso se conoce como reacción decidual o decidualización. En la gata, esta reacción no

ocurre, pero sí se diferencian células deciduales en el tejido conectivo uterino. Las células deciduales regulan la invasión del trofoblasto en el endometrio, controlan la respuesta inmune local uterina y, junto a otros tipos celulares, participan del mantenimiento de la gestación (Woudwyk y col., 2021). La decidualización puede desencadenarse con independencia de la existencia de un embrión implantado, por lo tanto, ocurre por interacción molécula-célula como respuesta a los cambios hormonales durante el ciclo. A esta decidualización se la ha denominado “espontánea” y se observa en primates Platyrrhini (monos del Nuevo Mundo) y Catarrhini (monos del Viejo Mundo + Hominoidea), murciélagos de los clados Microchiroptera (*Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Molossus ater* y *Myotis ricketti*) y Megachiroptera (*Rousettus leschenaultia*), la musaraña elefante y el ratón espinoso de la familia Muridae *Acomys cahirinus* (Emera y col., 2012; Bellofiore y col., 2017; Catalini y Fedder, 2020). Este proceso que conduce a la formación de una decidua involucra a mecanismos de señalización complejos en los que participan factores de transcripción, citoquinas, factores de crecimiento, mediadores lipídicos y otras moléculas reguladoras (Lee y col., 2007; Das, 2010; Gao y col., 2015). En la implantación, las células deciduales están asociadas con la modulación de genes relacionados con la respuesta inmune innata (Kin y col., 2016), el tráfico de leucocitos hacia el útero (Erlebacher, 2013), la producción de hormonas como la prolactina, la invasión del trofoblasto y su regulación, también con la comunicación intercelular de los tejidos embrionarios/fetales y maternos (Pavličev y col., 2017; Stadtmauer y Wagner, 2020). A partir de estudios realizados con las especies *Dasypus novemcinctus* (armadillo), *Procavia capensis* (hyrax), *Oryctolagus cuniculus* (coneja) y *Monodelphis domestica* (comadreja), se ha propuesto que, en el linaje euterio, la respuesta inflamatoria ancestral asociada a la implantación suprimió uno de sus módulos perjudiciales a la preñez, el reclutamiento de neutrófilos por la citocina IL-17A. Además, se demostró que esta

supresión fue mediada por células estromales deciduales, un nuevo tipo de célula que surgió durante la evolución de los mamíferos euterios. Estos resultados proporcionar una comprensión mecanicista de las primeras etapas de la evolución de la gestación de los euterios (Chavan y col., 2021).

A medida que avanza la implantación, los componentes del blastocisto se diferencian. En el caso del Tr puede originar distintas poblaciones celulares con funciones diferentes. En la cabra y la oveja se diferencia a células gigantes mono, bi o trinucleadas con funciones endocrinas. Mientras que, en los roedores múridos y humanos, a sincitiotrofoblasto, trofoblasto invasivo intersticial y trofoblasto invasivo endovascular, con funciones endocrinas, de transporte, de intercambio y de remodelación tisular. Además, en los roedores múridos también puede dar origen a las células trofoblásticas glucogénicas con funciones de reserva energética. La diferenciación del Tr en las distintas poblaciones requiere de ciertos factores de transcripción (Knott y Paul, 2014). Por ejemplo, estudios en ratones *knockout* demostraron que factores como GCM1 (Anson-Cartwright y col., 2000), HIF (Cowden Dahl y col., 2005), PPAR γ (Parast y col., 2009) son esenciales para la diferenciación del Tr.

Además de las funciones anteriores, el Tr tiene funciones de defensa ya que participa en mecanismos celulares de protección fetal. El Tr modula el sistema inmunológico materno evadiendo y reduciendo los factores desencadenantes del rechazo inmunológico (Erlebacher, 2013) y proporciona una función de barrera esencial (Burton y col., 2016). A su vez, las células del Tr especializadas previenen exposiciones adversas a través de la biotransformación de agentes potencialmente dañinos y facilitan su éxodo a través de transportadores de salida (Joshi y col., 2016). Independientemente de la gran variabilidad interespecífica, las variedades del trofoblasto facilitan la adaptación del *conceptus* a la vida intrauterina, y al

constituir una parte fundamental de la placenta le proporcionan la funcionalidad que garantiza la supervivencia y el crecimiento exitoso del embrión o el feto (Soares y Varberg, 2018).

Por su parte, el MCI origina dos capas, el hipoblasto y el epiblasto (Figura 8 a). El hipoblasto, o endodermo primitivo, se forma a partir de las células del MCI que están en contacto con el blastocele. Este origen implica la participación de diferentes factores de transcripción, por ejemplo, en el MCI del blastocisto medio y en el epiblasto de blastocisto tardío de ratones se ha encontrado la presencia de los factores OCT4, SOX2, NANOG, SALL4, KLF2, KLF4, ESRRB, GBX2 y TFCEP2L (Ralston y Rossant, 2008; Pfeffer, 2018). Las células restantes del MCI conforman al epiblasto que, tras un ordenamiento regular, formará al disco embrionario. Así, se origina un embrión bilaminar con un hipoblasto que dará origen al saco vitelino y un epiblasto del cual se desarrollarán las capas u hojas germinales embrionarias. La descripción previa se basa en estudios realizados en el ratón, el modelo de mamífero más utilizado en estudios de biología del desarrollo. Sin embargo, pueden existir algunas variaciones entre los diferentes grupos de mamíferos. Luego de la diferenciación en dos capas, se inicia la gastrulación, evento que da origen a la gástrula (Figura 8 b). La gástrula presentará al precursor de la cavidad digestiva y las tres capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo, a partir de diferentes movimientos celulares. Dependiendo del tiempo especie-específico, alrededor de los primeros 15 días del desarrollo de algunas especies, se genera un engrosamiento del disco embrionario en lo que será el extremo caudal del embrión. Dicho engrosamiento se debe, inicialmente, a que las células se vuelven más altas y, posteriormente, a la convergencia de las células migrantes del epiblasto en la línea media. De esta forma se establece la línea primitiva, como respuesta a la inducción del hipoblasto sobre el epiblasto. Como consecuencia de la convergencia se forma un surco primitivo en el interior de la línea primitiva que posee sus bordes

engrosados. Estos últimos reciben el nombre de crestas primitivas. Por otro lado, en el extremo craneal de la línea primitiva hay un engrosamiento redondo, el nodo primitivo (Figura 8 c). Este tiene una fosa primitiva central a partir de la cual ingresan células desde el epiblasto hasta el blastocele (Gilbert y Barresi, 2018).

Como se mencionó anteriormente, la gastrulación involucra movimientos celulares. Las primeras células epiblasticas se invaginan en la línea primitiva son aquellas que desplazan a las células del hipoblasto hacia los laterales y forman al endodermo embrionario definitivo (Gilbert y Barresi, 2018) (Figura 8 d). Las células del hipoblasto al igual que las trofoblásticas también contribuyen a la formación de la placenta (Frankenberg y col., 2016). El desplazamiento se facilita porque las células epiblasticas dejan de expresar moléculas de adhesión intercelular, pero expresan moléculas de adhesión con la matriz extracelular. Un segundo desplazamiento de las células epiblasticas es hacia el espacio existente entre el epiblasto y el endodermo primitivo. Estas células dan origen a otra de las hojas embrionarias, el mesodermo. Las células que ingresan en la fosita forman el proceso cefálico (que originará el endodermo cefálico y la placa precordial mesodérmica) y la notocorda. La notocorda se constituye en el eje del embrión. A medida que la notocorda se alarga hacia el extremo craneal, la línea primitiva y el nodo primitivo regresan hacia el extremo caudal. Las restantes células del epiblasto, que no migran, originan al ectodermo. La presencia de un embrión tridérmico marca la finalización de la gastrulación. Además, durante la gastrulación se establecen los ejes craneocaudal e izquierda-derecha del embrión como respuesta a diferentes morfógenos y a los consecuentes cambios en su forma. Algunos morfógenos involucrados en el establecimiento de estos genes en los embriones de vertebrados son los que se agrupan dentro de las familias de las BMP, TGF- β , FGF y el AR (Takebayashi-Suzuki y Suzuki, 2020). Adicionalmente,

durante la gastrulación se modifica el aspecto del embrión que al inicio presenta forma discoidea, mientras que al final es piriforme (Gilbert y Barresi, 2018).

La etapa siguiente a la gastrulación es la neurulación. Si bien el nombre de neurulación refiere a uno de los hechos más evidentes que es la formación del sistema nervioso, pero también se forman los esbozos de los restantes sistemas, se produce la metamerización (evidenciable en las estructuras conocidas como somitas) y la formación del celoma (celomación). La neurulación se inicia con el engrosamiento del ectodermo situado por encima de la notocorda, que recibe el nombre de placa neural. Esto es consecuencia del efecto inductor de la notocorda sobre el ectodermo. Los bordes de la placa neural reciben el nombre de crestas neurales. Estas, luego de converger y fusionarse dorsalmente, dan origen al tubo neural (Gilbert y Barresi, 2018). Las crestas neurales están conformadas por células que tienen la particularidad de migrar lejos de su fuente de origen. Para esto deben reconocer y responder a señales que las guían a lo largo de las rutas migratorias específicas hasta sus destinos finales (Cambiaggi y Terminello Correa, 2020). En estos dan origen a diferentes linajes celulares, tejidos y estructuras corporales (Krmptotic y col., 2021) (Figura 8 e).

La formación del tubo neural no implica su cierre completo, ya que sus extremos craneal y caudal permanecen abiertos y se denominan neuroporos craneal y caudal, respectivamente. En la neurulación también se produce la diferenciación del mesodermo en axial, paraxial, intermedio y lateral. El mesodermo axial formará la notocorda, mientras que el paraxial y el intermedio a las somitas y el sistema urogenital, respectivamente (Gilbert y Barresi, 2018). En esta diferenciación participan ciertas vías de señalización como la de las proteínas Hedgehog y la de los FGFs (Guzzetta y col., 2020). Las somitas son estructuras pares, segmentadas y continuas que se disponen a ambos laterales de la notocorda (Gilbert y Barresi, 2018) y cuya formación involucra la expresión de múltiples

genes que pertenecen a distintas vías de señalización como Notch, WNT y FGFs (Dequéant y col., 2006; Ferjentsik y col., 2009). Cada somita se diferencia en tres partes que son el dermatomo, el miotomo y el esclerotomo; de cada una de ellas derivarán diferentes estructuras (Figura 8 f). Del dermatomo deriva la dermis. El miotomo, dará origen a los músculos esqueléticos, mientras que del esclerotomo se formarán estructuras cartilagosas y óseas, tales como, vértebras, costillas y esternón. Estas diferenciaciones regionales ocurren como respuesta a los efectos inductores provenientes, principalmente, de la notocorda y la placa neural. Por su parte, el mesodermo lateral, que no es segmentado, se divide en dos hojas, parietal o somática y visceral o esplácnica. La somática se fusiona al ectodermo y constituye a la somatopleura de la que se originan la pared corporal ventral y lateral, y también los huesos de los miembros. En cambio, la hoja esplácnica junto con el endodermo forma a la esplacnopleura de la cual deriva la hoja visceral del peritoneo y la pared de las vísceras. Entre la somatopleura y la esplacnopleura se origina una cavidad, el celoma, este proceso es conocido como celomación. En la neurulación, como en la gastrulación, el embrión cambia de forma, pero en este caso adopta una forma tubular debido a plegamientos. Luego de esta etapa que involucra cambios de forma, tamaño, diferenciación y metamerización, se inicia la organogénesis. Durante ella prosigue el desarrollo de los esbozos de los diferentes órganos, pero, aunque estos adquieran el aspecto que tendrán en el animal adulto aún no presentan las características histológicas definitivas. Por lo tanto, la etapa siguiente es la histogénesis. En esta los esbozos de los órganos adquieren sus características microscópicas propias (Gilbert y Barresi, 2018). Por ejemplo, la organogénesis del sistema reproductor de hembra de los roedores de laboratorio, los animales domésticos y la humana está completa al momento del parto, pero su estructura histológica definitiva, solo se alcanza durante el desarrollo posnatal (Spencer y col., 2005).

La embriogénesis va acompañada del desarrollo de los anexos extraembrionarios y posteriormente de la placenta, debido a que estos son esenciales para la ontogenia prenatal. En los mamíferos, como en todos los amniotas, los anexos embrionarios son el saco vitelino, el amnios, el alantoides y el corion. En principio, el embrión y estos anexos conforman a la vesícula germinal. Luego, se denomina saco embrionario (Figura 8 g). Finalmente, cuando culmina la organogénesis y el embrión se transforma en feto, la estructura conjunta se denomina saco fetal (Barbeito y col., 2020).

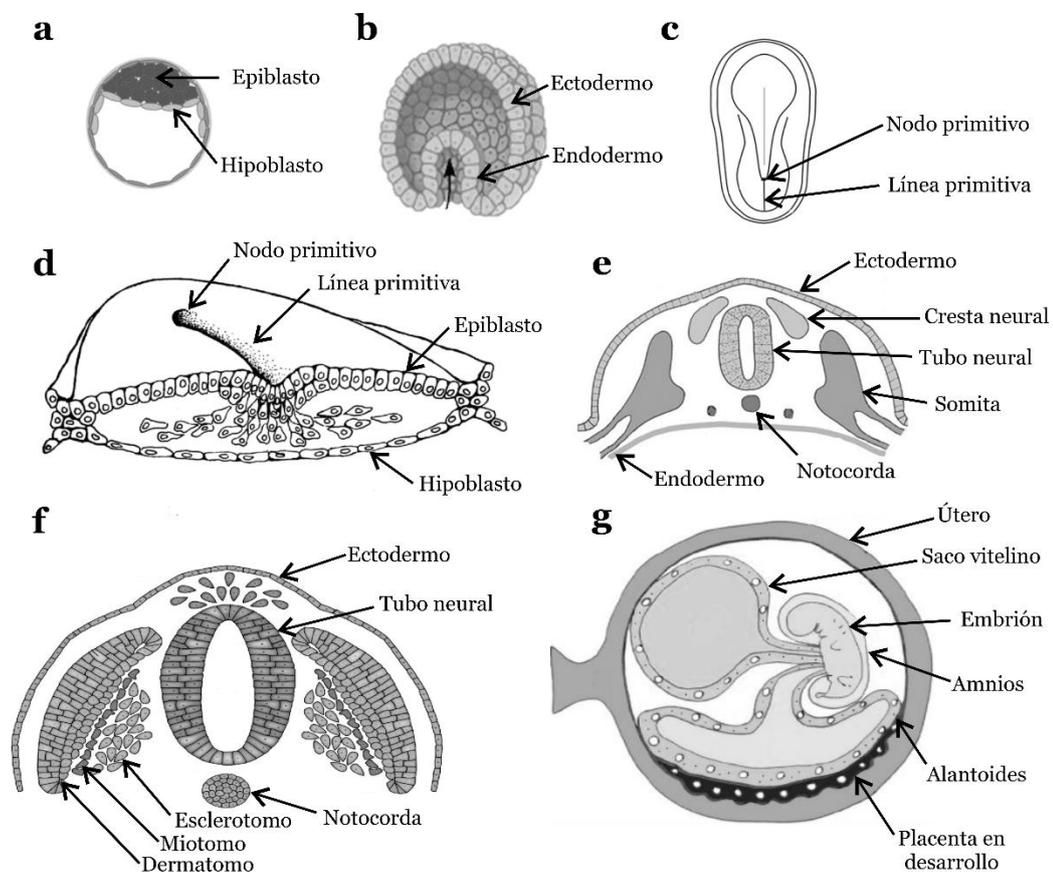


Figura 8. Eventos del desarrollo embrionario temprano en mamíferos euterios. **a.** Blastocisto; **b.** Gástrula; **c.** Establecimiento de la línea primitiva y el nodo primitivo; **d.** Migración de células epiblasticas a través de la línea primitiva; **e.** Neurula; **f.** Diferenciación de las somitas en dermatomo, miotomo y esclerotomo; **g.** Saco embrionario conformado por el embrión y las membranas extraembrionarias. Imagen extraída y modificada de: <https://veteriankey.com> (a-f) y Carter y Mess, 2014 (g).

El saco vitelino se encuentra delimitado por una pared que está constituida por el hipoblasto y la hoja esplácnica del mesodermo extraembrionario. En estados tempranos del desarrollo, tanto el saco vitelino como el intestino embrionario conforman al intestino primitivo. Posteriormente, y debido al plegamiento del embrión que ocurre en la neurulación, ambas estructuras quedan separadas pero comunicadas mediante el pedículo vitelino. Así, el intestino queda restringido al interior del cuerpo embrionario, mientras que el saco vitelino forma parte de las estructuras extraembrionarias. Este saco tiene varias funciones. Entre ellas, la nutricia y la de originar a linajes celulares o tejidos. Por un lado, las células epiblasticas que llegan hasta este anexo originan a las células germinales primitivas a partir de las cuales se formarán las futuras gametas. Por otro lado, del mesodermo del saco vitelino se forman los islotes hemangiogénicos de los que surgirán las primeras células y vasos sanguíneos. En algunas especies, el saco vitelino involucre conforme avanza el desarrollo, aunque en otras se mantiene siempre presente.

El mesodermo extraembrionario y los amnioblastos derivados del trofoblasto originan el amnios. Este proceso se conoce como amniogénesis y puede darse por dos mecanismos, cavitación o plegamiento. En el primero, el amnios se origina a partir de una cavidad formada por encima del embrioblasto, esto se observa en los órdenes quiróptera, insectívora y primates. En cambio, en la amniogénesis por plegamiento hay formación de pliegues del trofoblasto y la somatopleura desde las regiones laterales, craneal y caudal, que confluyen por encima y hasta el centro del embrión. La fusión de los pliegues da como resultado la formación de dos cavidades. Una corresponde a la cavidad amniótica y la otra al celoma extraembrionario. Las células epiteliales que conforman al amnios (amnioblastos) secretan los componentes del líquido amniótico que está contenido en la cavidad amniótica, dentro de la cual también se encuentra el embrión. El

líquido amniótico mantiene humectado al embrión, recoge los productos de desechos del metabolismo y amortigua potenciales golpes que podrían dañar al individuo en desarrollo.

Otros anexos extraembrionarios son el alantoides y el corion. El alantoides se conforma por el endodermo y la hoja visceral del mesodermo extraembrionario. Este anexo constituye la pared de la vesícula alantoidea, estructura alargada, llena de líquido, y que se mantiene unida al intestino del embrión mediante el tallo alantoideo. La función del alantoides es la acumulación de desechos metabólicos que posteriormente son excretados por la placenta (Carlson, 2014; Gilbert y Barresi, 2018). La forma y la función del alantoides no es homogénea entre los mamíferos. En los roedores y muchos primates, el alantoides es pequeño y macizo, y no recoge desechos. El alantoides se introduce en el celoma extraembrionario y une al corion para formar la membrana corioalantoidea, porción fetal de la placenta. También forma parte del cordón umbilical, y origina a los vasos sanguíneos que lo conforman (Barbeito y col., 2020).

El corion, es el anexo extraembrionario más externo de la vesícula embrionaria/fetal y se origina a partir de la unión del trofoblasto con la hoja somática del mesodermo extraembrionario. Este anexo forma vellosidades que aumentan la superficie de contacto con los tejidos del endometrio. Inicialmente, todo el corion presenta vellosidades, corion difuso, pero luego conforme avanza el desarrollo estas quedan restringidas a zonas particulares, corion frondoso. Otras zonas quedan desprovistas de vellosidades, en ellas, el corion es liso. Las vellosidades no son homogéneas. Cuando están recién formadas son macizas y se componen exclusivamente de células epiteliales (trofoblasto), esta variedad de vellosidades se denomina primaria. Posteriormente, también poseen un eje de tejido conectivo, en este caso son las vellosidades secundarias. Al momento que

están vascularizadas por vasos sanguíneos derivados del saco vitelino o el alantoides se denominan terciarias. El corion cumple numerosas funciones, entre ellas, el intercambio de desechos, nutrientes y gases con la madre. Como se mencionó en la descripción de la placenta, también participa en la producción de hormonas y enzimas, en el almacenamiento de sustancias, etc. (McGeady, 2006; Carlson, 2014; Gilbert y Barresi, 2018).

f. *Lagostomus maximus*, sistemática y ecología

Entre los mamíferos, el orden Rodentia constituye un grupo monofilético, según evidencias moleculares y morfológicas (Luckett y Hartenberger, 1993). El mismo se encuentra constituido por especies nativas de todos los continentes, excepto la Antártida (Musser y Carleton, 2005). Tanto su expansión como la colonización de nuevos ambientes dieron lugar a adaptaciones morfológicas que se reflejan en la gran diversidad que existe en el orden (Steppan y col., 2004; Fabre, y col., 2012). En 1855, Brandt se basó en la morfología de la mandíbula y el cráneo y la posición del músculo masetero para clasificar a los roedores en tres grandes grupos: Sciuromorpha, Myomorpha y Hystricomorpha. Actualmente hay 2277 especies divididas en 33 familias (Wilson y Reeder, 2005), cuyo agrupamiento es muy variable según cuál sea el carácter molecular utilizado para construir la filogenia. Para esta tesis se tomó como base el estudio filogenético realizado por Veniaminova y col., (2007), quienes a partir del análisis estructural del retroposón corto B1 agruparon a las familias en los clados I, II y III. Este trabajo se centró específicamente en el clado II. Dentro del mismo, con excepción de la familia Ctenodactylidae, se encuentran los Hystricognathi⁸ (Huchon y Douzery, 2001; Hautier y col., 2011). Los histricomorfos son los roedores de las familias

⁸ A lo largo de este trabajo se utilizará la palabra histricomorfos para hacer referencia a los Hystricognathi sudamericanos, también denominados caviomorfos.

Hystricidae, Thryonomyidae, Dasyproctidae, Hydrochoeridae, Caviidae, Octodontidae, Myocastoridae y Chinchillidae (Veniaminova y col., 2007) (Figura 9).

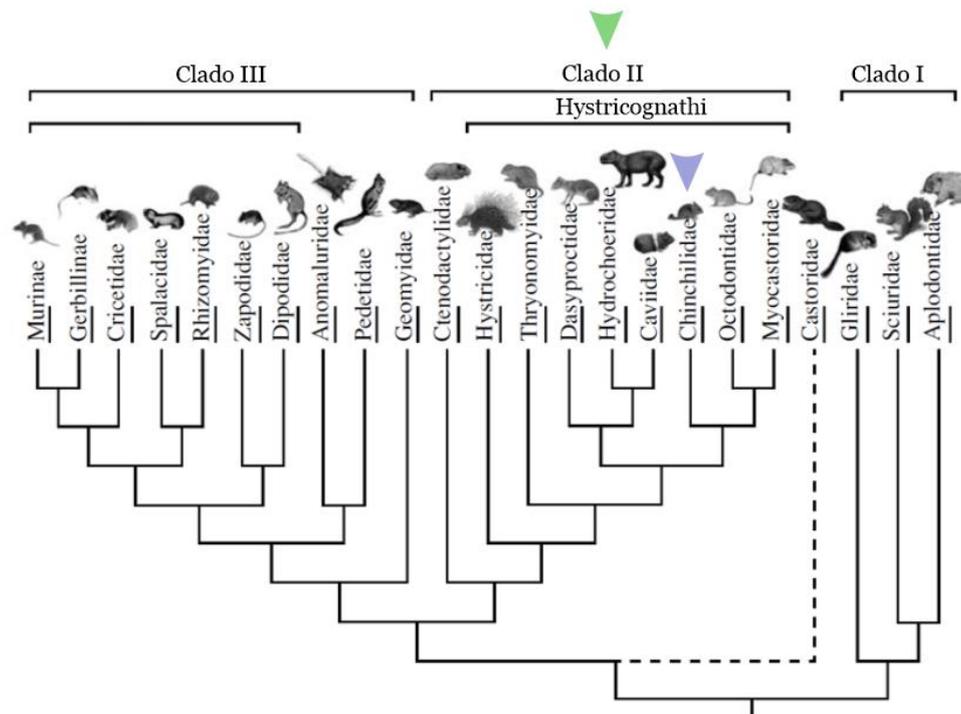


Figura 9. Filogenia del orden Rodentia inferida del análisis estructural del retroposón corto B1. Clado II, Ctenohystrica: Ctenodactylidae + Hystricognathi, cabeza de flecha verde. Familia Chinchillidae, cabeza de flecha lila. Extraído y modificado de Veniaminova y col., 2007.

La familia Chinchillidae incluye a las subfamilias Chinchillinae que incluye a los géneros *Chinchilla* y *Lagidium*, y Lagostominae con el género *Lagostomus* (Rasia y col., 2021). El género *Lagostomus* está representado por una especie, *Lagostomus maximus* (Desmarest, 1817). Este roedor habita las llanuras de Bolivia, Paraguay y Argentina (Jackson y col., 1996), por este motivo su nombre vulgar es vizcacha de llanura⁹ (Figura 10). *L. maximus* es una especie nocturna, gregaria, semi-fosorial y de vida subterránea ya que habita, casi todo el del tiempo,

⁹ A lo largo esta tesis se usará el término “vizcacha” para referirse a *Lagostomus maximus*, ya que existen otros tipos de vizcachas.

dentro de cuevas extensas con galerías intrincadas, denominadas vizcacheras, que le otorgan un sitio propicio para la reproducción, la alimentación y la protección (Llanos y Crespo, 1952; Branch y col., 1993; Jackson y col., 1996; <https://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/lagostomus-maximus>).



Figura 10. *Lagostomus maximus*, vizcacha.

La vizcacha es uno de los roedores histricomorfos con mayor tamaño, y junto a las especies *Dinomys branickii* (pacarana), *Cuniculus paca* (paca), *Myocastor coypus* (coipo) e *Hydrochoerus hydrochaeris* (carpincho) superan a los restantes integrantes del orden Rodentia (Vucetich y col., 2015; Álvarez y col., 2017). La vizcacha presenta un cuerpo robusto con miembros torácicos cortos y pélvicos largos. El pelaje es variable según el sexo, la edad y la época del año. Este es corto, de textura sedosa y color gris jaspeado, aunque ciertas partes son blancas como los flancos y el vientre. El pelaje de la cabeza contiene tres franjas. La primera es de color negro y se extiende entre los ojos. Una segunda franja blanca se ubica por debajo de la primera y se proyecta desde una oreja a la otra. Por último, se encuentra otra franja negra que se extiende desde una articulación mandibular hasta la otra. Esta última está formada por cerdas gruesas y resulta más notable en

los machos que en las hembras. Si bien esta característica establece dimorfismo sexual, el mismo resulta más evidente por la longitud total del cuerpo y el peso. Las hembras miden y pesan entre 55-70 cm y 3,4-5 kg, respectivamente. En cambio, los machos entre 70-80 cm y 5-8,8 kg (Llanos y Crespo, 1952; <https://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/lagostomus-maximus>).

En la República Argentina, *L. maximus* habita las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Salta, San Juan, Santa Fe, San Luis, Santiago del Estero y Tucumán (Jackson y col., 1996; <https://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/lagostomus-maximus>). Esta ha sido objeto de estudios diversos, entre ellos, ecológicos, endocrinológicos, nutricionales, morfológicos y reproductivos desde el 1900 a la actualidad (Llanos y Crespo, 1952; Weir 1971a, b; Domínguez y col., 1987; Villarreal y col., 2008; Godoy Pieri y col., 2014; Hedrick y col., 2017; Abba y col., 2018; Flamini y col., 2021; Tano de la Hoz y col., 2016, 2017, 2019).

g. Reproducción en *Lagostomus maximus*

Las características morfológicas y fisiológicas del sistema reproductor de la hembra se conocieron a partir de los estudios realizados en la década de 1970 por Barbara Weir, una investigadora del *Institute of Comparative Physiology de la Zoological Society of London*, a partir de una colonia conformada por ejemplares de ambos sexos que transportó desde la Argentina a Inglaterra. En esos estudios se determinó que el sistema reproductor de la hembra consta de ovarios, trompas uterinas, útero bicorne y vagina (Weir, 1971b). La forma de los ovarios de *L. maximus* es atípica dentro de los mamíferos en general e inclusive dentro de los histricomorfos; ya que, además de ser planos, son irregulares debido a que poseen múltiples pliegues. Esta estructura guarda relación con la capacidad poliovulatoria, cuya tasa ovulatoria es de unos 200-800 ovocitos por estro (Weir, 1971b). En el año

2009, Flamini y col., realizaron una descripción detallada de la morfología microscópica de los ovarios en los estados anestro, fase folicular, hembras con preñez temprana y a término. En el anestro observaron folículos ováricos en crecimiento, cuerpos lúteos escasos y folículos atrésicos. En cambio, las hembras en fase folicular presentaron un número mayor de folículos ováricos en desarrollo, con respecto a las hembras en anestro, y predominancia de folículos ováricos terciarios. También se evidenció la presencia de cuerpos lúteos primarios y secundarios. Por su parte, en las hembras con preñez temprana se observó el predominio de cuerpos lúteos primarios y escasos folículos ováricos en crecimiento, mientras que en las hembras con preñez a término predominaron los cuerpos lúteos. Estas estructuras ováricas observadas en los cuatro estados reproductivos se asemejan parcialmente con las presentes en las fases folicular y luteal del ciclo estral de otros mamíferos. Por otro lado, el tamaño de estas estructuras también es menor con respecto al de otras especies, esto podría deberse a que en la vizcacha se encuentran en mayor cantidad. Los ovarios en los cuatro estados estudiados por Flamini y col., (2009) presentaron folículos calcificados. Si bien la presencia de depósitos de calcio en los ovarios es rara entre los mamíferos, se ha observado en la corteza ovárica de mandriles (Ishmael, 1975) y en el estroma ovárico de la mujer (Clement y Coney, 1992).

Diversos estudios intentaron dilucidar el origen de la poliovulación en la vizcacha. A través de técnicas de inmunohistoquímica y *Western Blot* se determinó una expresión sostenida e incrementada del gen BCL2 inhibidor de la apoptosis en las células foliculares/granulosas de todos los folículos ováricos y una baja expresión del gen BAX inductor de la apoptosis en las células de la granulosa de los folículos ováricos preantrales y antrales. Estas expresiones diferenciales de ambas proteínas podrían ser responsables de suprimir la atresia folicular en el ovario de la hembra adulta (Jensen y col., 2008). Estos resultados son indicativos de una

inversión en la relación entre la expresión de BCL-2 / BAX en el ovario de la vizcacha, con respecto a lo que ocurre en otros mamíferos euterios, con una expresión aumentada de BCL-2 frente a una expresión restringida de BAX. Se ha encontrado, en general, que la proteína BAX proapoptótica tiene una expresión mejorada en el ovario de mamífero, mientras que el antiapoptótico BCL-2 se expresa a niveles constitutivos (Rodger y col., 1995; Tilly y col., 1995; Rueda y col., 1997). Además, la elevada expresión del RE- α respalda la hipótesis de una mayor supervivencia folicular y una foliculogénesis continua en esta especie (Jensen y col., 2006). En un estudio posterior se determinó que el número de células germinales aumenta continuamente desde el desarrollo temprano hasta las etapas prepúberes, a través de un patrón de desarrollo basado en la falta de eliminación intraovárica masiva de células germinales y la generación de una gran cantidad de nuevas ovogonias. Esto difiere del patrón encontrado en otros euterios, en los que la formación de nuevas ovogonias es escasa o nula luego del nacimiento y, en cambio, se pierden muchas de estas células por apoptosis. La persistencia de un número considerable de ovogonias y ovocitos primarios en los ovarios prepuberales proporciona apoyo a la hipótesis de que exista un mecanismo de renovación folicular a través de la ovogénesis *de novo* en la vida adulta (Inserra y col., 2013).

Esta ovulación masiva requiere de una remodelación de la arquitectura ovárica para mantener la disponibilidad de folículos primordiales inactivos a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. A través de marcadores de autofagia, BECN1, LAMP1 y LC3B-I / II, y de apoptosis, BCL2 y Caspasa-3, se observaron comportamientos interactivos entre ambos procesos. Los autores proponen que la autofagia podría promover la supervivencia o la muerte celular programada dependiendo de la estructura ovárica analizada. Los marcadores de autofagia se observaron en folículos atrésicos y cuerpos lúteos en regresión que también

expresaban Caspasa-3. Los folículos sanos mostraron una expresión baja de marcadores de autofagia, una expresión fuerte de BCL2 y nula de Caspasa-3 (Leopardo y col., 2020). El análisis a nivel ultraestructural reveló una elevada formación de autofagosomas, autolisosomas y lisosomas en folículos atrésicos y cuerpos lúteos en regresión y un bajo número de vesículas autofágicas en folículos normales. Por su parte, la coexpresión de LC3B-BECN1, LC3B-LAMP1 y LC3B-Caspasa-3 se determinó por inmunofluorescencia en folículos atrésicos y cuerpos lúteos en regresión, mientras que la coexpresión de BCL2-BECN1 se encontró en folículos normales. A partir de estos resultados, se postuló que la autofagia podría actuar como un mecanismo para eliminar los folículos alterados y los cuerpos lúteos remanentes, proporcionando el espacio necesario para la maduración de los folículos primordiales que ingresan continuamente al conjunto de folículos en crecimiento necesarios para mantener una ovulación masiva (Leopardo y col., 2020).

Otra característica de la biología ovárica de la especie es la persistencia de los cuerpos lúteos (CL) durante toda la gestación. Estos CL son abundantes y no presentan signos luteólisis, incluso al final de la gestación. Estos resultados, junto a los obtenidos durante el estudio de la inhibición de la atresia folicular, determinan que el ambiente ovárico de *L. maximus* es inusual ya que la proteína antiapoptótica BCL2 no solo evita la muerte de las células germinales, sino que también preserva la integridad estructural y la funcionalidad de los cuerpos lúteos en la gestación. La sobreexpresión del gen BCL2 antiapoptótico puede representar una estrategia en la funcionalidad del ovario y los cuerpos lúteos para mantener la preñez hasta el parto (Jensen y col., 2006, 2008).

En la gestación intermedia de *L. maximus* hay decrecimiento en los niveles séricos de P4, esto ocasiona la reactivación del eje HHG que activa el desarrollo folicular y la pseudoovulación a mitad de la gestación (Jensen y col., 2006;

Fraunhoffer y col., 2017). En consecuencia, hay formación de cuerpos lúteos secundarios o accesorios (que mantienen el ovocito en su interior) y un nuevo incremento de los valores de P4 (Dorfman y col., 2013). El decrecimiento en el nivel sérico de P4 en la gestación intermedia se ha relacionado con la muerte embrionaria diferencial de la especie (Fraunhoffer y col., 2017).

Recientemente se realizó un estudio sobre proliferación, pluripotencialidad y angiogénesis en los ovarios de *L. maximus* durante momentos diferentes de su ontogenia (feto y adulto). Mediante estos estudios se determinó que los pliegues que aumentan la superficie y facilitan la poliovulación ya se observan en la vida prenatal. Además, se determinó la alta proliferación y la potencialidad de las ovogonias con los marcadores PCNA y OCT-4. Además, se detectó a VEGF, marcador de angiogénesis, en el tejido intersticial que rodea a las ovogonias de los ovarios fetales y en el endotelio de los vasos sanguíneos próximos a los folículos ováricos secundarios y los cuerpos lúteos de los ovarios de la hembra adulta. Esto demuestra el rol fundamental de la angiogénesis tanto en el desarrollo prenatal como durante toda la vida reproductiva de la hembra (Flamini y col., 2020). Todos estos estudios intentan comprender las bases biológicas de la poliovulación en la especie, ya que si bien es un proceso que ocurre en muchos mamíferos (McNatty y col., 2005), en ninguna especie alcanza la magnitud observada en la vizcacha. La corteza ovárica en *L. maximus* presenta células intersticiales que forman agrupamientos denominados tejido intersticial (Gil y col., 2007) rodeando a los folículos y en el caso de las hembras preñadas también a los cuerpos lúteos. La distribución y la morfología del tejido intersticial ovárico son variables entre los diferentes mamíferos (Guraya y Greenwald, 1964). En algunos roedores, como *Cavia porcellus* (Caviidae) y *Myoprocta acouchi* (Dasyproctidae), el tejido intersticial es escaso (Rood y Weir, 1970; Weir, 1971d; Weir y Rowlands, 1974). En cambio, en *Dasyprocta leporina* (Dasyproctidae, Weir, 1971c) y *Myocastor coypus*

(Myocastoridae, Hillemann y col., 1958; Felipe y col., 1999) es abundante. Estas células del tejido intersticial se generan por diferenciación de las células tecales de folículos atrésicos (Guraya y Greenwald, 1964; Weir y Rowlands, 1974). En la vizcacha, las células son eosinófilas y con núcleos hipercromáticos (Flamini y col., 2009). La eosinofilia también fue observada en las células intersticiales ováricas durante la preñez del *Octodon degus* (Octodontidae), y se postuló que podrían estar involucradas en la síntesis de esteroides (Weir, 1974).

En cuanto a las trompas uterinas, estos órganos tubulares presentan un recorrido muy tortuoso y se unen al ovario mediante el mesovario (Weir, 1971b). Flamini y col., (2009) describieron las características específicas del órgano en distintos estados reproductivos. En las trompas uterinas de las hembras en anestro hay una gran cantidad de células mucosas en el epitelio luminal, mientras que en las hembras en fase folicular predominan las células ciliadas. En cambio, en las hembras preñadas se observan células ciliadas y secretoras en proporciones variables según la gestación sea temprana o a término (Flamini y col., 2014). En este órgano la presencia de células mucosas y cilias se relaciona con la producción de fluido oviductal y el movimiento del mismo como así también de los ovocitos y blastocistos, funciones idénticas a las que poseen en otros mamíferos.

El útero es bicorne, y su estructura histológica es similar a la del útero de otros euterios. Sin embargo, existen algunas variaciones relacionadas con el estado reproductivo. Las hembras en anestro presentan un epitelio luminal con células casi exclusivamente secretoras, mientras que el de los otros estados también contiene células ciliadas. En relación a las glándulas uterinas, en el anestro son escasas, mientras que son abundantes durante la fase folicular. En el útero de hembras con gestación temprana, las glándulas son profundas y tortuosas, y particularmente en hembras con preñez a término hay decrecimiento en el número de estas (Flamini y col., 2019). Esta observación se relaciona con el importante rol

de las glándulas uterinas durante el periodo pre-implantacional y las primeras etapas del desarrollo (Kelleher y col., 2018, 2019). Por su parte, la lámina propia endometrial también presenta variaciones según el estado fisiológico de la hembra. En el anestro, se observaron muchos fibroblastos, como así también células migrantes, principalmente linfocitos. Por su parte, las fibras de colágeno son delgadas y escasas. En las hembras preñadas, el tejido conjuntivo también es laxo, aunque con menos células. Los vasos sanguíneos son pequeños, congestivos y muy cercanos al epitelio superficial. Flamini y col., (2009) no solo detallaron las características histológicas del útero de hembras en anestro, fase folicular y con preñeces temprana y a término, también incorporaron datos histoquímicos, lectinhistoquímicos y morfométricos del órgano para cada estado. El uso de las técnicas histoquímicas y lectinhistoquímicas, PAS, AB a diferentes pHs y lectinas biotiniladas, mostró un patrón de marcación para glicoconjugados de los epitelios luminal y glandular variable según el estado fisiológico. Por su parte, el estudio morfométrico mostró variaciones significativas entre los úteros de las hembras de los cuatro estados. Por ejemplo, el espesor del miometrio fue mayor en las no preñadas que en aquellas con gestación avanzada. En este último caso, las fibras musculares forman una túnica delgada, como consecuencia de la dilatación que tiene el útero durante la gestación. En cuanto a la túnica más externa del útero, el perimetrio, este no presentó diferencias morfológicas e histoquímicas entre los estados analizados.

En la vizcacha, el útero carece de cuerpo uterino y, por lo tanto, está conformado por los cuernos uterinos y el cuello o cérvix. Este último no se evidencia externamente, e internamente es doble debido a la presencia de un tabique intermedio que se proyecta desde la bifurcación de los cuernos uterinos hasta el tercio medio de la vagina. Este cérvix doble no es exclusivo de la vizcacha debido a que está presente en otros histricomorfos como la chinchilla, el coipo

(Hafez, 1970) y el agutí negro (Mayor y col., 2011). En otros histricomorfos como *Cavia porcellus* (Breazile y Brown, 1976; dos Santos y col., 2016), *Galea spixii* (dos Santos y col., 2014) y *Atherurus africanus* (Mayor y col., 2003) el cuello uterino es único. Este tipo de cérvix también se observa en roedores miomorfos como la rata y el ratón (da Costa Ferreira Junior, 1995; Graham, 1966). Por lo tanto, el tipo de cuello uterino no parece tener valor taxonómico entre los roedores (Flamini y col., 2019). Como ocurre en otros histricomorfos (Felipe y col., 1998), el cuello uterino se divide en un endocérvix y un exocérvix según las características de su mucosa. La mucosa del endocérvix tiene una estructura similar a la del cuerno uterino, pero su inicio se reconoce por la ausencia de glándulas (Flamini y col., 2019), como también se observa en el coipo (Felipe y col., 2002) y el agutí negro (Mayor y col., 2011). En algunos momentos del ciclo reproductivo, el endocérvix tiene un epitelio bistratificado con células mucosas superficiales, en la bibliografía consultada no se ha encontrado que ninguna especie posea este tipo de epitelio en el endocérvix. A diferencia del endocérvix, el exocérvix posee un epitelio estratificado. La transición entre ambos epitelios es similar a la encontrada en la rata, el ratón (da Costa Ferreira Junior, 1995; Graham, 1966) y el coipo (Felipe y col., 2001). El exocérvix carece de glándulas, a diferencia de lo que ocurre en otro histricomorfo, *Galea spixii*, donde estas persisten (dos Santos y col., 2014). El tejido conectivo del cuello uterino es muy celular, como en *Notomys mitchellii*; mientras que, en el ratón de las llanuras australianas, *Pseudomys australis*, hay abundantes fibras de colágeno (Breed, 1985). Otras características como la abundancia y la distribución de fibras elásticas no resultaron diferentes entre el exocérvix y el endocérvix de la vizcacha, a diferencia de los observado en la rata (Battlehner y col., 2003). Estas fibras influyen en la dilatación del canal del parto (Flamini y col., 2019), que debe ser mayor en hembras que paren crías proporcionalmente más grandes como los histricomorfos. En la descripción preliminar del cuello uterino de la vizcacha, Weir

(1971a) argumentó que este órgano no es musculoso. Sin embargo, Flamini y col., (2019) observaron la presencia de haces de fibras musculares, separados por abundante tejido conectivo, que no forman una capa muscular continua como se observa en otras especies de histricomorfos, entre ellos, el puercoespín (Mayor y col., 2002) y el agutí negro (Mayor y col., 2011).

La vizcacha hembra tiene una próstata, también denominada glándula parauretral o de Skene. Esta próstata es homóloga a la del macho, y su estructura fue descrita por Flamini y col., (2002). Recientemente otros aspectos, entre ellos, ultraestructurales, histoquímicos y lectinhistoquímicos fueron detallados en hembras sin y con gestación. La ausencia de diferencias mediante los estudios realizados entre los dos grupos fisiológicos parece indicar que el órgano no se modifica por variaciones de las hormonas sexuales (Flamini y col., 2021). La presencia de esta glándula no es homogénea entre las hembras de los mamíferos. En los Rodentia se halló en *Rattus rattus* (Shehata, 1972), *Arvicantihis niloticus* y *Meriones lybicus* (Shehata, 1975), *Rattus norvegicus* (Shehata, 1980), *Praomys natalensis* (Gross y Didio, 1987) y *Meriones unguiculatus* (Inomata y col., 1992). También se encontró en mujeres, y algunas especies de lagomorfos, carnívoros y quirópteros. La función de esta glándula aun es desconocida, por lo tanto, se requieren de futuros estudios tanto embriológicos como funcionales y evolutivos (Biancardi y col., 2017) para determinar su rol durante el proceso reproductivo.

El ciclo estral de la vizcacha dura 45 días. Durante el estro, la membrana de cierre vaginal está perforada, la vulva se tumefacta y secreta un moco amarillento. La vagina permanece abierta durante 7 días y el apareamiento, generalmente, ocurre hacia el final de este período. El coito puede determinarse por la presencia de sangre en la abertura vaginal y confirmarse por el hallazgo de tapones copuladores o espermatozoides en un frotis vaginal (Weir, 1971a). Los primeros aspectos relacionados con la gestación temprana de la vizcacha provienen de los

estudios de Roberts y Weir (1973). Muchos de estos resultados son similares a los encontrados para otros roedores histricomorfos (Roberts y Perry, 1974). Estudios recientes han actualizado la denominación de diferentes estructuras embrionarias, como así también nuevos datos relacionados al desarrollo ovárico y las células germinales primordiales (Leopardo y Vitullo, 2017).

La fertilización en la vizcacha ocurre en las trompas uterinas y solo un 10% de los ovocitos son fecundados (Figura 11 a). La tasa de segmentación de los cigotos de la vizcacha parece ser lenta ya que estos no ingresan al útero hasta el día 6 en la etapa de cuatro células. A los 10 días post coito (dpc), el útero presenta hiperemia postestro y carece de indicios macroscópicos de implantación. A los 13 dpc, se observa una pequeña cantidad de mórulas de aspecto normal flotando en la luz uterina (Roberts y Weir, 1973). Los blastocistos de todos los histricomorfos son similares en apariencia. Presentan una cavidad prominente, el blastocele, y un estrecho espacio perivitelino entre el trofoblasto y la zona pelúcida. Además, se observa un macizo celular interno rodeado por un delgado trofoblasto, en cambio el trofoblasto abembrionario¹⁰ es engrosado y miden entre 95-100 μm de diámetro. El tiempo de implantación es variable entre los roedores histricomorfos. En *Chinchilla lanígera* (chinchilla) ocurre a los 5,5 dpc, en *Proechimys guairae* (casiragua) entre los 6-6,5 dpc, mientras que en *Octodon degus* (degú) y *Cavia porcellus* (cobayo) entre los 6-7 dpc. En cambio, en la vizcacha a los 18 dpc. El intervalo entre la ovulación y la implantación en la vizcacha es el más largo registrado para cualquier roedor. En la pre-implantación, el blastocisto se localiza en el extremo antimesometrial de la luz uterina, y el trofoblasto abembrionario se orienta hacia el epitelio uterino (Roberts y Perry, 1974). En el cobayo, la zona pelúcida permanece intacta hasta justo antes de la implantación. En la pérdida de

¹⁰ Abembrionario: denominación del polo opuesto al ocupado por el macizo celular interno.

esta zona y en la unión del blastocisto al epitelio uterino intervienen los procesos pseudopodiales que se desarrollan en el trofoblasto del polo abembrionario del blastocisto. Estos hallazgos fueron confirmados por Blandau (1949), quien mostró que a medida que los procesos trofoblásticos se hacen más numerosos, penetran a la zona pelúcida, quien va desapareciendo gradualmente en esa región, y forman un "cono de unión" que penetra en el epitelio uterino. Tal como se menciona más adelante, los histricomorfos tienen similitudes en su patrón de desarrollo (Roberts y Perry, 1974) y, por lo tanto, estos procesos pseudopodiales podrían existir en la vizcacha.

Las observaciones realizadas en el casiragua, el coipo, el degu, la chinchilla y la vizcacha en el momento de la implantación sugirieron que el espaciamiento de los embriones a lo largo de los cuernos uterinos no es aleatorio. En la vizcacha, la mayoría de los blastocistos se encontraron en los extremos ováricos de los cuernos uterinos, lo que sugiere que el espaciamiento de los blastocistos ocurre cerca del momento de la implantación (Figura 11 b) (Roberts y Weir, 1973). La implantación en la vizcacha es intersticial y antimesometrial, al igual que en el coipo, el casiragua, el degu y la chinchilla, y podría iniciarse en respuesta al incremento gradual de E2 como sucede en los roedores múridos, pero no en otros histricomorfos como el cobayo (Roberts y Weir, 1973). En la vizcacha, los blastocistos próximos al cuello de cada cuerno uterino son los primeros en implantarse a los 18 dpc. En ellos se observó aposición, adhesión e invasión del endometrio (Figura 11 c-e), acompañados de una gran infiltración linfocitaria (Roberts y Weir, 1973). En úteros con un periodo de gestación de 18,5 dpc, los blastocistos de ambos cuernos uterinos se encontraron en tres situaciones espacio-temporales diferentes. Los caudales inmediatamente por debajo del epitelio luminal uterino (Figura 11 f), mientras que los de la región media penetrando el epitelio luminal, y los craneales flotando en la luz del órgano. Roberts (1973)

describió el desarrollo post-implantacional de diferentes roedores histricomorfos, entre ellos, el casiragua, el degu, la chinchilla, el coipo y la vizcacha, y concluyó que el patrón básico de desarrollo es similar al del cobayo, aunque existen algunas diferencias interespecíficas (Duval, 1892; Sansom y Hill, 1931; Harman y Prickett, 1932; Amoroso, 1952). En relación con el periodo implantatorio, en la vizcacha y otros histricomorfos existe una reacción de las células deciduales en la zona donde los blastocistos estaban simplemente en contacto, sin que existiese alteración de las células epiteliales (Roberts y Weir, 1973).

Una de las características destacadas del desarrollo temprano post-implantación en los histricomorfos es el alargamiento del blastocisto en una estructura cilíndrica, huevo cilindro, debido a la expansión del endodermo hacia el polo antimesometrial. Al mismo tiempo, es evidente la desintegración del trofoblasto parietal, de modo que el endodermo visceral del saco vitelino se posiciona directamente sobre el tejido uterino. El polo abembrionario del blastocisto está compuesto por trofoblasto ectoplacentario que encierra una cavidad ectoplacentaria. En la chinchilla, el coipo y la vizcacha, esta cavidad se llena con frecuencia con sangre materna extravasada (Figura 11 g, h). La lámina exterior de la cavidad suele tener solo una célula de espesor, mientras que su capa interior es más gruesa. El alargamiento continuo del endodermo separa el trofoblasto ectoplacentario de la masa celular interna, y se origina entre ambos la cavidad pro-exocelómica. Además, en la región antimesometrial se forma una cavidad decidual que, conforme avanza el tiempo, aumenta de tamaño, se expande y adquiere forma de campana. En el polo ectoplacentario del blastocisto, el trofoblasto forma extensiones tubulares que invaden la decidua y perforan la pared del endodermo unilaminar del blastocisto (Figura 11 i). Estas ramas trofoblásticas anclan el blastocisto a la decidua y establecen el sitio donde se desarrollará la futura placenta corioalantoidea. Las características de la placenta y el saco vitelino de *L.*

maximus fueron descritas por Flamini y col., (2011) mediante estudios realizados a diferentes niveles de observación. Al igual que en otros histriocomorfos, la placenta corioalantoidea es discoidea y monohemocorial, y también se desarrolla una placenta vitelina invertida. Entre los roedores histriocomorfos, la placenta del cobayo fue la primera en describirse por Creighton (1878). Amoroso (1952) distingue cuatro regiones principales en esta placenta: placenta principal, subplacenta, zona de unión y *decidua basalis*. El desarrollo de la placenta de *L. maximus* es similar a lo observado en otros roedores del mismo grupo, entre ellos, el agutí y la paca (Strahl, 1905), la chinchilla (Tibbitts y Hilleman, 1959) y el coipo (Hillemann y Gaynor, 1961). Muchas características de la placentación de estas especies fueron ampliadas por estudios realizados en el siglo XXI (Miglino y col., 2002, 2004; Bonatelli y col., 2005; Oliveira y col., 2006; Mess, 2007; Bezerra y col., 2018). Estudios posteriores informaron otras características de la placentación (Giacchino y col., 2018), siendo algunas son similares a las presentes en especies de su mismo clado, mientras que otras no (Barbeito y col., 2021). La gestación de los histriocomorfos es larga en comparación con la de otros roedores, y se hipotetiza que esto guarda relación con la lenta tasa de crecimiento de los embriones, particularmente en la gestación temprana en donde el desarrollo está más concentrado en el establecimiento de la placenta que en la formación del embrión (Roberts y Perry, 1974). La placentación de *L. maximus* se inicia a los 35 dpc, periodo que coincide parcialmente con el inicio de la resorción embrionaria (Weir, 1971a; Roberts y Weir, 1973; Roberts y Perry, 1974).

Un estudio reciente durante el desarrollo embrionario temprano de la vizcacha fue realizado por Leopardo y Vitullo (2017). En este, además de incorporar aspectos no analizados previamente como la diferenciación a nivel del blastocisto a partir de sitios de implantación de unos 22-26 días de gestación, se actualiza la nomenclatura de algunas estructuras y tejidos embrionarios y

extraembrionario. Además, se incluyen datos morfométricos que permiten precisar el tiempo gestacional. Por otro lado, investigaron la localización espacio-temporal de proteínas que resultan de la expresión de genes que están involucrados en controlar la especificación de las células germinales primordiales (PGC). En la etapa donde se forma la línea primitiva, las células OCT4 positivas se detectan en el polo posterior del disco embrionario en el mesodermo del epiblasto proximal. En la etapa de placa neural, una población celular reducida (8-12 células) OCT4 positivas expresa transitoriamente FRAGILIS, STELLA y SOX17 en la línea posterior. Luego de la translocación al intestino posterior, las células OCT4 pluripotentes comienzan a expresar VASA, y luego, STELLA y FRAGILIS se activan durante la migración hacia las crestas genitales. *L. maximus* muestra un patrón espacio-temporal de marcadores asociados a PGC divergente del modelo de restricción de PGC temprano visto en ratones. Este patrón se ajusta a modelos alternativos que se basan en una población pluripotente en el eje embrionario, donde las CGP se especifican posteriormente durante el desarrollo.

Como se describió anteriormente en las generalidades del desarrollo embrionario temprano en mamíferos euterios, luego de la diferenciación del blastocisto se inicia la cavitación y la gastrulación (Figura 11 j). Según una revisión de la embriología de los histicomorfos, la amniogénesis es por cavitación (Roberts y Perry, 1974). Aproximadamente al mismo tiempo que aparece la cavidad amniótica, el cilindro endodérmico del blastocisto se recubre con una fina capa de mesodermo que luego se vasculariza. La decidua se forma por la formación de hendiduras en el endometrio que al reunirse generan una nueva luz uterina. El lumen original se borra por la expansión de la decidua y el nuevo lumen establece su división en decidua parietal en la periferia y decidua capsular en la región antimesometrial. La cavidad ectoplacentaria desaparece gradualmente a medida que el ectodermo coriónico se engrosa y se dobla más. Los espacios entre las

estrechas trabéculas del trofoblasto sincitial que atraviesan el cono ectoplacentario están frecuentemente llenos de sangre. Las células gigantes primarias surgen de las regiones periféricas del trofoblasto ectoplacentario en la unión de los tejidos materno y fetal (Figura 11 k). Las células serían fagocíticas, son especialmente prominentes en el cuis, la chinchilla y el coipo (Roberts y Perry, 1974). En *L. maximus* se observaron en la placentación a los 40-60 y 80-120 días de gestación, y se las asoció con la función mencionada previamente, también se les atribuyó un rol en la invasividad (Flamini y col., 2011). Otros detalles de la cavitación y la gastrulación fueron descritos por Leopardo y Vitullo (2017) a partir de embriones con 32-39 días de gestación. En este momento gestacional los autores observaron un disco embrionario trilaminar con las tres hojas embrionarias, endodermo, mesodermo y ectodermo, como así también la presencia de la notocorda, el tubo neural y el alantoides en formación (Figura 11 l).

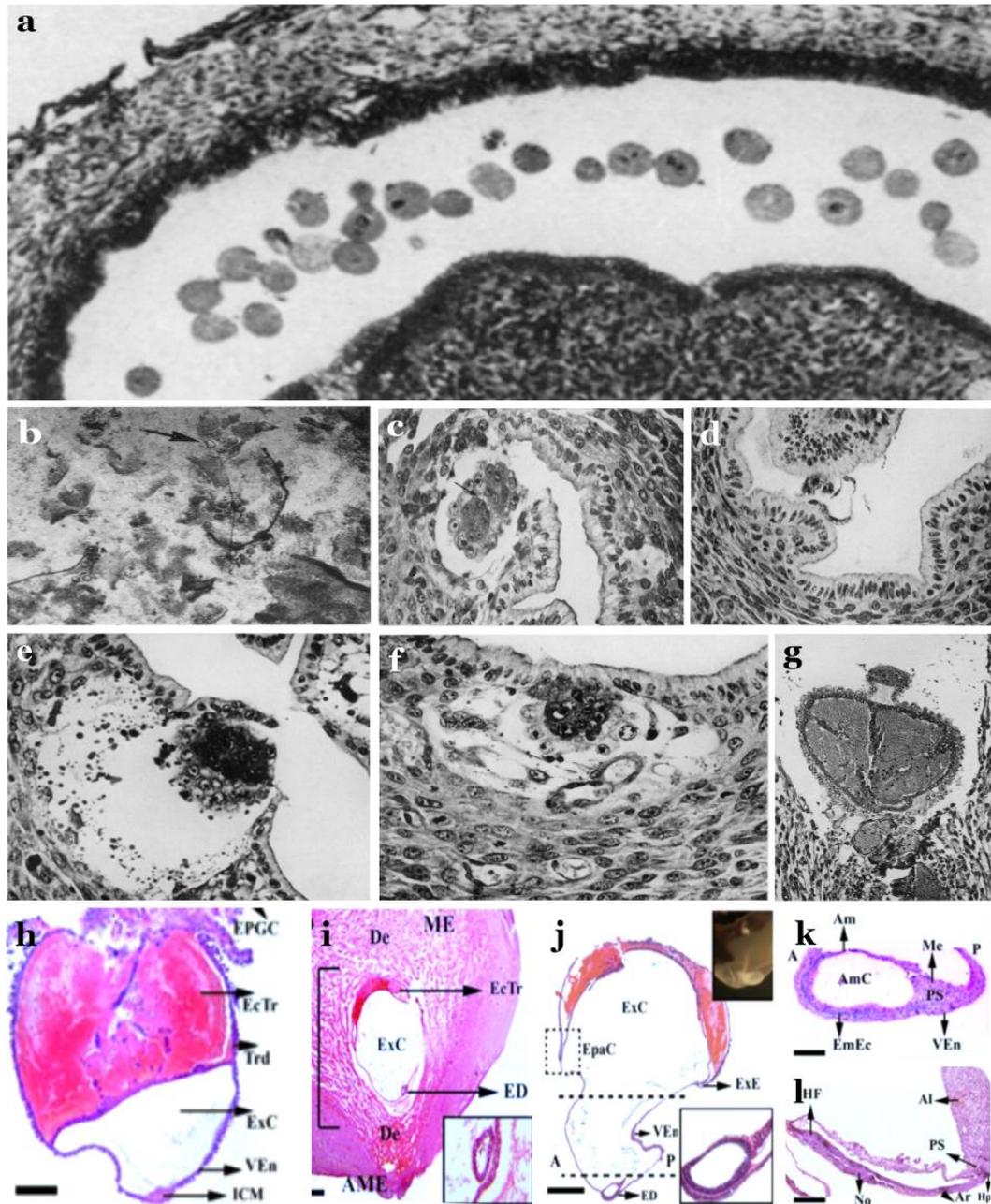


Figura 11. Desarrollo embrionario temprano en *L. maximus*. **a.** Blastocistos flotando en la luz de las trompas uterinas; **b.** Blastocistos en el fluido oviductal y próximos al extremo craneal del útero; **c.** Aposición; **d.** Adhesión; **e y f.** Invasión; **g.** Blastocisto elongado (22 dpf); **h.** Blastocisto con cavidad ectoplacental con sangre materna extravasada; **i.** Implantación intersticial y antimesometrial; **j.** Cavitación; **k.** Desarrollo de la cavidad amniótica; **l.** Alantoides y notocorda (32-39 días post fertilización). Abreviaturas: A, anterior; Al, alantoides; Am, amnios; AmC, cavidad amniótica; AME, antimesometrial; Ar, arquenterón; De, decidua; ED, disco embrionario; EcTr, trofoblasto ectoplacental; EmEc; ectodermo embrionario; EpaC; cavida epamniótica; EPCG, células gigantes ectoplacentales; ExC, cavidad exocelómica; ExE, ectodermo extraembrionario; HF, hipoblasto; Hp, hipoblasto.

bolsillo del intestino; IC, cámara de implantación; ICM; macizo celular interno; Me, mesometrial; No, notocorda; P, posterior; PS, línea primitiva; Trd, células derivadas del trofoblasto; VEn, endodermo visceral. Imágenes extraídas y modificadas de Weir, 1971a, b (a-g) y Leopardo y Vitullo, 2017 (h-l).

Durante este desarrollo embrionario temprano de la vizcacha ocurre un evento que es parte de la biología reproductiva de la especie, el inicio de la muerte embrionaria. En *L. maximus* a los 26-35 dpc se inicia la resorción embrionaria de las implantaciones craneales y medias, y culmina a los 70 dpc. En cambio, las implantaciones caudales continúan su desarrollo hasta originar dos crías precociales (Weir, 1971a, b; Roberts y Weir, 1973; Flamini y col., 2019). La resorción embrionaria ocurre, con cierta frecuencia, pero en menor medida que en la vizcacha, en otras especies de histricomorfos como la chinchilla (Weir, 1967) y el coipo (Newson, 1966); en cambio, en el casiragua es ocasional (Roberts, 1973). La resorción no es exclusiva de los roedores histricomorfos, también se observa en roedores múridos como la ratona y la rata (Flores y col., 2014; Fonseca y col., 2014) y en especies de los órdenes Chiroptera (Bouchard y col., 2001), Carnivora (Ortega-Pacheco y col., 2007) y Lagomorpha (Schröder y col., 2013), entre otros. Por lo tanto, la resorción embrionaria es un proceso reproductivo conservado entre los euterios (Drews y col., 2020), aunque en ningún caso se observa una pérdida tan numerosa ni sectorizada como ocurre en *L. maximus*.

Los primeros estudios sobre la reproducción en la vizcacha intentaron dilucidar las causas de esta muerte embrionaria, pero no se encontraron diferencias histológicas entre los extremos uterinos craneales y caudales como así tampoco en la vascularización de cada implantación que pudieran explicar este evento (Roberts y Weir, 1973). En años posteriores se publicaron trabajos sobre la endocrinología reproductiva de *L. maximus* con la finalidad de comprender la poliovulación, la poliembrionía y la muerte embrionaria temprana mediante el estudio de su eje HHG (Dorfman y col., 2011, 2013). La fisiología de su eje guarda

similitudes con la de otros mamíferos, aunque en esta especie se observaron ciertas variaciones durante la preñez intermedia. A mitad de gestación hay un incremento significativo en la expresión hipotalámica de las hormonas GnRH, LH y P4, respecto a hembras en ovulación y con preñez a término, demostrando la reactivación del eje. Esta expresión se correlacionó con la presencia de folículos preovulatorios, antrales y no luteinizados, y sugiere un posible papel del eje HHG en la modulación de la pseudo-ovulación que ocurre durante la gestación en *L. maximus* (Fraunhoffer y col., 2017). También guarda relación con la persistencia de los cuerpos lúteos primarios durante la gestación intermedia y aún en la avanzada (Jensen y col., 2008; Flamini y col., 2009, 2020). La reactivación del eje, podría relacionarse con la muerte embrionaria temprana que se observa en algunas de las implantaciones; tal vez, la placenta de esas implantaciones produzca niveles insuficientes de P4, hormona que resulta ser esencial para el mantenimiento de la preñez. Recientemente, se demostró cuáles son las causas de la reactivación del eje. A mitad de gestación, el nivel sérico de P4 disminuye y ocasiona la reactivación del eje por su retroalimentación sobre el hipotálamo. Este órgano al secretar GnRH estimula a la *pars distalis* de la hipófisis para que secrete las hormonas FSH y LH. La FSH induce el crecimiento folicular y este a su vez, el incremento de los niveles séricos de E2. En cambio, la LH genera la pseudo-ovulación y la luteinización de los folículos ováricos no ovulados. La luteinización de las células de la granulosa y de la teca interna conduce a la formación de los cuerpos lúteos accesorios que producen el segundo pico de P4 (Fraunhoffer y col., 2017). En adición a estos resultados, Flamini y col., (2009) ya habían observado el incremento significativo de cuerpos lúteos accesorios hacia la gestación a término. Por otro lado, también se demostró la sensibilidad del hipotálamo a E2 mediante la expresión del receptor de estrógeno alfa (RE- α) (Inserra y col., 2017). Según datos más recientes, E2 también regula al eje HHG mediante una acción directa sobre la hipófisis. La

expresión de GnRHR en la *pars distalis* disminuyó significativamente en la preñez intermedia, en comparación con las hembras con gestación temprana y a término. Además, la expresión del RE- α en la *pars distalis* se incrementó significativamente desde mitad de gestación; mientras que el RE- β no varió durante la preñez. La expresión de LH en la *pars distalis* mostró un aumento significativo a mediados de la gestación, en concordancia con la LH sérica. Estos resultados sugieren que el aumento de la pulsatilidad de la LH a mediados de la preñez se debería a el aumento de E₂, que actúa a través de RE- α (Proietto y col., 2019). Otra hormona relacionada al eje HHG es la prolactina (PRL) hipofisaria. Esta es esencial para el mantenimiento de los CL y la producción de la P₄ durante la gestación (Risk y Gibori, 2001). Los niveles séricos de esta hormona aumentan constantemente durante la preñez; en cambio, su receptor ovárico (PRLR) alcanza su máxima expresión en la mitad de la preñez y disminuye drásticamente en la preñez a término. La expresión del receptor de la hormona luteinizante (LHR) resultó similar al del PRLR. A su vez, los niveles séricos de P₄ y LH también se registraron a mitad de la preñez. Tanto el PRLR como el LHR ovárico participarían en el éxito de la gestación en vizcachas por modular los niveles de 20 α -HSD y 3 β -HSD (dos enzimas que participan en la formación y la degradación de la P₄), moléculas que influyen en la concentración de P₄ sérica durante la gestación (Proietto y col., 2018). Un trabajo con experimentos tanto *in vivo* como *ex vivo* demostró que las dosis fisiológicas de P₄ y E₂ producen un efecto diferencial en la frecuencia de liberación pulsátil o expresión genómica de GnRH, mientras que dosis superiores producen inhibición en la expresión de GnRH hipotalámica. Estos datos en conjunto, demuestran la retroalimentación positiva de E₂ y P₄ que ocurren en la actividad hipotalámica durante la preñez de *L. maximus* (Inserra y col., 2020).

Flamini y col., (2019) observaron variaciones en la tonalidad, el tamaño y la consistencia entre las implantaciones en resorción (craneales y medias) y las

viabiles de una gestación temprana. Las primeras son pardas-negruzcas, de tamaño menor y consistencia blanda; en cambio, las restantes son blancas-amarillentas, grandes y de consistencia firme (Figura 12 a, b). Otros autores coincidieron en la observación, pero además incorporaron otros datos de la gestación temprana. Las implantaciones craneales y medias presentan alteraciones en su organización histológica, remanentes del saco vitelino, infiltración de células inflamatorias y foco necrótico fibrinoide (Figura 12 c-h). En cambio, en las implantaciones caudales se encuentran estructuras embrionarias y extraembrionarias definidas y organizadas (Figura 12 i-k). Además, informaron que las vesículas embrionarias necróticas tienen forma de gancho debido a la presencia de pseudoseptos entre los embriones, con un pequeño espacio que comunica las vesículas adyacentes. Según estos autores, la presencia de pseudoseptos entre las vesículas embrionarias durante la preñez crea compartimentos casi cerrados que se aíslan entre sí permitiendo que la reabsorción ocurra de manera casi independiente entre ellos (Giacchino y col., 2020). Estudios durante la gestación intermedia también aportaron datos sobre estados avanzados de la resorción. Flamini y col., (2020) detallaron las características de tres sitios de implantación, craneales, medios y caudales, en hembras con 50-90 días de gestación. Los sitios de implantación (SI) craneales presentaron una pared uterina sin signos de diferenciación, pero con signos de resorción y ausencia de contacto íntimo con el epitelio uterino luminal (Figura 13 a-c). En los SI medios se observó una decidua, signos de necrosis que indican resorción, ausencia de estructuras embrionarias, un contacto más estrecho con el útero respecto a los SI craneales, y escaso desarrollo de la vasculatura uterina (Figura 13 d-f). En cambio, los SI caudales incluían una región decidualizada extensa, ricamente vascularizada y con abundantes glándulas endometriales. Además, cada SI caudal presentó una placentación corioalantoidea que incluía una zona laberíntica irrigada por vasos sanguíneos fetales (Figura 13 g-i). Giacchino y

col., (2020) también observaron infiltración inflamatoria, zonas hemorrágicas y necróticas en las implantaciones en resorción de la gestación intermedia. A su vez, determinaron la presencia de apoptosis mediante TUNEL en la decidua basal y subplacenta en la implantación caudal, la única que sobrevivirá (Figura 13 j-k). Coincidentemente, estas estructuras de la misma implantación también presentaron depósitos de calcio (Figura 13 l-m). Los autores concluyen que se requieren de mayores estudios de la apoptosis en las implantaciones en resorción para determinar si la apoptosis es causa o consecuencia de la resorción.

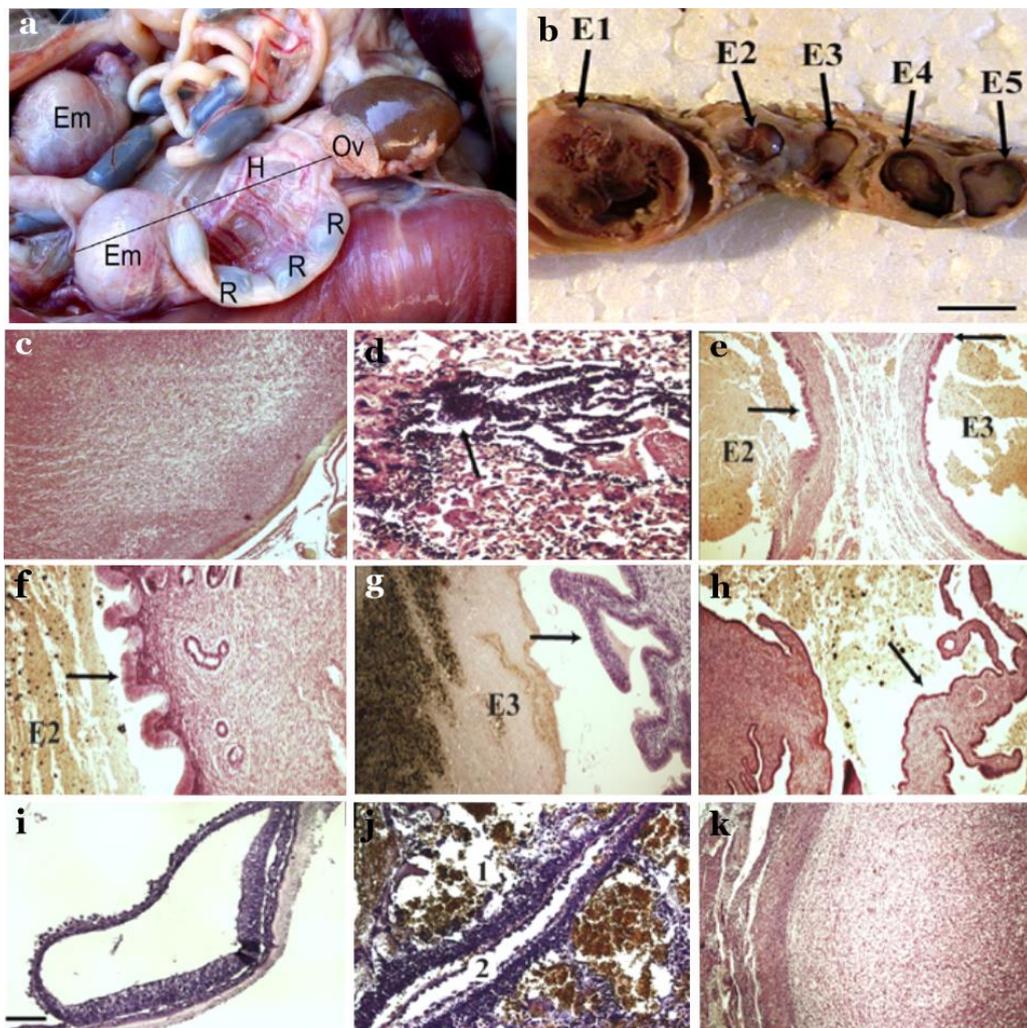


Figura 12. Gestación temprana en *L. maximus*. a-b. Resorciones tempranas (R o E2-5) y embrión viable (Em o E1); c y d. E2 en resorción, trofoblasto desorganizado y gran cantidad de fibroblastos, y, remanentes del saco vitelino e infiltrado inflamatorio; e. E2 y E3 separados por un seudosepto; f. E3, pliegues del epitelio uterino y remanentes

necróticos; **h**. Flaps uterinos ocupando parte de la luz y entre remanentes de embriones necróticos; **i**. E1, embrión caudal recientemente implantado; **j**. 1, laguna materna y 2, saco vitelino; **k**. E1, trofoblasto organizado. Imágenes extraídas y modificadas de Flamini y col 2019 (a) y Giacchino y col 2020 (b-k).

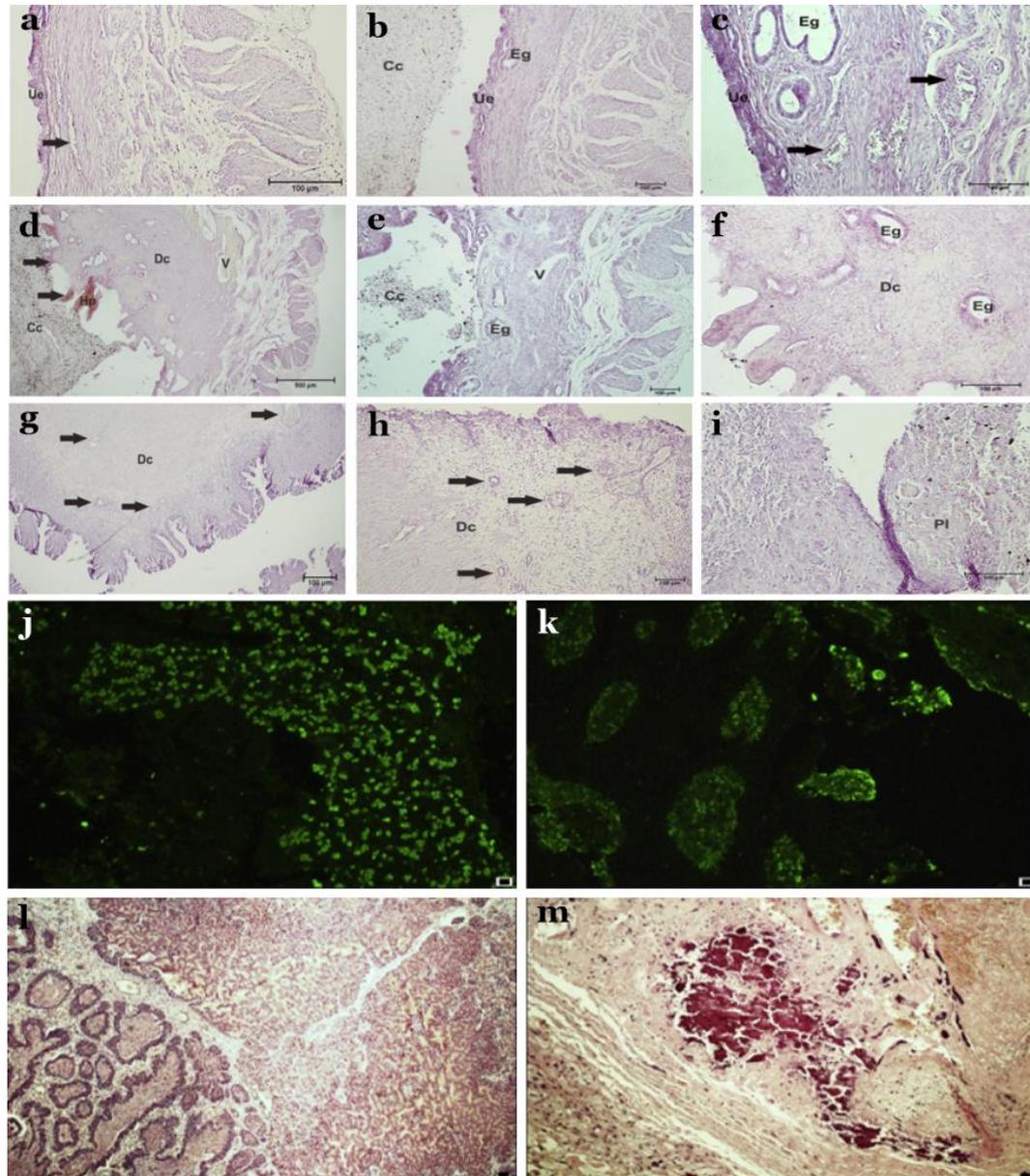


Figura 13. Gestación intermedia en *L. maximus*. **a-c**. Resorciones craneales, ausencia de contacto materno-embionario, zonas uterinas indiferenciadas, y con escasa vascularización; **d-f**. Resorciones medias, ausencia de estructuras embrionarias, zonas hemorrágicas y necróticas, y escaso desarrollo de la vasculatura uterina; **g-i**. Placentación corioalantoidea, región decidualizada extensa, vascularizada y con abundantes glándulas endometriales; **j-k**. Apoptosis en la subplacenta de las implantaciones caudales, técnica TUNEL; **l y m**. Calcificación en la subplacenta. Abreviaturas: Cc, *conceptus*; De, decidua;

Eg, epitelio glandular; Pl, placenta; Ue, epitelio uterino; V, vasos sanguíneos. Imágenes extraídas y modificadas de Flamini y col 2020 (a-i) y Giacchino y col 2020 (j-m).

Además, mediante los estudios de Flamini y col., (2020) se evidenció que los cuernos uterinos son heterogéneos, en sentido craneocaudal, en cuanto a su vascularización debido a diferencias en la ramificación de las arterias uterinas. Los resultados de este estudio difieren de los mencionados previamente, realizados en la década de 1970, en los que no se habían encontrado diferencias regionales en la vascularización uterina. La diferencia entre los resultados puede deberse a la aplicación de otras técnicas en el estudio de Flamini y col., (2020). Las diferencias se encontraron en fetos de hembras de entre 50 y 90 días de gestación, lo que demuestra que la diferencia se genera durante la organogénesis uterina. También se demostró que se mantienen en hembras con gestación intermedia (Figura 14 a-c). Por lo tanto, los SI caudales tendrían un aporte vascular mayor que los SI craneales y medios. Los resultados de Giacchino y col., (2020) reafirman la hipótesis de una vascularización diferencial a lo largo de los cuernos uterinos en hembras sin preñez y con preñeces temprana e intermedia. Estos últimos autores realizaron un estudio angiográfico, y encontraron una circulación uterina ascendente desde el cuello del útero hasta el ovario, y también un mayor calibre en las ramas de las arterias que irrigan las implantaciones caudales con respecto al presente en las ramificaciones próximas al ovario (Figura 14 d-f).

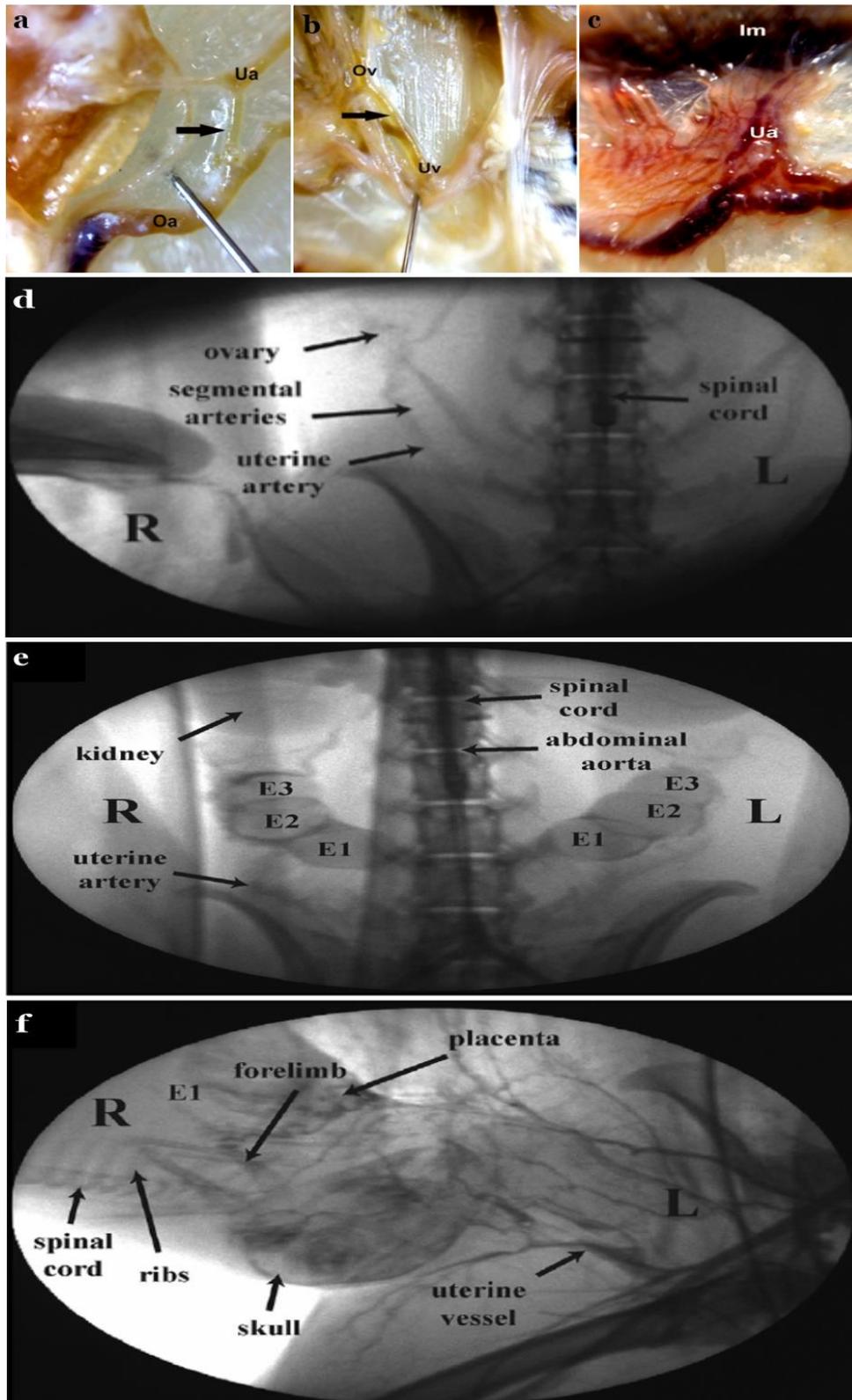


Figura 14. Vascularización uterina en *L. maximus* en diferentes momentos reproductivos y gestacionales. **a-c.** Morfología vascular en los segmentos uterinos craneal y caudal en hembras con gestación intermedia; **d-f.** Angiografía uterina en hembras

sin preñez, con preñez temprana e intermedia. Abreviaturas: Im, implantación viable; Oa, arteria ovárica; Ov, vena ovárica; Ua, arteria uterina; Uv, vena uterina. Imágenes extraídas y modificadas de Flamini y col., 2020 (a-c) y Giacchino y col., 2020 (d-f).

El grado de desarrollo con el que nacen las crías de la vizcacha, similar al de otros histricomorfos tales como *Cuniculus paca*, *Dasyprocta prymnolopha* y *Dasyprocta leporina*, es muy diferente al de otros roedores, por ejemplo, los múridos (Sousa y col., 2012; Fortes y col., 2013; de Oliveira y col., 2017; El Bizri y col., 2017). Pero sin dudas la poliovulación, la poliembrionía y la elevada muerte embrionaria en *L. maximus* son eventos reproductivos que resultan sorprendentes entre los euterios y aún dentro del orden Rodentia.

El conocimiento sobre los datos concernientes al parto de *L. maximus* es prácticamente nulo porque ocurre en el interior de las vizcacheras. Estudios comportamentales han determinado que las hembras preñadas se aíslan de los demás miembros del harén. Tras 5 meses de gestación, dos crías (ocasionalmente una o tres) son paridas con un grado alto de precocidad ya que nacen con un pelaje denso y similar al del adulto, ojos abiertos, dientes incisivos bien desarrollados, e incluso, según algunos autores, con cierto grado de agresividad (Weir, 1971a; Jackson, 1989). Estas características no difieren a las observadas en otros roedores histricomorfos como *Cuniculus paca* (El Bizri y col., 2017). Los largos periodos de gestación involucran grandes demandas energéticas de la hembra para el desarrollo de las crías, quienes al momento del nacimiento tienen una gran independencia. Esta independencia de la madre y los cortos periodos de lactancia se relacionan con la compensación del gasto energético de la hembra durante la gestación (Martin y col., 2008). En un estudio de las mamas de *L. maximus* se observó la variación morfológica causada por efecto de las hormonas, en hembras ciclando, preñadas, en lactancia y post-lactación. En hembras no preñadas, las variantes α y β del RE no se expresaron en el sistema

de ductos de las glándulas; esta situación cambió durante la gestación, en esa etapa tanto los RE- α y β , como el RP, se expresaron tanto en los ductos como en los alvéolos mamarios. Esto demuestra la importancia de la inducción hormonal generada por E2 y P4, que tiene como consecuencia el incremento en la ramificación de los ductos y en la proliferación celular en los alvéolos (Halperin et al., 2013). Durante la gestación media de la vizcacha de llanura hay un incremento en los niveles séricos de P4 secretada por los cuerpos lúteos accesorios, debido a una reactivación del eje HHG y a la pseudo-ovulación (Dorfman et al., 2013). Este segundo incremento de P4 guarda relación con el desarrollo exponencial de las glándulas mamarias hacia la segunda mitad de la preñez. Además, se observó una expresión intensa del receptor de prolactina (PRLR) en el epitelio alveolar de las glándulas mamarias de hembras preñadas y en lactación (Halperin et al., 2013). La lactancia de las crías precociales dura, aproximadamente, 55 días (Weir, 1971a). El peso de las crías al nacimiento es variable según el sexo, las hembras pesan 185 g mientras que los machos 207 g. Esta diferencia entre los sexos se incrementa durante la pubertad y se mantiene en la adultez (Weir, 1971a) tal como se mencionó en las generalidades de la especie. Además, estas crías, aunque obtengan nutrientes de la leche, pueden alimentarse por sí solas, datos que se han obtenido luego de inspeccionar el contenido estomacal de los neonatos y haber encontrado material herbáceo (Llanos y Crespo, 1952; Weir, 1967).

Hipótesis

A partir de los antecedentes en la sección “g” de este capítulo se propone la siguiente hipótesis:

“Existen diferencias morfológicas y moleculares en las distintas porciones del cuerno uterino de la vizcacha que determinan la supervivencia de aquellas implantaciones más próximas al cuello uterino”.

Objetivos

Con la finalidad de contrastar la hipótesis anterior, se propusieron los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Establecer las bases morfológicas y moleculares de la muerte embrionaria masiva en *L. maximus*, para utilizar a esta especie como un modelo animal, en el que ésta se produce espontáneamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En hembras no preñadas y con preñez temprana se propone realizar:

- Describir las características del útero en distintos niveles de observación: ultrasonográfico, macroscópico y microscópico.
- Evaluar variaciones morfométricas a lo largo de los cuernos uterinos.
- Determinar mediante lectinohistoquímica el patrón de glicosilación asociado al periodo pre- y post-implantación.
- Establecer mediante inmunohistoquímica las características de los siguientes procesos: angiogénesis, decidualización, implantación, invasión y diferenciación trofoblástica, renovación celular y expresión de receptores hormonales.

En las hembras con preñez intermedia se propone realizar:

- Describir las características ultrasonográficas, macroscópicas y microscópicas de cada sitio de implantación

CAPÍTULO II

Materiales y métodos

a. CICUAL

El protocolo de trabajo con las hembras sin y con preñez de *L. maximus* fue previamente aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (CICUAL-FCV-UNLP), código: 68-3-17T. Este protocolo incluyó el número de animales (n) a utilizar, el método de captura, el transporte desde el sitio de muestreo hasta la FCV-UNLP, la necropsia de las hembras, la obtención de las muestras y el descarte de material. Este último fue recolectado en cada necropsia por la Dirección de Gestión en Seguridad e Higiene y Calidad de la FCV-UNLP.

b. Toma de muestras

Las hembras utilizadas en esta tesis doctoral provinieron de la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS) del Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires (S34° 50.900 O58° 06.900) (Figura 15). Las mismas fueron capturadas por los integrantes del staff de la ECAS mediante jaulas trampas colocadas al mediodía en la boca de las vizcacheras y retiradas por la mañana del día siguiente. Las hembras sin preñez fueron capturadas en el periodo diciembre-enero, mientras que aquellas con gestación temprana en marzo-abril. Algunas capturas se realizaron en agosto-septiembre ya que algunas hembras tienen estro posparto y, por lo tanto, se pueden obtener ejemplares con preñez. Por su parte, las hembras con gestación intermedia fueron capturadas en los meses junio-julio. La elección de los periodos se basó en un trabajo de la biología ovárica de la especie (Flamini y col., 2009).

Para este estudio se planteó un $N=20$, entre hembras sin preñez ($n=10$) y con gestación temprana ($n=10$). Si bien se llegó al número total de hembras sin preñez, no ocurrió lo mismo para aquellas con gestación temprana. Esto se debió al ASPO (Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio) dispuesto por el Gobierno Nacional como consecuencia de la pandemia por COVID-19 (Decreto 297/2020). En consecuencia, se utilizó un $n= 5$ de hembras con gestación temprana. Por tal motivo, se incorporó material incluido en parafina y con excelente estado de conservación perteneciente a hembras capturadas en el marco de la tesis doctoral de la Dra. Mirta. A Flamini. En cuanto a las hembras con gestación intermedia, el n fue de 3 hembras.



Figura 15. Vista general del predio de la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS) del Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires. Los círculos de línea incompleta delimitan las bocas de las vizcacheras.

c. Analgesia y anestesia

Luego de las capturas, las hembras fueron trasladadas en las mismas jaulas de captura a la FCV-UNLP. Seguidamente, cada hembra fue anestesiada con una dosis de xilacina (8 mg/kg de peso corporal) y otra de clorhidrato de ketamina (50 mg/kg de peso corporal) (Ketanest, Laboratorio Scott Cassara). Se utilizó la vía

intramuscular para la administración de ambas dosis. Este procedimiento se basó en trabajos previos y fue realizado por médicos veterinarios (Flamini y col., 2009). Una vez alcanzado el plano profundo de anestesia se procedió a la observación del estado reproductivo de cada ejemplar mediante ultrasonido.

d. Ultrasonido

Para la observación por ultrasonido, las hembras sin preñez se dispusieron en posición decúbito dorsal para depilar su abdomen y observar ambos cuernos uterinos con el equipo Mindray Z5 (7, 5–10 mHz). Este procedimiento fue realizado por la Especialista en Doppler MV Guadalupe Ranea. Además de observar las características del órgano, se midió el diámetro de los cuernos uterinos en las regiones craneal, media y caudal. Esto no se realizó para las hembras con gestación temprana debido a la no disponibilidad del equipo para ese periodo. En cambio, en las hembras con gestación intermedia se observó, caracterizó, y determinó la frecuencia cardíaca en cada una de los sacos fetales.

e. Necropsia

Luego de la observación por ultrasonido, se realizó la perfusión de cada ejemplar con paraformaldehído. Este procedimiento fue realizado por médicos veterinarios en la cátedra de Anatomía de la FCV-UNLP. Luego de la apertura de la piel del abdomen en el sentido craneocaudal del animal se desplazaron las vísceras hacia uno de los flancos para extraer el sistema reproductor completo de ambos estados reproductivos. Algunos órganos no reproductivos (piel, lengua, glándulas salivares, estómago, intestinos, hígado, pulmones) fueron extraídos para estudios de otras líneas de investigación, mientras que el material restante se descartó en bolsa roja de residuos patológicos.

f. Observación macroscópica

Los cuernos uterinos de las hembras sin y con preñez fueron observados externamente, medidos y fotografiados. En las hembras sin preñez se midió el largo de cada cuerno uterino como así también su diámetro en las regiones craneal, media y caudal. En cambio, en las hembras con gestación temprana se midió el largo y el ancho de los segmentos uterinos craneal y caudal, como así también de cada SI. Cada medida se obtuvo con el calibre digital (Stronger, Argentina) (error 0,001 mm), mientras que las fotografías con la cámara digital Canon (EOS Rebel T3i). En las hembras con gestación intermedia solo se midió al SI caudal. Mediante la extrapolación de las medidas de los sitios de implantación caudales se obtuvo el tiempo gestacional de las hembras con gestación temprana e intermedia (Leopardo y Vitullo, 2017) (Tabla 1).

Tabla 1. Datos morfométricos de los sitios de implantación, embriones y fetos de *L. maximus* (Extraído y modificado de Leopardo y Vitullo, 2017).

Día post-fertilización (dpf)	Semana post-implantación	Pares de somitas	Diámetro del sitio de implantación (mm) (media ± ds)	Longitud cefalocaudal (mm) (media ± ds)	Peso (g) (media ± ds)
25	1	-	4,0 ± 0,02 ^a 6,9 ± 0,02 ^b	-	-
32	2	-	9,5 ± 0,72 ^c 9,6 ± 0,71 ^{c,d}	-	-
39	3	-	11,1 ± 0,40 ^e 14,3 ± 0,84 ^f	2,5 ± 0,2 ^a 3,0 ± 0,1 ^{a,b}	-
46	4	1-7 13-20	14,4 ± 0,40 ^{f,g} 16,2 ± 0,66 ^h	3,4 ± 0,0 ^{a,b,c} 3,6 ± 0,2 ^{a,b,c,d}	-
53	5	21-29 30-34	16,5 ± 0,65 ^{h,i} 16,6 ± 0,49 ^{h,i,j}	4,5 ± 0,3 ^e 5,8 ± 0,3 ^{e,f}	-
60	6	35-39 40-44	19,7 ± 0,47 ^k 20,3 ± 0,16 ^{k,l}	8,4 ± 0,4 ^g 9,5 ± 0,4 ^{g,h}	-
67	7	>45	21,6 ± 0,43 ^m	10,3 ± 0,4 ⁱ 13,7 ± 0,5 ^{ij}	0,3 ± 0,1 ^a 0,7 ± 0,1 ^{a,b}
74	8	-	-	19,1 ± 1,6 ^k	0,9 ± 0,1 ^{a,b,c}
81	9	-	-	29,7 ± 1,4 ^l	2,8 ± 0,4 ^d
88	10	-	-	45,3 ± 1,5 ^m	7,7 ± 0,6 ^e
95	11	-	-	51,7 ± 1,8 ⁿ	10,9 ± 1,0 ^{e,f}
102	12	-	-	57,9 ± 2,0 ^o	14,9 ± 1,5 ^g
107	13	-	-	68,9 ± 3,2 ^p	24,2 ± 1,9 ^h
112	14	-	-	86,3 ± 3,0 ^q	49,0 ± 4,8 ⁱ
119	15	-	-	103,8 ± 2,1 ^r	81,9 ± 5,8 ^j
126	16	-	-	112,8 ± 2,2 ^s	95,8 ± 5,6 ^k
133	17	-	-	122,4 ± 2,3 ^t	114,3 ± 6,1 ^l
140	18	-	-	134,6 ± 2,2 ^u	165,8 ± 5,3 ^m
147	19	-	-	153,1 ± 0,7 ^v	216,3 ± 4,47 ⁿ

g. Procesamiento histológico

Los cuernos uterinos (CU) de las hembras sin preñez se seccionaron en sentido transversal al eje craneocaudal de los cuernos uterinos en 7 segmentos denominados a, b, c, d, e, f y g, cada uno de 1 cm de largo (Figura 16). En las hembras con preñez temprana e intermedia se realizaron las secciones en el mismo sentido, pero en este caso los cortes se hicieron en los intersitios entre los distintos SI para separarlos. Cada SI se denominó SI 1-n, siendo “n” el número final de SI de cada CU (Figura 17). En las hembras con gestación temprana, también tomaron muestras de los extremos uterinos craneal (comprendido entre la unión útero-

tubárica y el primer sitio de implantación) y caudal (comprendido entre el último sitio de implantación y la unión útero-cérvix).

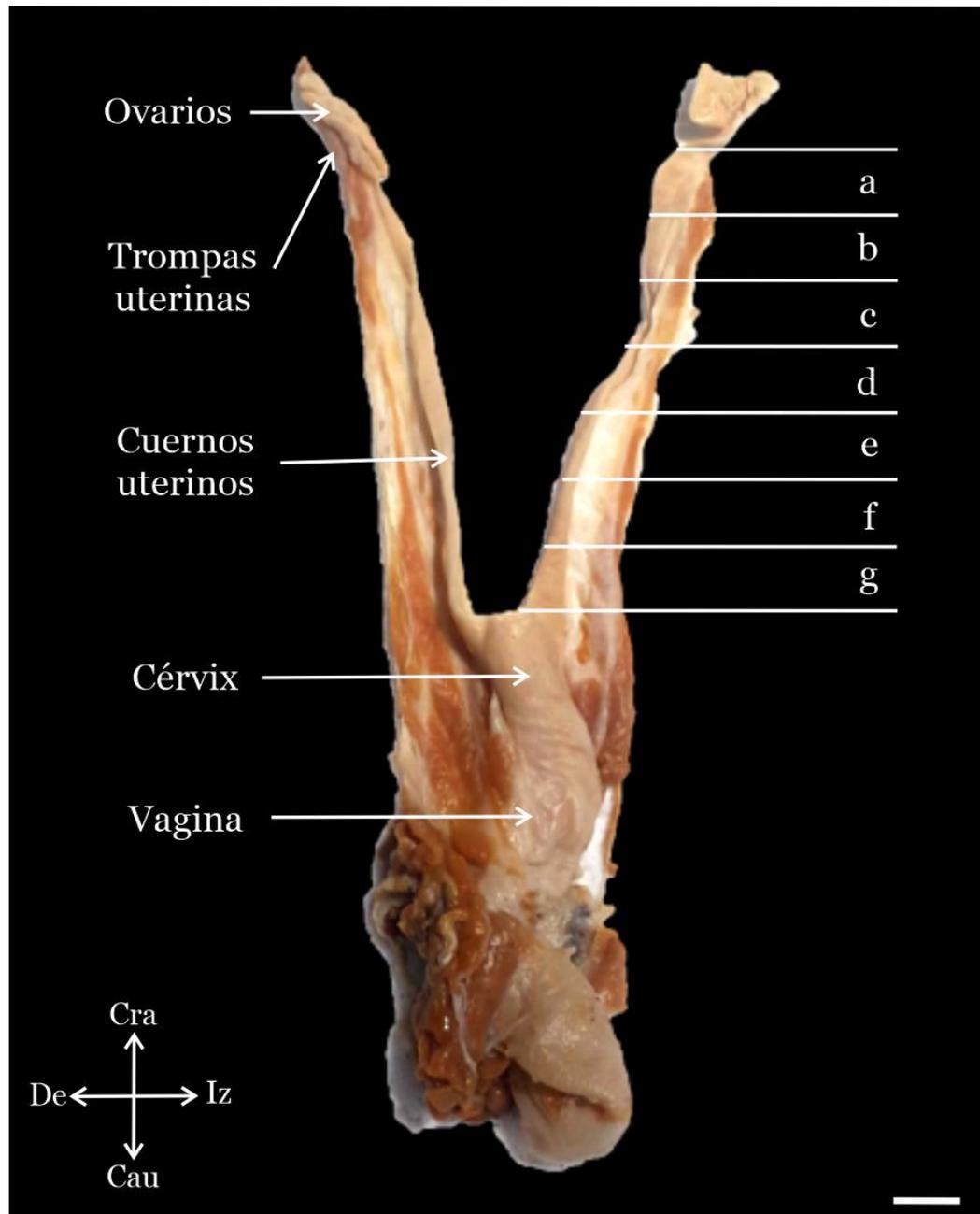


Figura 16. Sistema reproductor de *L. maximus* de hembras sin preñez. Las letras “a, b, c, d, e, f y g” corresponden a los siete segmentos uterinos analizados. Abreviaturas: Cau, caudal; Cra, craneal; De, derecha; Iz, izquierda. Barra de escala: 1 cm.

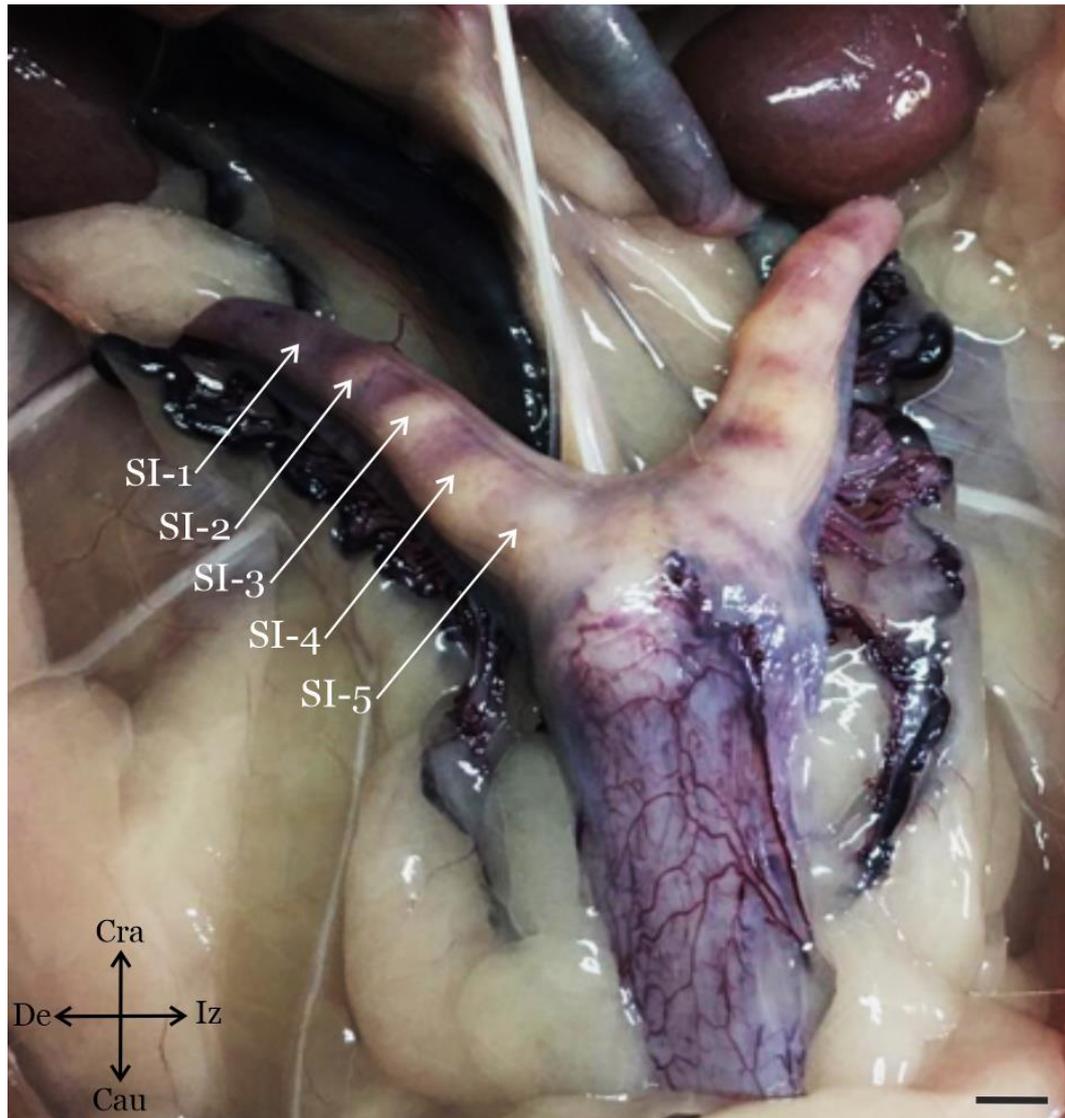


Figura 17. Observación *in situ* del sistema reproductor de *L. maximus* durante la gestación temprana. Los SI-1-5 corresponden a los cinco sitios de implantación analizados. Abreviaturas: Cau, caudal; Cra, craneal; De, derecha; Iz, izquierda. Barra de escala: 1 cm.

Todas las muestras (CU y SI) fueron procesadas para su inclusión en parafina a partir del protocolo estandarizado del Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada de la FCV-UNLP (Flamini y col., 2012) (Figura 18 a-c). Este protocolo solo fue modificado en la fijación, ya que se descartó el uso de formol 10% por haberse demostrado mediante pruebas al inicio de esta tesis que para el material a utilizar la fijación con solución de Bouin

permitía la obtención de cortes de mayor calidad. En consecuencia, las muestras a utilizar fueron sumergidas en la mezcla fijadora Bouin (750 cc de solución saturada de ácido pícrico, 200 cc de formol puro y 50 cc de ácido acético) durante 3 horas y, posteriormente, deshidratadas con una secuencia de etanol con gradación creciente (70°-96°-96°-100°-100°) por 1 hora en cada uno. Seguidamente fueron aclaradas con xilol (xilol-I, xilol-II y xilol-III) durante un periodo de 20-30 minutos en cada uno. Luego, se infiltró en parafina dentro de una estufa a 55°C. Para ello se utilizaron tres parafinas (parafina-I, parafina-II y parafina-III) en las que se sumergieron las muestras durante un periodo de 20, 30 y 45 minutos, respectivamente. Finalmente, cada muestra se incluyó en parafina pura. Una vez obtenido cada uno de los tacos, se realizaron cortes de 3-5 μm de espesor con un micrótopo de deslizamiento.

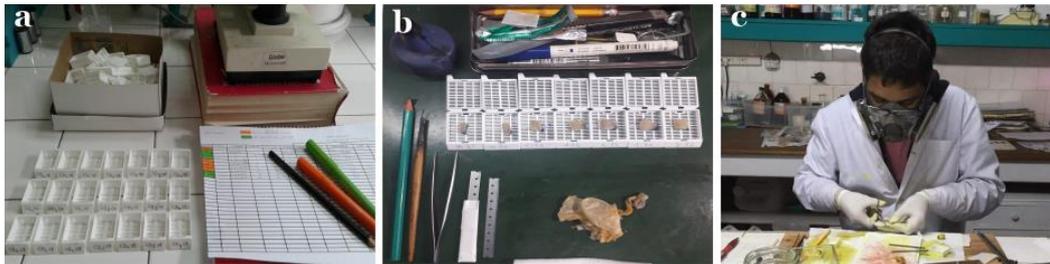


Figura 18. Procesamiento histológico. a-b. Obtención y rotulado de las muestras; **c.** Fijación con mezcla fijadora de Bouin.

h. Coloraciones histológicas clásicas y especiales

La descripción histológica de cada CU y SI se realizó a partir de cortes coloreados con hematoxilina y eosina, tricrómico de Gomori o Masson, reticulina de Gomori y orceína de Partner (Suvarna y col, 2018).

- Hematoxilina y eosina (H-E)

Esta coloración se utiliza en estudios histológicos topográficos. Ambos colorantes, la hematoxilina y la eosina, permiten reconocer en forma clara a los

distintos componentes tisulares. Además, proporciona detalles nucleares bien definidos por el excelente contraste.

Los cortes de cada muestra fueron desparafinados con xilol durante 30 minutos en estufa a 55°C, hidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones decrecientes (100°-96°-96°-70°) y agua destilada. Luego se realizó contraste nuclear con hematoxilina de Harris por 1 minuto y viraje con agua corriente por el mismo tiempo. La coloración con eosina alcohólica fue durante 11 segundos. Por último, los cortes fueron deshidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones crecientes (70°-96°-96°-100°), aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá. Resultados: núcleos y otras estructuras basófilas se observan de color azul/violeta, mientras que rosa las fibras y la mayor parte de los citoplasmas se colorean con diferentes gamas de rosa.

- Tricrómico de Gomori o Masson

Las coloraciones tricrómicas son coloraciones policrómicas en las que se emplean tres colorantes que permiten la diferenciación tisular debido a la coloración de los tejidos, epitelial y conectivo (particularmente las fibras colágenas), fibras musculares y eritrocitos.

Para realizar estas coloraciones, los cortes fueron desparafinados con xilol por 30 minutos en estufa a 55°C e hidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones decrecientes (100°-96°-96°-70°) y agua destilada. Luego se realizó contraste nuclear con hematoxilina de Harris durante 1 minuto y viraje con agua corriente por el mismo tiempo. Se lavó con agua destilada y aplicó la solución de Gomori durante 15 minutos. En cambio, para el tricrómico de Masson se realizó contraste nuclear con hematoxilina y viraje con agua corriente. Seguidamente se aplicó la solución de Masson durante 5 minutos. Tras el lavado

con agua corriente, se aplicó el mordiente ácido fosmolíbdico durante 2 minutos. Luego de este periodo, se lavó con agua destilada y coloreó con azul de anilina durante 30 segundos. Seguidamente se retiró el exceso de colorante con agua destilada. Por último, los cortes fueron lavados, deshidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones crecientes (70°-96°-96°-100°), aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá. Los resultados de la aplicación de esta técnica fueron los siguientes: núcleos con color azul/violeta, citoplasmas, fibras musculares y eritrocitos en rojo, y fibras colágenas color verde (Gomori) o azul (Masson).

- Reticulina de Gomori

Las sales de plata evidencian a las fibras reticulares que conforman, junto a las fibras colágenas y elásticas, el componente fibrilar de la matriz extracelular tisular.

Los cortes fueron desparafinados en un recipiente con xilol durante 30 minutos en estufa a 55°C e hidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones decrecientes (100°-96°-96°-70°) y agua destilada. Luego se sometieron al mordiente permanganato de potasio (KMnO_4) durante 1 minuto y seguidamente se lavaron con agua corriente. Se utilizó una solución de ácido oxálico al 5% como decolorante durante 1 minuto y agua destilada para el lavado posterior. Seguidamente, los cortes fueron cubiertos con una solución de alumbre de hierro ($\text{FeAl}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$), mordiente, durante 1 minuto y posteriormente lavados con agua destilada. A continuación, fueron sumergidos durante 8 minutos en una solución de plata amoniacal (AgNO_3NH_3) al 5% y lavados con agua destilada. Se utilizó formol al 1% como reductor durante 1 minuto y a continuación se lavó con agua destilada. Para incrementar el contraste se empleó la solución de cloruro de oro (AuCl) al 5% en agua destilada durante 5 minutos. Posteriormente,

los cortes se cubrieron con hiposulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 5% durante 5 minutos. Por último, los cortes fueron lavados, deshidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones crecientes (70° - 96° - 96° - 100°), aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá. Como resultado las fibras reticulares se visualizan negras.

- Orceína de Partner

Para evidenciar fibras elásticas, otro componente fibrilar de la matriz extracelular tisular, se utilizó la solución de orceína de Partner que marca en forma selectiva dichas fibras.

Los cortes fueron desparafinados en xilol durante 30 minutos en una estufa a 55°C , hidratados en una secuencia de etanol en concentraciones decrecientes (100° - 96° - 96° - 70°) y agua destilada. Posteriormente, se sumergieron en una solución de orceína al 1% en alcohol y ácido nítrico (HNO_3) durante 30 minutos. Luego fueron lavados con agua destilada, deshidratados con concentraciones crecientes de etanol (70° - 96° - 96° - 100°), aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá. Como resultados se reconocen las fibras elásticas por su tonalidad parda rojiza.

i. Histoquímica

Los carbohidratos forman con las proteínas o los lípidos a los glicoconjugados (GCs) que se encuentran en todas las células, ya sea en la superficie de las membranas plasmáticas o bien en los gránulos citoplasmáticos. Existen diferentes técnicas histoquímicas que permiten diferenciar grupos de GCs (Suvarna y col, 2018). La determinación de GCs neutros y/o ácidos se realizó a partir de la aplicación de diferentes técnicas histoquímicas, entre ellas, PAS (Peryodic Acid of Schiff), y AB (Alcian Blue), éste último a tres pH 0,5, 1 y 2,5.

- PAS

Esta técnica permite la identificación de GCs neutros y/o glucógeno. Se basa en una reacción en la que los enlaces que mantienen unidos a los grupos 1:2 glicol son oxidados con ácido periódico y generan grupos aldehídos libres. Estos últimos reaccionan con el reactivo de Schiff (H_2SO_4 -fucsina) y forman un compuesto que adquiere color magenta. La presencia de este color indica reacción positiva.

Los cortes fueron desparafinados con xilol durante 30 minutos en estufa a $55^\circ C$ e hidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones decrecientes (100-96-96-70) y agua destilada. Luego, tratados con una solución de ácido peryódico (HIO_4) al 1% durante 15 minutos. Seguidamente se lavó con agua destilada y se aplicó el reactivo de Schiff hasta que se observó tonalidad rosada en los cortes. Finalmente, los cortes fueron lavados con agua corriente y destilada, deshidratados en una secuencia de etanol en concentraciones crecientes (70-96-96-100), aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá. Resultado: GCs neutros y/o glucógeno en color magenta (McManus, 1948).

- AB

La presencia de grupos carboxilados y/o sulfatados en los polisacáridos origina que los GCs sean ácidos (carga negativa). Mediante el uso de colorantes básicos (carga positiva), como el azul alcian, se evidencia a los GCs ácidos carboxilados y/o sulfatados como consecuencia del resultado de las uniones electrostáticas entre el colorante-GCs.

Los cortes fueron desparafinados con xilol por 30 minutos en estufa a $55^\circ C$, hidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentraciones decrecientes (100-96-96-70) y agua destilada. Luego, se aplicaron, de manera separada, tres soluciones de azul alcian utilizando diferentes pH: 0, 5, 1 y 2, 5 por

30 minutos para la identificación de GCs muy sulfatados, sulfatos y sulfatos y/o carboxilados, respectivamente (Lev y Spicer, 1964). Para los controles negativos y positivos se utilizaron cortes de ovarios de *L. maximus* incubados con PBS y con cada una de las técnicas empleadas (Figura 19 a, b), respectivamente (Acuña y col., 2018).

j. Lectinohistoquímica

La determinación de azúcares específicos (AEs) fue realizada mediante el uso de lectinas biotiniladas, técnica denominada lectinohistoquímica (Goldstein y Hayes, 1978). Las lectinas son proteínas con capacidad de unirse a los glúcidos en forma semejante a las inmunoglobulinas, pero sin que medie para ello una reacción antígeno-anticuerpo. Si bien las lectinas pueden ser glicoproteínas, la porción que se une al carbohidrato es siempre la peptídica (Barbeito y col., 2020).

En esta técnica, los cortes fueron montados sobre portaobjetos positivados, desparafinados con xilol en estufa a 55°C y sumergidos en alcohol 100° y 96°. Luego, se sumergieron en metanol al 3% activado con agua oxigenada (H₂O₂) de 100 volúmenes durante 30 minutos a temperatura ambiente, para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, fueron hidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol (96°-96°-70°), lavados con PBS e incubados con albúmina sérica bovina al 1% en PBS durante 30 min en el interior de una cámara húmeda, para bloquear las posibles uniones inespecíficas. Se utilizó una batería de 7 lectinas biotiniladas (Lectin Kit BK 1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) (Tabla 2). La dilución óptima de cada lectina fue 30 lg/ml excepto para PNA (10 lg/ml). La incubación con cada lectina se realizó en una cámara húmeda durante 1 h a 37°C. Por último, los cortes se lavaron por separado e incubaron con estreptavidina-peroxidasa SA-5704 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) a 37°C durante 30 minutos. Luego del lavado con PBS, se

reveló con diaminobencidina (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) (DAB). Todos los cortes fueron contrastados con hematoxilina de Mayer durante 5 segundos, deshidratados mediante su pasaje por una secuencia de etanol en concentración creciente y aclarados con xilol. Por último, el montaje se realizó con bálsamo de Canadá natural (Álwik, Ind. Arg.). Para los controles negativos y positivos, cortes de ovarios de *L. maximus* se incubaron, respectivamente, con PBS y con cada una de las lectinas empleadas (Figura 19 a, b) (Acuña y col, 2018).

Tabla 2. Lectinas usadas, acrónimos y afinidades glicosídicas.

Lectinas	Acrónimo	Afinidad ^a
GRUPO I		Glc/Man
<i>Concanavalia ensiformis</i>	CON-A	β -D-Man; α -D-Glc
GRUPO II		GlcNAc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	β -D-GlcNAc; NeuNAc
GRUPO III		GalNAc-/Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNAc
<i>Glycine maximus</i>	SBA	α -D-GalNAc; b-D-GalNAc
<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	b-Gal
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D-Gal (b1-3)> D-GalNAc
GRUPO IV		L-Fuc
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	L-Fuc

^aGlc, glucosa; Man, manasa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosmina; GlcNAc, acetilglucosamina; NeuNAc, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); L-Fuc, L-fucosa.

k. Inmunohistoquímica

Se utilizó el método indirecto para determinar la inmunomarcación de diferentes antígenos en hembras sin, con preñez temprana y preñez intermedia.

Cada corte de los CU y SI se montó sobre vidrios positivados. El protocolo para inmunohistoquímica fue similar al empleado en otros trabajos realizados en la especie (Flamini y col., 2011). Los cortes provenientes de los siete segmentos

uterinos fueron desparafinados con xilol en estufa a 55°C e hidratados mediante una secuencia de etanol (100°-96°-70°). Luego, se sumergieron en metanol al 3% activado con agua oxigenada (H₂O₂) de 100 volúmenes durante 45 minutos y a temperatura ambiente para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Transcurrido este periodo se lavaron con PBS. La recuperación antigénica se realizó con una solución 0,01M de tampón de citrato, pH 6, en un microondas a potencia media durante 3 minutos. Una vez fríos, fueron lavados con PBS para el bloqueo de uniones inespecíficas con 1% BSA durante 30 minutos. Luego, se lavaron con PBS. Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios: receptor de progesterona (RP), estrógeno alfa (RE-α), caspasa-3 (Cas-3), antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), CD-31 (PECAM-1) y pancitoqueratina (PK) en una cámara húmeda, durante un periodo de 20 hs y a una temperatura 4°C. Posteriormente a un lavado con PBS, se incubaron con anticuerpo secundario monoclonal o policlonal biotinilado (anti-Ig de ratón, anti-Ig de rata, anti-Ig de cobayo y anti-conejo) en cámara húmeda durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el anticuerpo secundario se realizó amplificación con el complejo estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos (LSBA, BioGenex, San Ramon, CA 94683, USA) tras un lavado con PBS. Finalmente, y tras un último lavado con PBS, los cortes fueron revelados con DAB, contrastados con hematoxilina de Mayer durante 5-10 segundos, virados en agua corriente y lavados en agua destilada. El tiempo utilizado del contraste nuclear varió según la localización de la positividad para cada anticuerpo primario. Para anticuerpos con marcación nuclear el tiempo fue de 5 segundos, mientras que 10 segundos para aquellos con marcación citoplasmática. Posteriormente, los cortes fueron deshidratados mediante una secuencia de etanol en concentración creciente, aclarados con xilol y montados con bálsamo de Canadá.

En los cortes provenientes de los SI de hembras con gestación temprana, además de los anticuerpos anteriores, excepto el RE- α , se utilizó el anticuerpo primario anti-vimentina (VIM). En las hembras con gestación intermedia solo se utilizaron los anticuerpos anti- PCNA, Cas-3, PK, VIM.

Como control negativo se utilizaron cortes de ovario de *L. maximus* incubados con PBS. En cambio, para control positivo se utilizaron cortes de placenta (VIM, PK, PCNA, Cas-3) y ovario (RE- α y PR) de *L. maximus* y sarcomas felinos (CD-31) (Jensen y col., 2008; Flamini y col., 2011; Santelises Iglesias, 2019) (Figura 19 a, b). En las tablas 3 a y b se especifican las variaciones en el protocolo y las diluciones para cada anticuerpo primario en cada grupo de hembra estudiado.

Tabla 3a. Detalles de las variaciones en el protocolo de inmunohistoquímica y los anticuerpos empleados en las hembras sin preñez.

Antígeno	RP	RE- α	Cas-3	PCNA	CD-31
Recuperación antigénica	-	-	-	Buffer citrato pH6, potencia máxima, 1, 3 minutos (x2), temperatura de subhervor	-
Dilución anticuerpo primario (Anti-)	1:200/PBS (Abcam, Cat# Ab191138)	1:30/PBS (Abcam, Cat# Ab150560)	1:800/PBS (Sigma-Aldrich, Cat# AB3623)	1:1000/PBS (Sigma-Aldrich, Cat# SAB2701819)	1:50/PBS (Abcam Cat# ab28364)
Dilución anticuerpo secundario	Ready to use, biotinilado LSBA2 System-HRP, DakoCytomation, Cat#K0675	Ready to use, biotinilado LSBA2 System-HRP, DakoCytomation, Cat#K0675	Ready to use, biotinilado LSBA2 System-HRP, DakoCytomation, Cat#K0675	Ready to use, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cod k4001	Ready to use, biotinilado LSBA2 System-HRP, DakoCytomation, Cat#K0675
Incubación con streptavidina	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	-	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA

Tabla 3b. Detalles de las variaciones en el protocolo de inmunohistoquímica y los anticuerpos empleados en las hembras con preñez temprana e intermedia.

Antígeno	RP	Cas-3	PCNA	CD-31	PK	VIM
Recuperación antigénica	-	-	Buffer citrato pH6, potencia máxima, 1, 3 minutos (x2), temperatura de subhervor	-	Buffer citrato pH6, potencia máxima, 1, 3 minutos (x2), temperatura de subhervor	Buffer citrato pH6, potencia máxima, 1, 3 minutos (x2), temperatura de subhervor
Dilución anticuerpo primario (Anti-)	1:200/PBS (Abcam, Cat# Ab191138)	1:800/PBS (Sigma-Aldrich, Cat# AB3623)	1:1000/PBS (Sigma-Aldrich, Cat# SAB2701819)	1:50/PBS (Abcam Cat# ab28364)	1:200/PBS (Agilent Cat# Zo622)	Ready to use (BioGenex Cat# AM074)
Dilución anticuerpo secundario	Goat antiRabbit biotinilado (1:200/PBS)	Goat antiRabbit biotinilado (1:200/PBS)	Ready to use, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cod k4001	Ready to use, biotinilado LSBA2 System-HRP, DakoCytomation, Cat# K0675	Goat antiRabbit biotinilado (1:200/PBS)	Ready to use, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cod k4001
Incubación con streptavidina	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	-	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	Ready to use, LSBA, BioGenex, San Ramon, CA	-

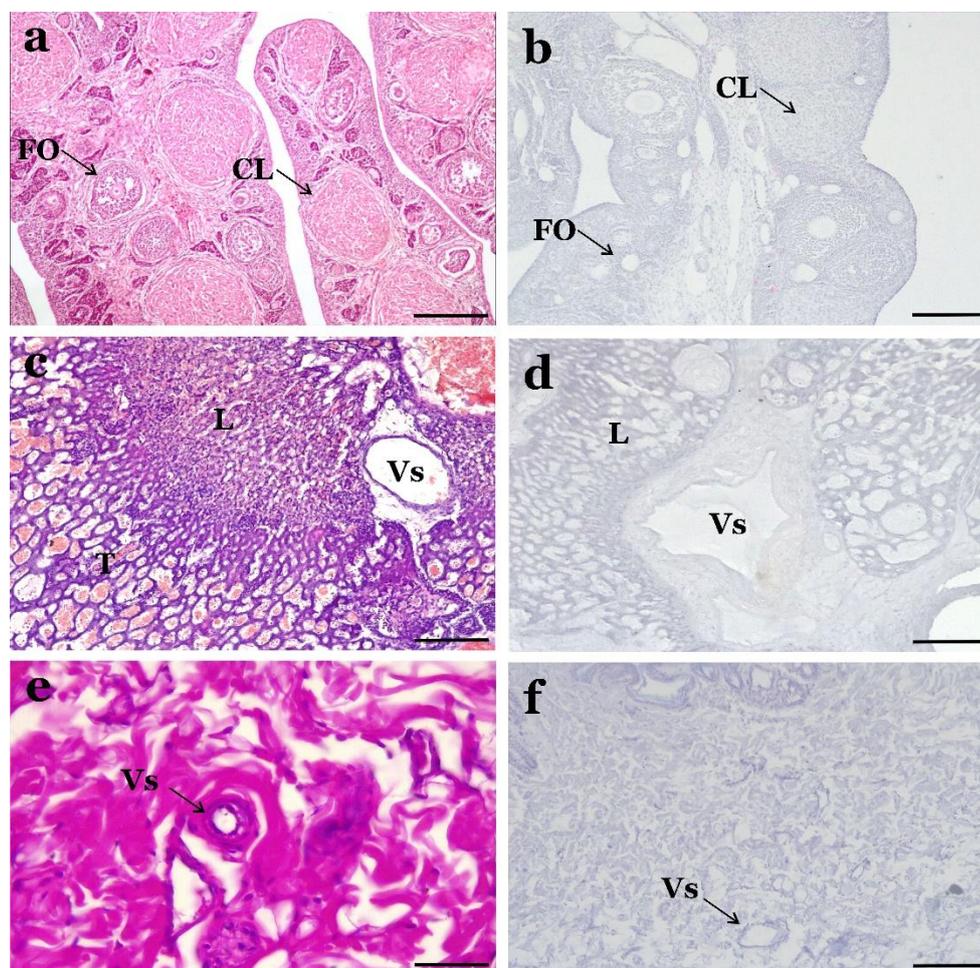


Figura 19 a. Órganos utilizados como controles para las técnicas histoquímica, lectinohistoquímica e inmunohistoquímica. a, c y e. Ovario y placenta de vizcacha,

y piel de gato. Hematoxilina y eosina; **b, d y f.** Controles negativos. Abreviaturas: Barras de escala:

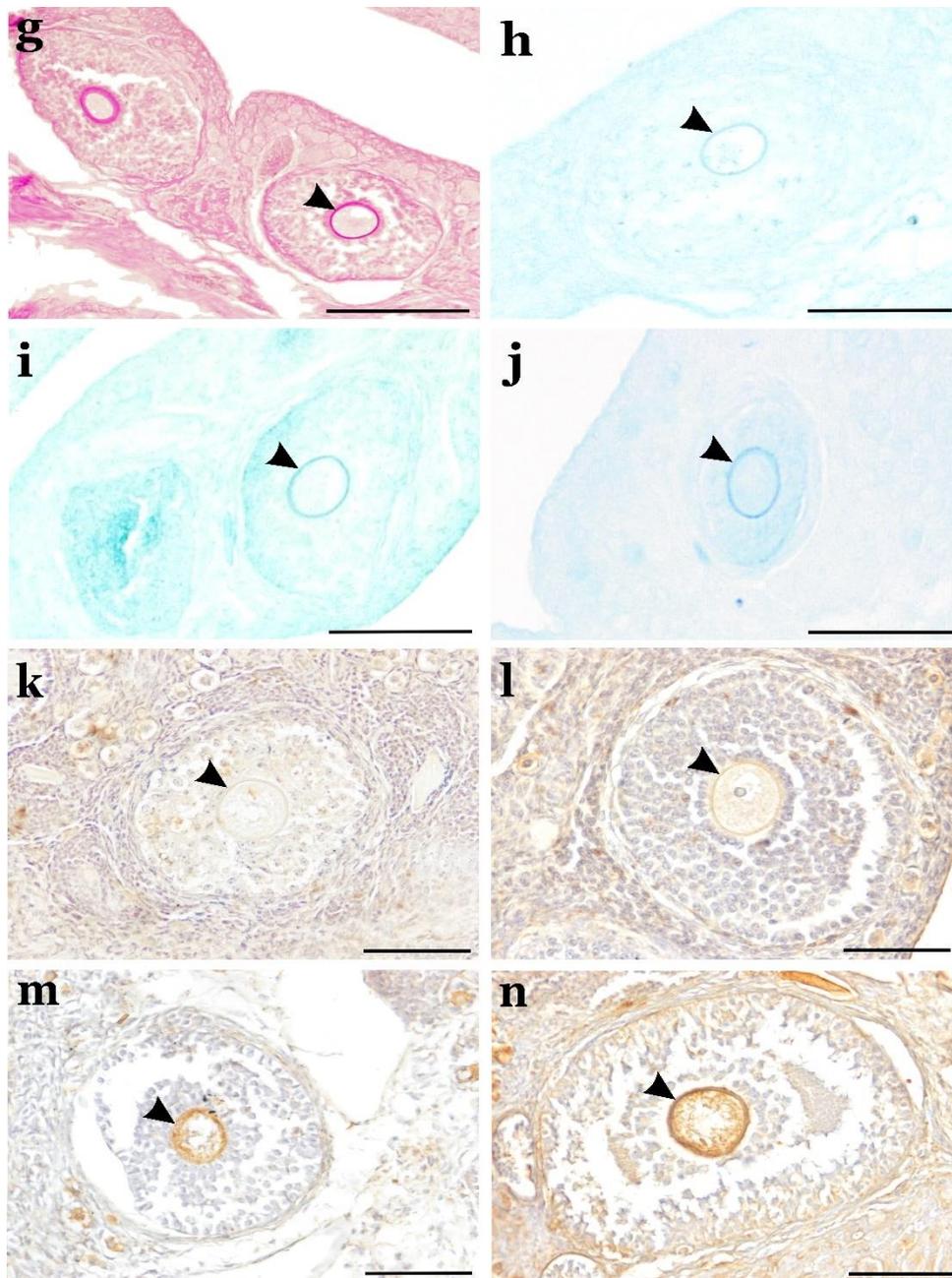


Figura 19 b. Controles positivos para las técnicas histoquímica y lectinohistoquímica. Las cabezas de flecha indican la marcación en la zona pelúcida de los folículos ováricos. **g.** PAS+; **h.** AB pH 0,5+; **i.** AB pH 1+; **j.** AB pH 2,5+; **k.** Sin marcación; **l.** Marcación leve (RCA-I+); **m.** Marcación moderada (WGA+); **n.** Marcación intensa (WGA+).

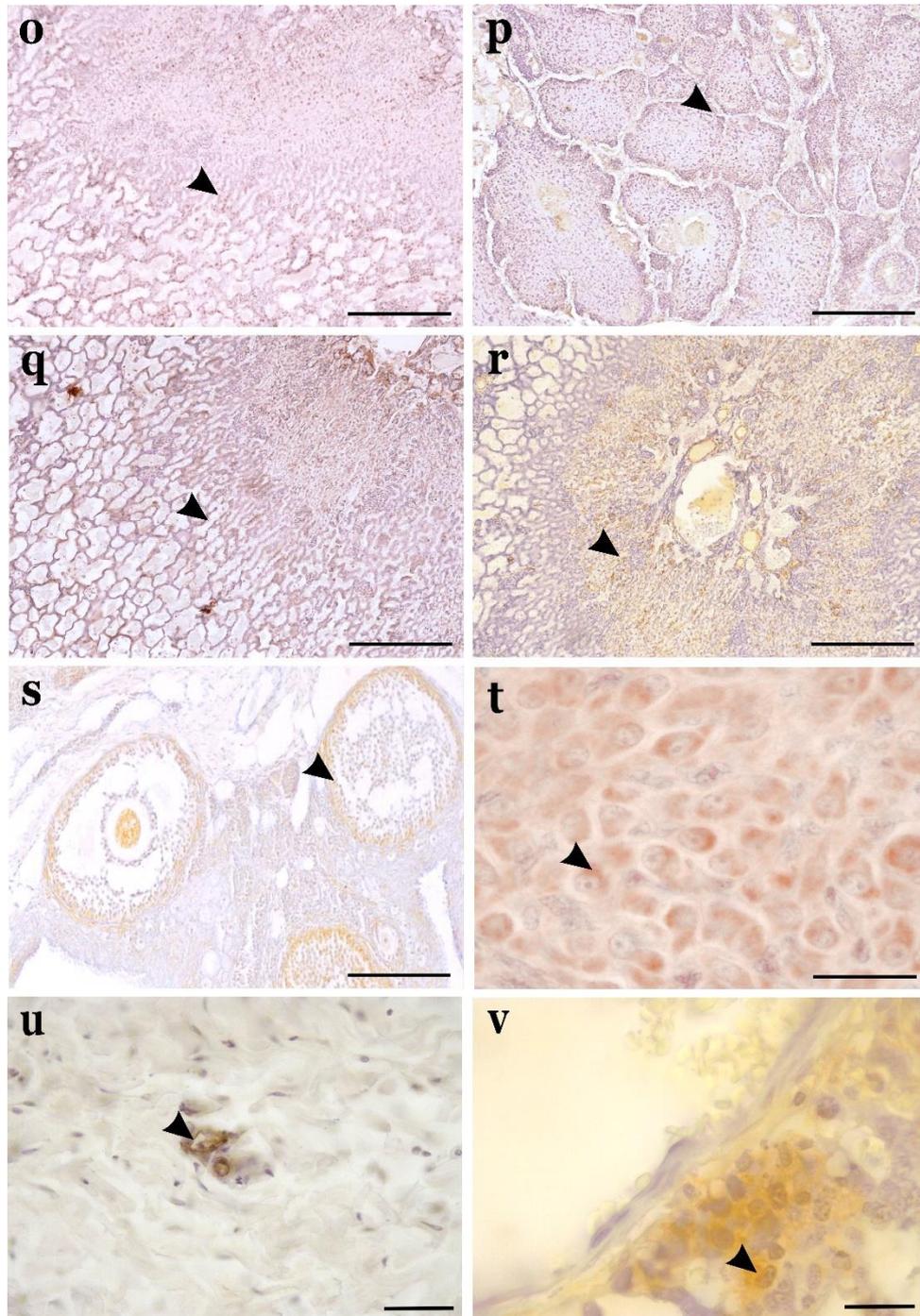


Figura 19 c. Controles positivos para la técnica inmunohistoquímica. o. Trofoblasto PCNA+; **p.** Trofoblásto Cas-3+; **q.** Trofoblasto PK+; **r.** Vaso sanguíneo Vim+; **s.** Folículo ovárico y cuerpo lúteo RE-α+; **t.** Células luteales RP+; **u.** Vaso sanguíneo CD-31+; **v.** *uNK* DBA+.

I. Morfometría

Se evaluaron diferentes parámetros morfológicos tanto en las hembras sin preñez como en aquellas con gestación temprana.

En las hembras sin preñez se cuantificaron los siguientes parámetros morfológicos: espesor total de la pared uterina, EU; espesor del endometrio, EE; altura del epitelio luminal, hEL; altura del epitelio glandular, hEG; EL; espesor del miometrio, EM; espesor de la capa muscular interna, EMI; espesor del estrato vascular, EES; espesor de la capa muscular externa, EME; área glandular, AG; área vascular endometrial, AVE y del estrato vascular del miometrio, AVM (Figura 20). Para el espesor y el área de cada uno de los 7 segmentos de los CU se obtuvieron fotografías de cuatro campos mediante aumento de 4x, mientras que se utilizaron fotografías realizadas a 10x para establecer las alturas. La altura, el espesor y el área se cuantificaron a partir de los cortes coloreados con la coloración tricrómica de Masson debido a que esta coloración permite establecer límites más precisos como consecuencia de la diferenciación que genera entre los tejidos, en este caso, epitelial y conectivo. En cambio, para el área vascular, la cuantificación se realizó con los cortes tratados con el anticuerpo primario para endotelio vascular CD-31.

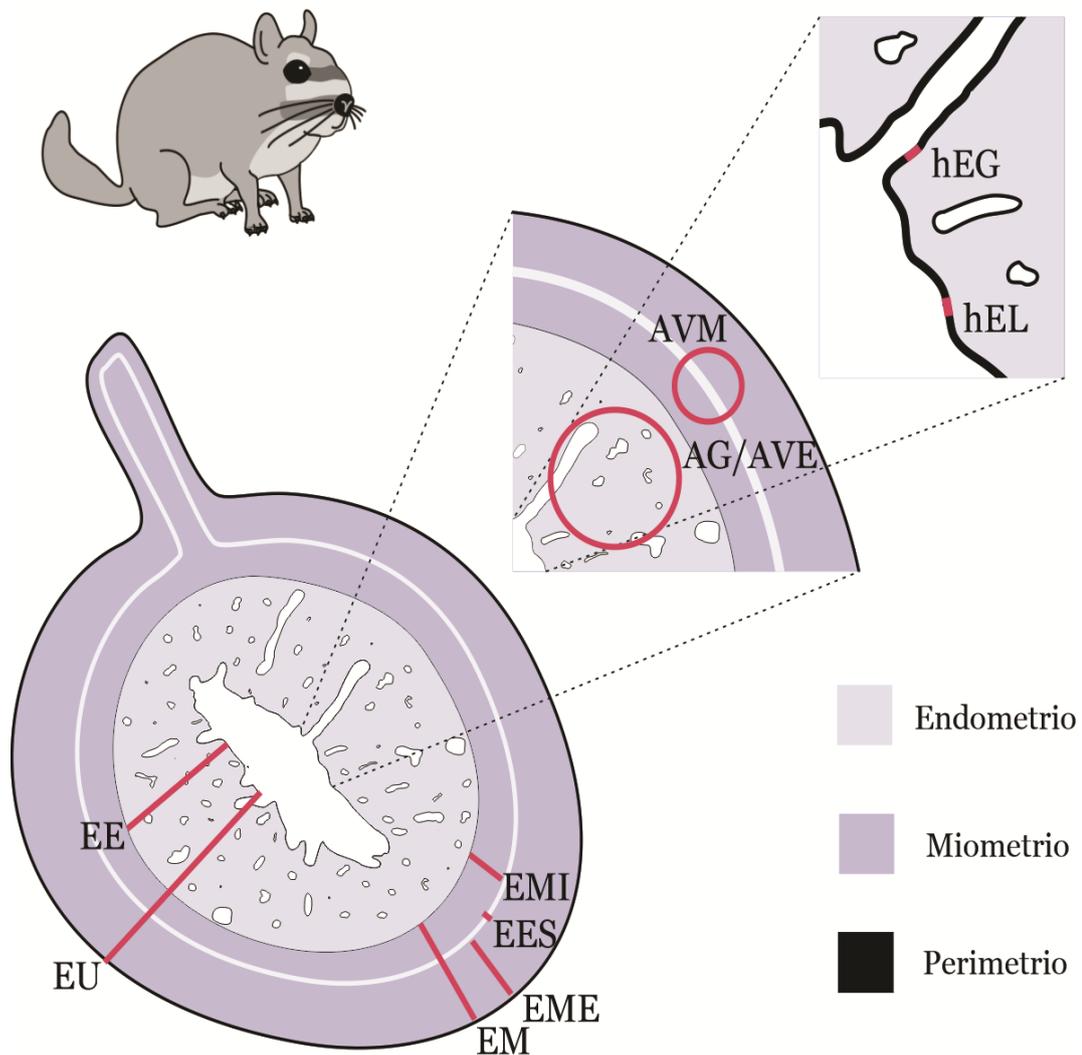


Figura 20. Representación esquemática de los parámetros morfológicos cuantificados en *L. maximus*. Abreviaturas: espesor total de la pared uterina, EU; espesor del endometrio, EE; altura del epitelio luminal, hEL; altura del epitelio glandular, hEG; espesor del miometrio, EM; espesor de la capa muscular interna, EMI; espesor del estrato vascular, EES; espesor de la capa muscular externa, EME; área glandular, AG; área vascular endometrial, AVE y del estrato vascular del miometrio, AVM.

Con excepción del área, los restantes parámetros son lineales, y cada medida se correspondió con el eje mayor de la célula, la pared uterina o la túnica del órgano. En cambio, para AG y AV se realizó el siguiente procedimiento: luego de establecer su calibración espacial, se aplicó un ROI¹¹ a las áreas de tejido a

¹¹ROI: región de interés, es la herramienta que permite delimitar de manera manual el objeto de interés (Portiansky, 2013).

cuantificar. Para las glándulas, ese ROI se estableció en el endometrio. Mientras que para los vasos sanguíneos en el endometrio y el estrato vascular del miometrio. Se consideró como imagen completa al área total de referencia (área unitaria) (Figura 21 a-e). De esta forma, el área obtenida dentro del ROI, el área ocupada por las glándulas o los vasos, se dividió por el área unitaria. Las cuantificaciones de los distintos parámetros se realizaron con el software ImageJ (v. 1.53) (Rueden y col., 2017).

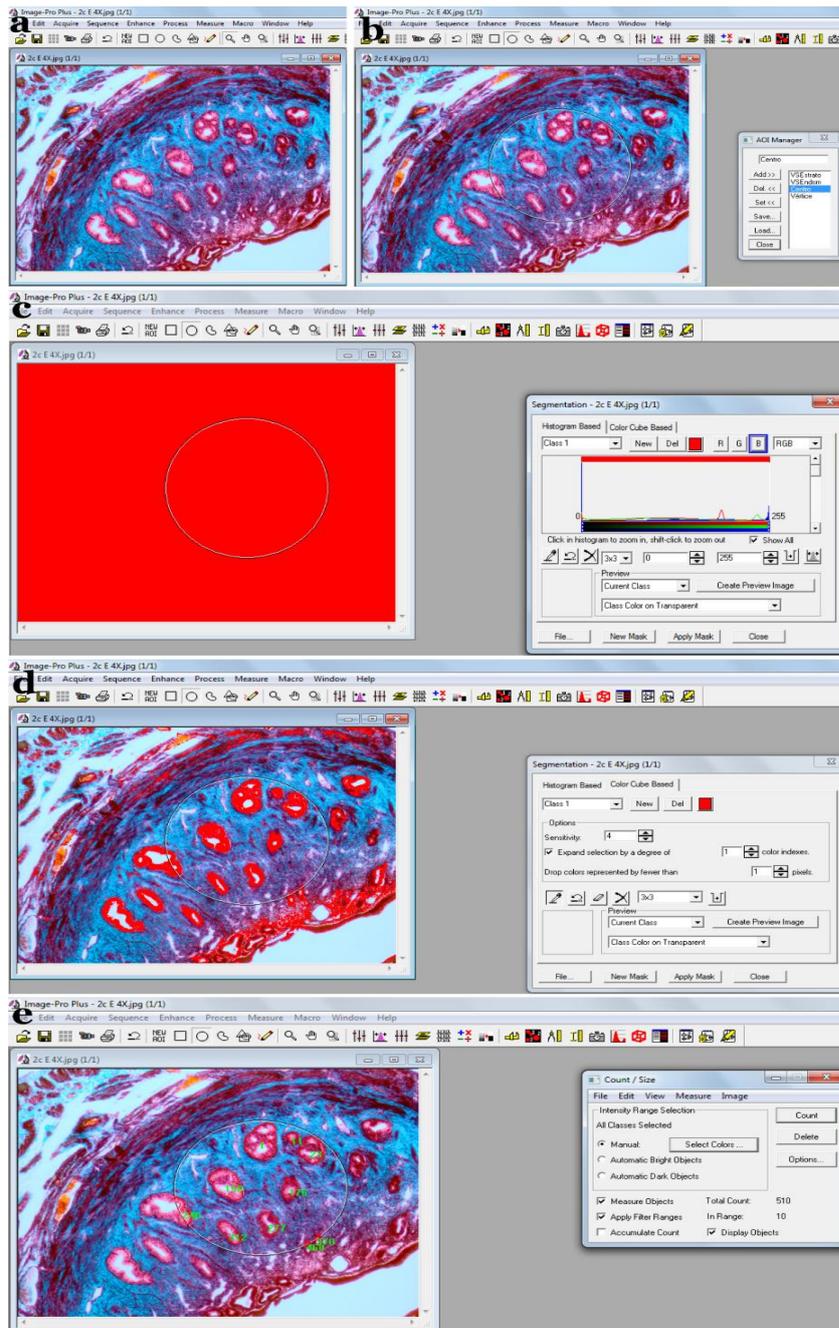


Figura 21. Metodología utilizada para la cuantificación realizada con el software ImageJ. a. Calibrado de un corte 4x y coloreado con tricrómico de Masson para la determinación del área glandular; **b.** Delimitación de un ROI circular; **c y d.** Segmentación; **e.** Cuantificación.

Por su parte, en las hembras con preñez tempranas solo se cuantificaron las AG y AV del mismo modo con la diferencia que la AV se determinó únicamente en el estrato vascular del miometrio, y para cada SI.

El estudio morfométrico también incluyó el cálculo de la tasa de resorción en las hembras con preñez temprana. Para ello se contabilizó la cantidad de sitios de implantación y, a continuación, la tasa de resorción embrionaria se determinó del siguiente modo: $\%RE = (SI-r/SI-t) \cdot 100$, donde: RE, tasa de resorción embrionaria, SI-r, número de SI en resorción y SI-t, número de SI totales.

m. Microscopía óptica

Todas las imágenes, con excepción de las ultrasonográficas y macroscópicas, fueron capturadas con una cámara digital (Olympus DP-71, Japón) montada sobre un microscopio de investigación (Olympus BX53, Japón) y almacenadas en formato TIF para su posterior análisis. Para la determinación de la marcación obtenida con las técnicas histoquímicas y lectinohistoquímica se empleó la siguiente escala semicuantitativa: 0, sin marcación; 1, marcación leve; 2, marcación moderada, y 3, marcación intensa. Esta escala ha sido utilizada en trabajos previos realizados en esta especie (Acuña y col., 2018; Tano de la Hoz y col., 2017).

n. Microscopía óptica de alta resolución

Esta variedad de microscopía óptica se realizó en el Área de Microscopía Electrónica, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, por la Dra. Andrea Cristofolini. A partir del material no utilizado para microscopía óptica, se tomaron muestras de 1 mm³ que, posteriormente, se fijaron con glutaraldehído 2,5% en solución tamponada de fosfato (0,2 M, pH 7,2-7,4) durante 24 horas a 4°C. Luego, se sometieron a una segunda fijación con tetróxido de osmio 1%, durante 2 a 4 h, a temperatura ambiente. La deshidratación se realizó mediante una secuencia de acetona en concentraciones crecientes (50%, 70%, 90% y 100%). Posteriormente, las muestras fueron incluidas en EMBED 812 a 60 °C

durante 24 horas. Una vez obtenidos los tacos, se realizaron cortes semifinos de 0,25 μm de espesor. Estos cortes fueron coloreados con azul de toluidina/azur II sobre platina termostaticada durante 20 segundos. Luego, fueron lavados con agua destilada y montados sobre portaobjetos en DPX (Merk®) para ser observados a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición y almacenamiento de las imágenes en formato TIF se realizó mediante una cámara digital (Powershot G6, 7.1 MPx, Canon INC, Japón) montada sobre el microscopio óptico trinocular. El procesamiento de las imágenes se realizó por medio del programa AxioVision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania).

o. Microscopía electrónica de barrido

Para la obtención de las imágenes de los CU y SI con el microscopio electrónico de barrido (MEB) se utilizó el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis (SeMFI) del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física "Ing. Gregorio Cusminsky" (LIMF), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Las muestras se fijaron en formol 10% y se conservaron en etanol 96°. Posteriormente, al momento de entregar las muestras al servicio, se pasaron a alcohol 100°. Las muestras fueron secadas por punto crítico (CO₂) con el equipo Marca Emitech modelo K850 (Quorum Technologies, Reino Unido) y metalizadas con el método de pulverización catódica que permitió el depósito de capas de oro de 15 a 20 nm para proporcionar conductividad térmica y eléctrica (Oerlikon Balzers, Suecia). Por último, las muestras se secaron y observaron con el MEB Philips SEM 505 (Philips, Países Bajos) conectado a un software para capturar y procesar imágenes digitales (ADDA II, Sistema de imágenes blandas - SIS).

p. Análisis estadístico

Para cada parámetro morfológico (espesor, altura, área, largo y diámetro), obtenido por ultrasonido, calibre o con el software ImageJ, se obtuvo el valor medio y el desvío estándar a partir del uso del software Infostat (InfoStat, <http://www.infostat.com.ar/?lang=en>). Con los datos de cada parámetro se construyeron gráficos de barras para su mejor análisis. Además, con este software se realizaron las pruebas estadísticas Análisis de la Varianza (ANOVA) y test de Duncan ya que cada grupo de hembras involucró más de una muestra (7 segmentos uterinos y 5 sitios de implantación). Para ambas pruebas se consideró como diferencia significativa a $p \leq 0,05$.

CAPÍTULO III

Estudios en úteros de hembras no preñadas

Introducción

Entre otras funciones, el útero proporciona un entorno embriotrópico para la supervivencia y el desarrollo del *conceptus*, y el parto de la descendencia (Bartol y col., 1999; Spencer, 2014). El éxito de estos procesos depende de la correcta interacción entre el blastocisto competente y el endometrio uterino durante el período de peri-implantación (Dey y col., 2004; Red-Horse y col., 2004; Wang y Dey, 2006; Zhang y col., 2013). Durante este período, en el útero ocurre una secuencia de eventos, entre ellos, crecimiento, diferenciación y regresión de sus componentes debido a la señalización de varias moléculas con actividad local (Bell, 1983; Kane y col., 1997; Correia-da-Silva y col., 2004; Öner y col., 2010). Estas moléculas son factores de crecimiento, citocinas, y mediadores lipídicos (Raheem, 2018; Wooding y Burton, 2008) que actúan como factores autocrinos, paracrinos y yuxtacrinos que, en conjunto con las hormonas ováricas, facilitan la implantación (Dey y col., 2004; Wang y Dey, 2006).

Los cambios uterinos varían entre las diferentes especies (Bazer, 2011), por ejemplo, antes de la implantación de los blastocitos de la rata hay un balance entre la proliferación y muerte celular en el epitelio luminal uterino y las células estromales de la lámina propia endometrial (Öner y col., 2010). La implantación también requiere de la participación de glicoconjugados del glicocáliz luminal uterino para el reconocimiento, la adhesión y la supervivencia de los embriones como se observa en *Canis familiaris* (Leitner y col., 2003), *Vicugna pacos* (Barraza y col., 2018), y *Aepyceros melampus* (Jones y col., 2019). La supervivencia y la nutrición del *conceptus* durante la preñez temprana dependen de la secreción

úterina: histotrofo, tal como se ha demostrado para especies con placenta no invasivas (Carson y col., 2000; Stewart y col., 2000; Gray y col., 2001) e invasivas (Burton y col., 2007; Burton y col., 2011; Salamonsen y col., 2013; Spencer, 2014; Moser y Huppertz, 2017; Bastos y col., 2019; Kelleher y col., 2018, 2019). En períodos gestacionales posteriores, esta nutrición es reemplazada por la nutrición hemotrópica, para lo que se requiere del desarrollo simultáneo de los vasos placentarios maternos y embrionarios/fetales. Los vasos sanguíneos maternos son relevantes incluso antes de la implantación. Por ejemplo, en hembras no gestantes de *Vicugna pacos* se observó una vascularización mayor en el cuerno uterino izquierdo, en comparación con el derecho. Esta particularidad parece estar relacionada con la implantación única que ocurre exclusivamente en ese sitio. Esta vascularización diferencial de los cuernos uterinos de alpaca ya se observa durante su desarrollo prenatal (Mendoza y col., 2013).

Dentro del período de peri-implantación ocurre la mayoría de las muertes embrionarias debido a deficiencias de las funciones uterinas, como las mencionadas anteriormente, a fallas en el desarrollo adecuado del *conceptus*, el reconocimiento del embarazo o a la progresión de la implantación y la placentación (Bazer y col., 2009). La muerte prenatal temprana implica la degeneración y la reabsorción completa del *conceptus*. Esta puede deberse a procesos patológicos (Givens y Marley, 2008) o fisiológicos, como ocurre en la vizcacha (Weir, 1971a; Hautier y col., 2011). En *L. maximus* se implantan alrededor de 6 a 8 blastocistos por cuerno uterino (Weir, 1971b; Roberts y Weir, 1973), aunque sólo los caudales crecen y se desarrollan. Luego de $154 \pm 0,5$ días de gestación, solo dos crías precociales son paridas (Weir, 1971a, 1971b; Jackson, 1989). Las restantes implantaciones (craneales y medias) se resorben (Flamini y col., 2011, 2019; Weir, 1971a) a partir de los 26 a 35 dpc (Weir, 1971b; Roberts y Perry, 1974). Estudios morfológicos convencionales en los cuernos uterinos de vizcachas sin y con preñez

no mostraron diferencias a partir de las cuales se pudiera inferir el origen de la supervivencia diferencial entre las implantaciones (Roberts y Weir, 1973). Posteriormente no se realizaron otros estudios para determinar las causas de esta muerte embrionaria temprana. Recientemente, se hallaron diferencias anatómicas en la vascularización de los cuernos uterinos de los fetos hembra. En estos, las regiones uterinas próximas al cérvix presentan vasos más grandes. Estas regiones se corresponden con los sitios que continúan con su crecimiento y desarrollo las implantaciones caudales (Flamini y col., 2020). Otros resultados obtenidos mediante estudios angiográficos a partir de hembras sin preñez confirman la existencia de este patrón vascular (Giacchino y col., 2020).

El estudio de la muerte embrionaria bajo condiciones experimentales condujo al desarrollo de un modelo murino generado por cruzamiento entre dos cepas de ratón en el que se produce un porcentaje elevado de muertes embrionarias (Blois y col., 2005). Dado que la muerte embrionaria temprana en *L. maximus* es espontánea, fisiológica, sectorizada y alcanza un porcentaje muy superior al encontrado en el modelo murino mencionado, esta especie podría ser un excelente modelo para estudiar el mismo proceso en humanos (Macklon y col., 2002), mamíferos de interés productivo (Vanroose y col., 2000) o incluso en aquellas especies consideradas parte de los programas de conservación (Andrabi y Maxwell, 2007).

Materiales y métodos

Esta sección se encuentra detallada en el CAPÍTULO II

Resultados

- Descripciones macroscópicas y ecográficas

Externamente, ambos cuernos uterinos fueron semejantes entre sí y presentaron una forma tubular (Figura 22). Mediante el estudio por ultrasonido, los cuernos uterinos se observaron en la región caudal del abdomen, presentaron una pared ecogénica y una luz de contenido normal. En secciones longitudinales, el diámetro de ambos cuernos aumentó en dirección craneocaudal, siendo el valor $0,33 \pm 0,08$, $0,41 \pm 0,08$, y $0,66 \pm 0,01$ cm en las regiones craneal, media y caudal, respectivamente. En sección transversal se corroboró la forma tubular de cada cuerno uterino debido a sus contornos circulares (Figura 23 a, b). También se observó el incremento del espesor de la pared uterina en la misma dirección.

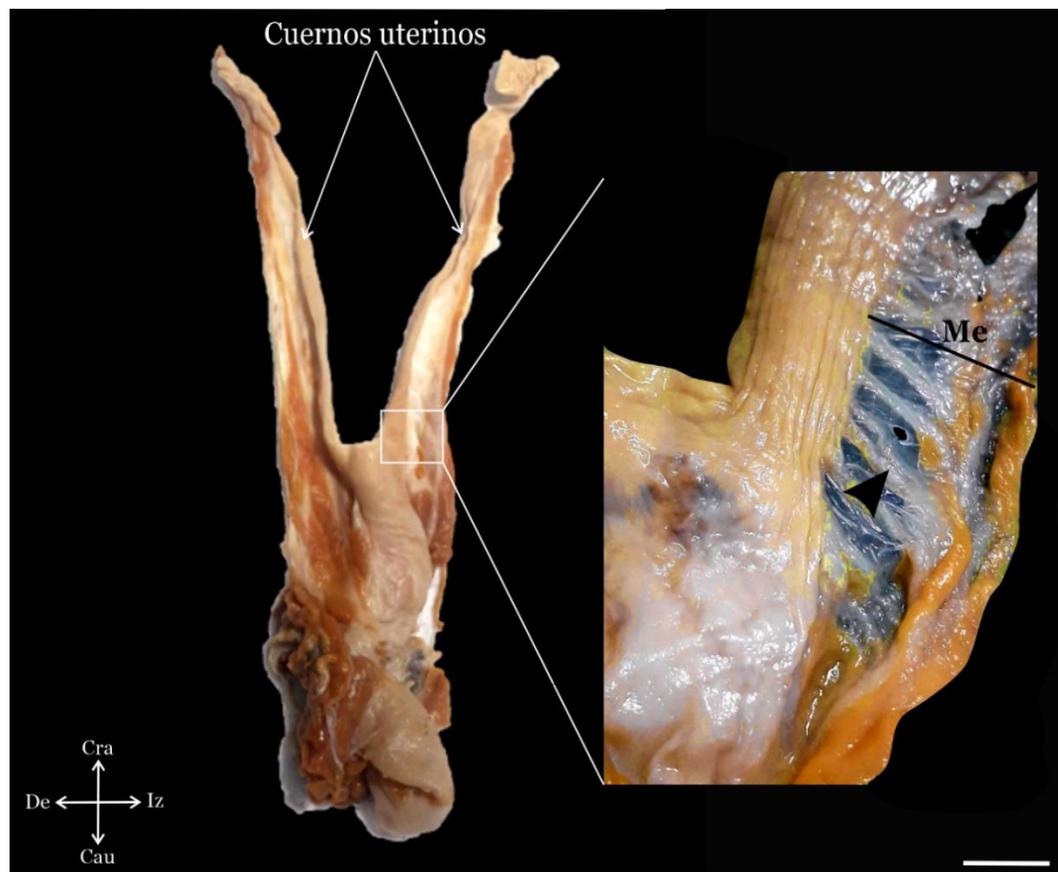


Figura 22. Observación macroscópica de los cuernos uterinos de *L. maximus* sin preñez. Inserto: detalle de los vasos sanguíneos mesométriales (cabeza de flecha). Abreviatura: Me, mesometrio. Barra de escala: 1 cm.

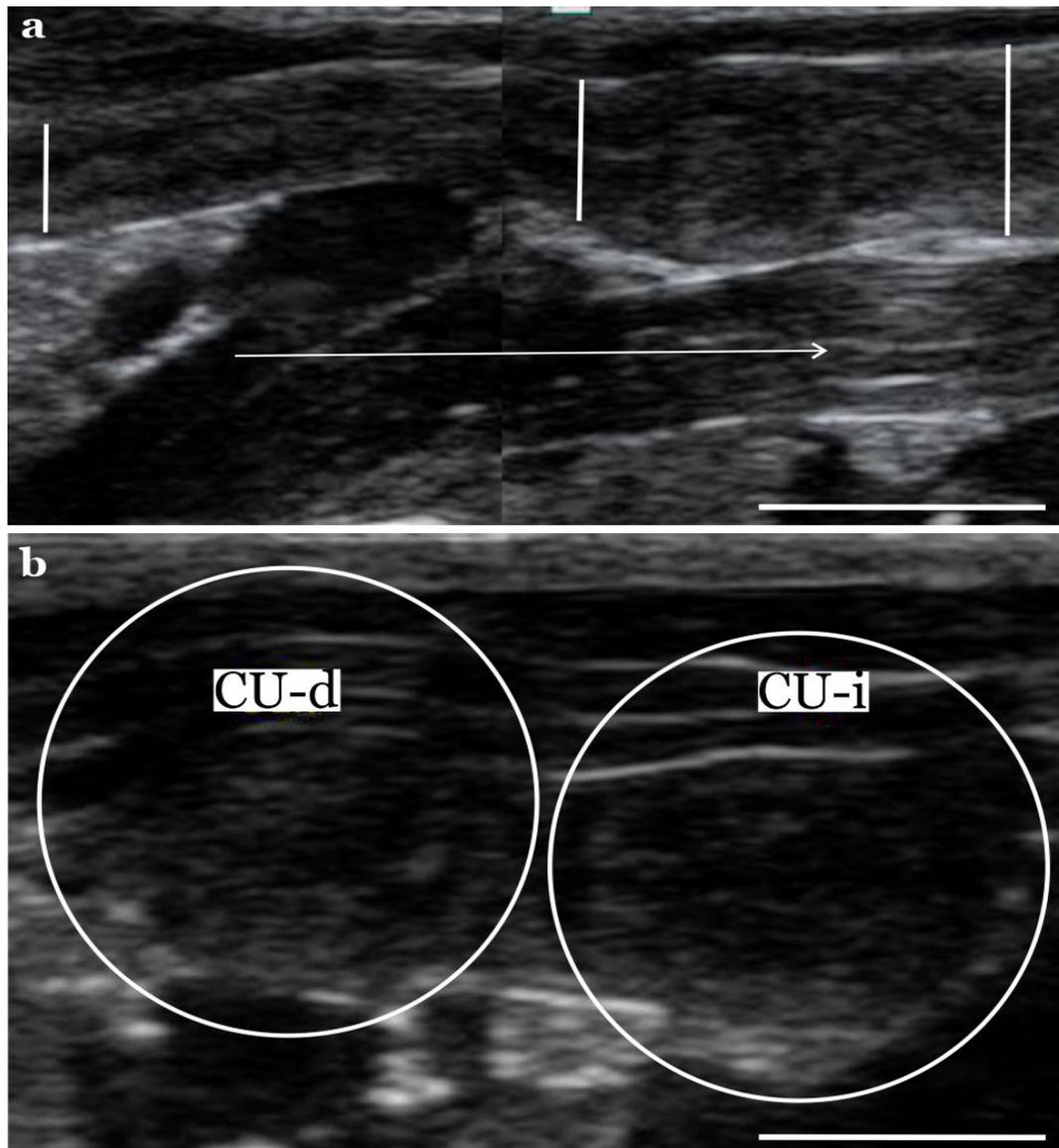


Figura 23. Observación ultrasonográfica de los cuernos uterinos de *L. maximus* sin preñez. a. Sección longitudinal, las barras indican el espesor en los segmentos craneal, media y caudal. La flecha indica el sentido craneocaudal; **b.** Sección transversal de los cuernos uterinos derecho (CU-d) e izquierdo (CU-I). Abreviaturas: Cau, caudal; Cra, Craneal; De, derecha; Iz, izquierda. Barras de escala: 1 cm.

- Descripción microscópica

La observación al microscopio óptico de los cortes coloreados con hematoxilina-eosina de los siete segmentos uterinos reveló la organización del órgano en tres túnicas: endometrio (mucosa), miometrio (muscular) y perimetrio (serosa) (Figura 24 a, b). La característica histológica del endometrio, miometrio y

perimetrio fueron similares entre los siete segmentos uterinos. El revestimiento endometrial constó de un epitelio simple cilíndrico, asociado con una membrana basal, y una lámina propia de tejido conectivo laxo. En esta última predominaron los fibroblastos, los linfocitos y las células plasmáticas. Esta celularidad presentó una tendencia de decrecimiento hacia el miometrio. Mediante la coloración tricrómica de Gomori, la reticulina de Gomori y la orceína de Partner se identificaron y visualizaron fibras colágenas (Figura 24 c, d), reticulares (Figura 24 e, f) y elásticas (Figura 24 g, h). Por otro lado, la lámina propia presentó glándulas uterinas tubulares con un epitelio similar al superficial. El miometrio consistió en tejido muscular liso dispuesto en dos capas, una interna y otra externa. Entre ambas capas, se observó un estrato vascular conformado por vasos sanguíneos con diámetro variable, y entre ellos, fibras de colágeno en una mayor proporción en comparación con la cantidad de fibras reticulares y elásticas. La capa más externa del órgano, el perimetrio, presentó tejido conectivo laxo y un mesotelio con células planas.

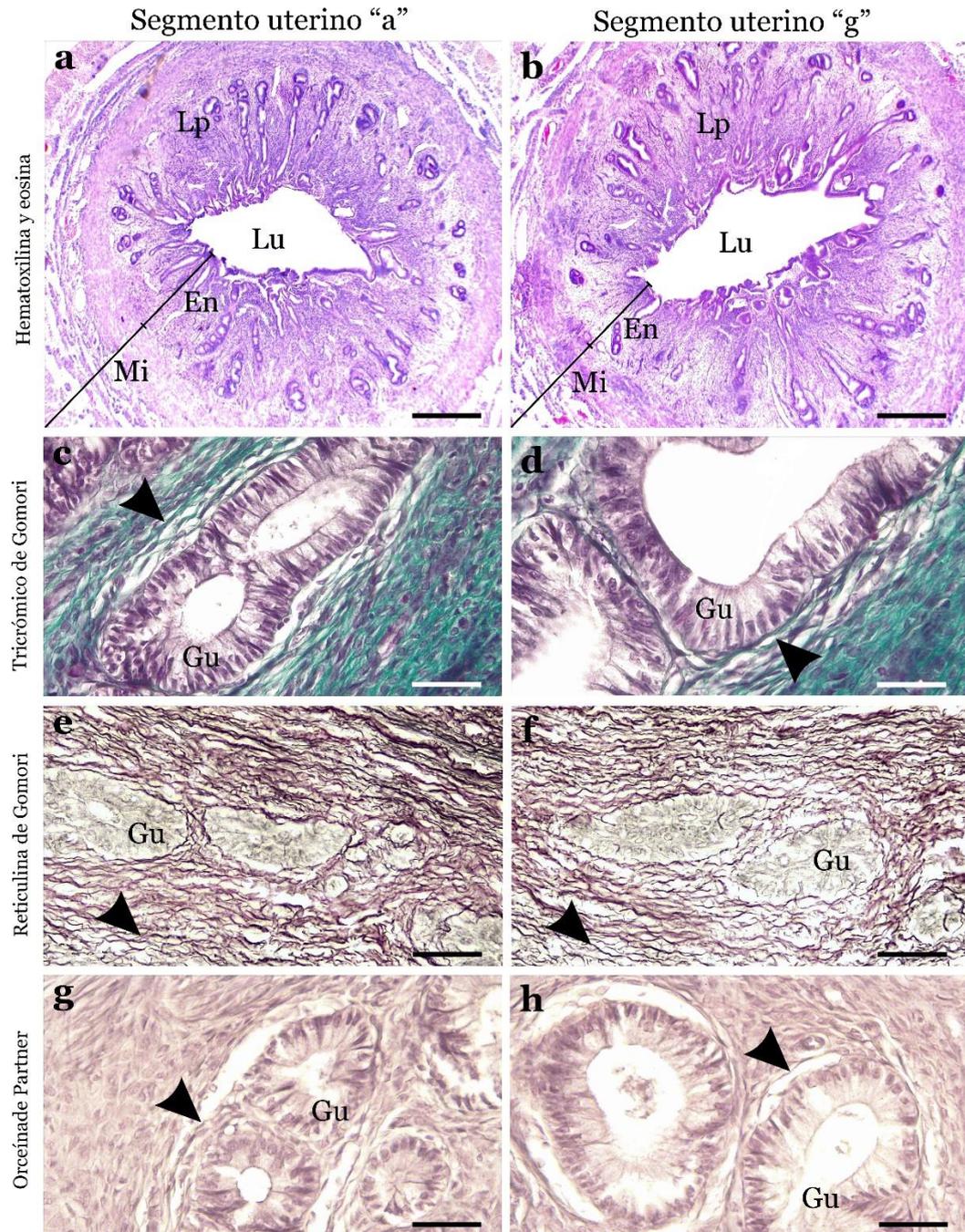


Figura 24. Morfología general uterina de los segmentos uterinos “a” (cranial) y “g” (caudal) de *L. maximus* sin preñez. a y b. Organización histológica. Hematoxilina y eosina. c y d. Fibras colágenas. Tricrómico de Gomori; e y f. Fibras reticulares. Reticulina de Gomori; g y h. Fibras elásticas. Orceína de Partner. Las puntas de flecha negra indican cada tipo de fibra. Abreviaturas: En, endometrio; Gu, glándulas uterinas; Lu, lumen Lp, lámina propia; Mi, miometrio. Barras de escala: 500 μ m (a, b); 50 μ m (c-h).

- Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR)

Con la utilización de la MOAR se observaron las mismas características morfológicas descritas anteriormente, aunque se pudieron analizar más detalles de los tipos celulares y componentes de la matriz extracelular. Las células epiteliales poseen forma cilíndrica, núcleo oval localizado en el tercio basal y con 1-2 nucleolos. El tejido conectivo presentó abundantes fibroblastos, con núcleos alargados y eucromáticos, y una matriz extracelular en la que predominaron las fibras colágenas como componente fibrilar. Las fibras musculares lisas de las capas del miometrio presentaron forma fusiforme, núcleos alargados y provistos de más de un nucleolo. Los vasos sanguíneos delimitados por células endoteliales variaron en tamaño, característica que confirman los estudios morfométricos, entre los segmentos uterinos (Figura 25 a, b).

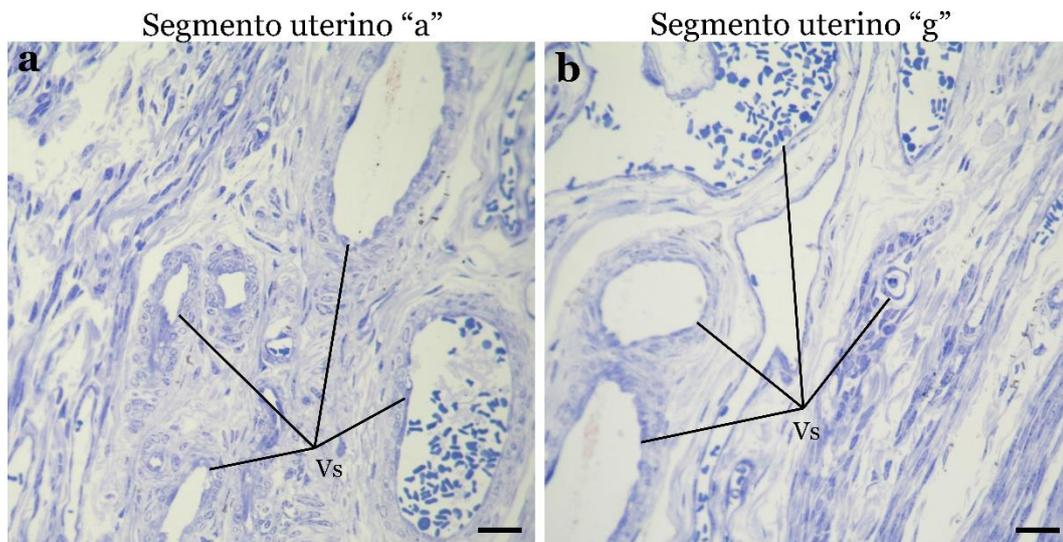


Figura 25. MOAR de los segmentos uterinos de *L. maximus* sin preñez. a y b. Segmentos uterinos “a” (cranial) y “g” (caudal). Se observa la diferencia de tamaño de los vasos sanguíneos entre ambos segmentos. Abreviatura: Vs, vasos sanguíneos. Barra de escala: 20 μ m.

- Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La observación de los segmentos uterinos a baja magnificación del MEB mostró la organización del útero en tres tunicas, endometrio, miometrio y perimetrio, también la tendencia a que el espesor de las tunicas endometrio y miometrio se incrementen entre los segmentos, en sentido craneocaudal (Figura 26 a, b). A mayores magnificaciones se observaron características morfológicas semejantes a las observadas mediante el estudio histológico de cada túnica. Estas características no difieren en su organización entre los segmentos uterinos analizados. El endometrio se observó tapizado por tejido epitelial de revestimiento, como así también tejido conectivo de la lámina propia. Además, se reconocieron, leucocitos (Figura 26 c, d) y glándulas endometriales de tamaño y recorrido variable (Figura 26 e, f). En el miometrio se observó la disposición del tejido muscular liso que conforma a las capas circular y longitudinal, también vasos sanguíneos de diámetro variable que forman parte del estrato vascular localizado entre ambas capas. El perimetrio se observó formado por una capa de tejido conectivo laxo y un epitelio simple plano. Estas magnificaciones también permitieron observar diferencias en cuanto a las glándulas y los vasos sanguíneos (Figura 26 g, h).

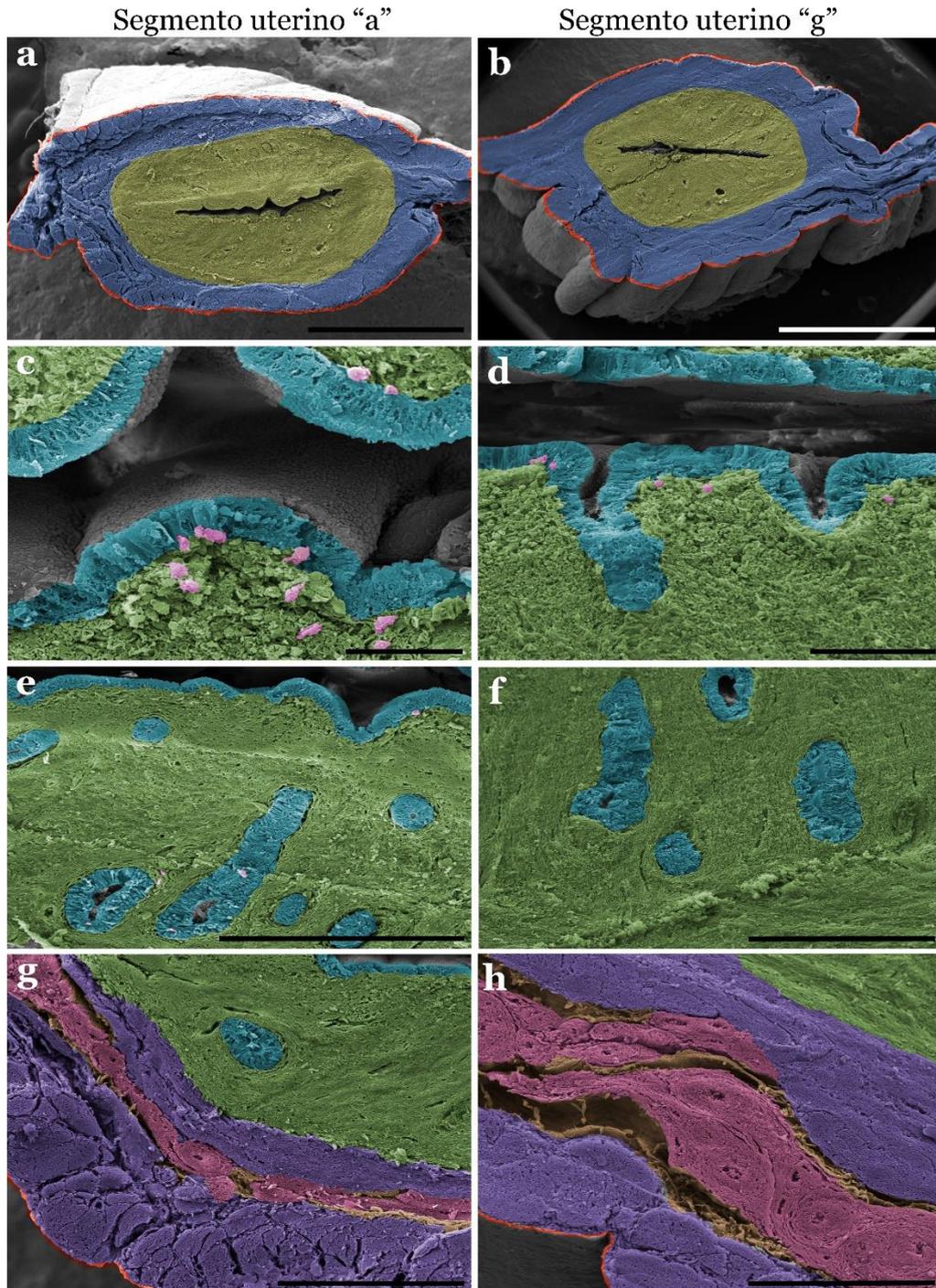


Figura 26. Observación al MEB de los segmentos uterinos “a” (cranial) y “g” (caudal) de *L. maximus* sin preñez. a y b. Secciones trasversales; c y d. Detalle del epitelio luminal y la lámina propia; e y f. Glándulas uterinas; g y h. Detalle de las tunicas musculares y estrato vascular del miometrio. Referencias: Amarillo, endometrio; azul, miometrio; cian, epitelios luminal y glandular; lila, linfocitos; naranja, tejido conectivo; naranja flúor, perimetrio; rosa, estrato vascular verde, lámina propia; violeta, tunicas musculares. Barras de escala: 1 mm (a), 2 mm (b), 50 μ m (c), 100 (d) y 300 μ m (e-h).

- Histoquímica

Los resultados del patrón histoquímico fueron similares entre los siete segmentos uterinos. La técnica histoquímica PAS marcó intensamente a los glicocáliz luminal y glandular, como así también a los gránulos citoplasmáticos localizados en el tercio superior de las células epiteliales (Figura 27 a, b). Esto indica la presencia de GCs neutros. Mediante la técnica de AB, el patrón de glicosilación fue diferente en ambos glicocálices dependiendo del pH utilizado, sin embargo, fue idéntico entre los siete segmentos uterinos. A pH 2,5 la marcación fue moderada (Figura 27 c, d) mientras que a pH 1 y pH 0,5 se observó débil (Figura 27 e, f). Estos resultados indican que ambos glicocálices contienen GCs con grupos carboxílicos y/o con ésteres O-sulfatados y ésteres altamente sulfatados. Las intensidades de marca se reúnen en la tabla 4.

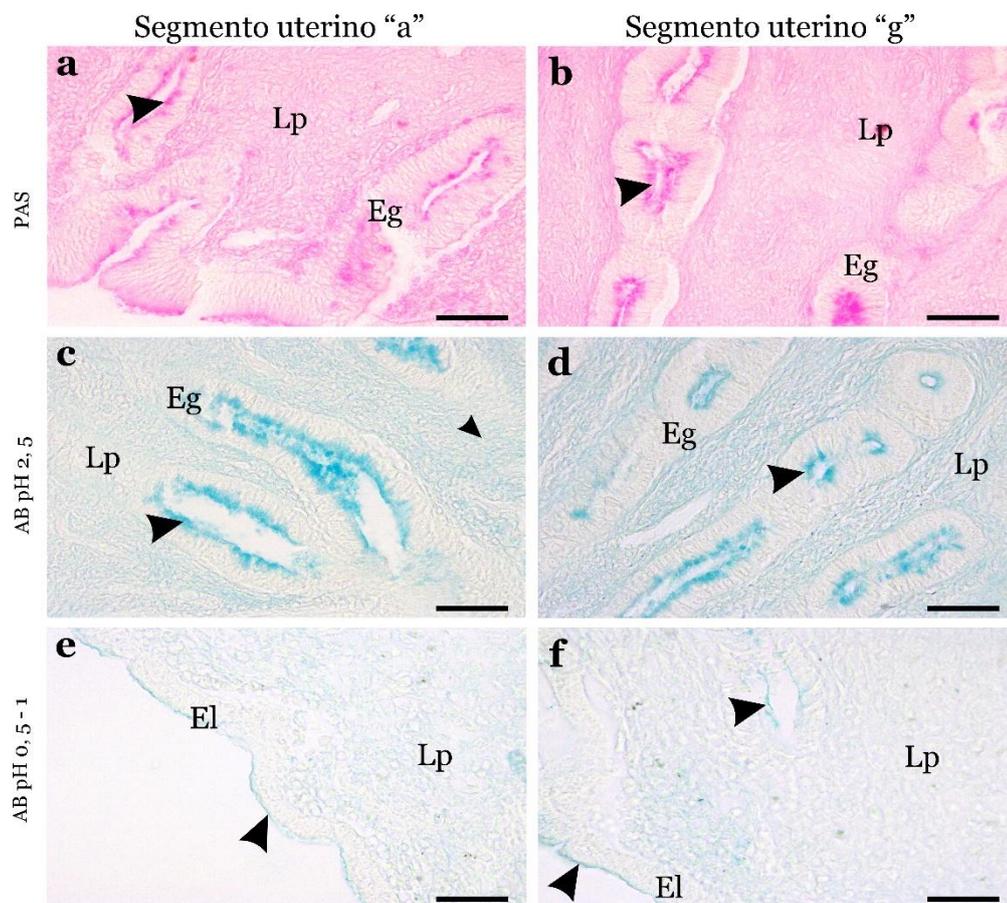


Figura 27. Histoquímica de los glicocáliz luminal y glandular de los segmentos uterinos "a" (cranial) y "g" (caudal) de *L. maximus* sin preñez. a y b. PAS; c y d. AB pH 2,5; e y f. AB pH 0,5–1. Las puntas de flecha en cada imagen indican la marcación positiva para cada técnica. Abreviaturas: Ge, epitelio glandular; Le, epitelio luminal; Lu, lumen; Lp, lámina propia. Barra de escala: 50 μ m.

Tabla 4. Marcación de cada técnica histoquímica en los glicocáliz luminal (Gl) y glandular (Gg) de vizcachas sin preñez.

Técnica Histoquímica	Gl	Gg
PAS	2	2
AB pH 0,5	3	3
AB pH 1	3	3
AB pH 2,5	3	3

- Lectinohistoquímica

La técnica lectinohistoquímica permitió establecer un patrón de residuos de azúcares de los GCs presentes en el glicocáliz luminal y glandular. Si bien estos residuos son de varios tipos, su presencia fue similar entre los siete segmentos uterinos. La marcación para las lectinas PNA y CON-A fue moderada (Figura 28 a, b); sin embargo, para las lectinas WGA, SBA, DBA, UEA-I y RCA-I fue intensa (Figura 28 c, d). Las intensidades de marca se reúnen en la tabla 5.

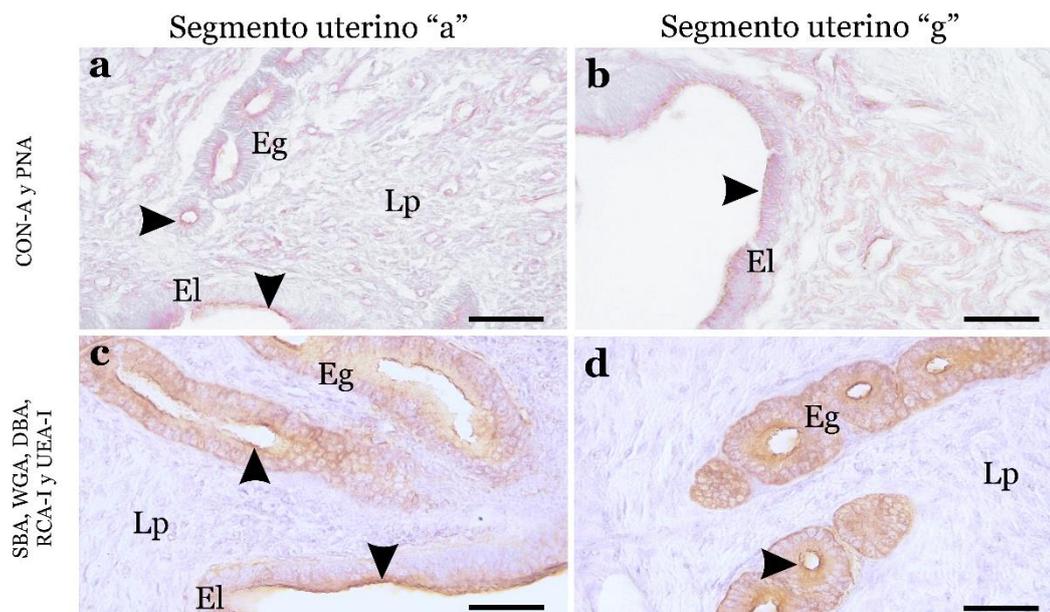


Figura 28. Histoquímica de los glicocáliz luminal y glandular de los segmentos uterinos "a" (craneal) y "g" (caudal) de *L. maximus* sin preñez. a y b. Lectina CON-A representa la marcación moderada para CON-A y PNA; **c y d.** Lectina SBA representa la marcación intensa para SBA, WGA, DBA, RCA-I y UEA-I. Las puntas de flecha en cada imagen indican la marca positiva. Abreviaturas: Ge, glandular epitelio; Le, epitelio luminal; Lu, lumen Lp, lámina propia. Barra de escala: 50 µm.

Tabla 5. Marcación de cada técnica histoquímica en los glicocáliz luminal (Gl) y glandular (Gg) de vizcachas sin preñez.

Lectinas	Gl	Gg
CON-A	2	2
WGA	3	3
DBA	3	3
SBA	3	3
RCA-I	3	3
PNA	2	2
UEA-I	3	3

- Receptores hormonales, y marcadores de proliferación celular y apoptosis

Se observó inmunomarcación similar para cada uno de los anticuerpos utilizados en los siete segmentos uterinos. Sin embargo, el sitio de marcación fue variable.

Cuando se emplearon los anticuerpos anti- receptores de estrógeno (RE- α) y progesterona (PR), y el anticuerpo para proliferación celular (PCNA), se observó que los núcleos tanto del epitelio luminal como glandular expresaron positividad frente a ellos, como así también, fueron positivos los nucleos de los fibroblastos de la lámina propia, de las fibras musculares lisas y del endotelio vascular (Figura 29 a-f). En cambio, cuando se utilizó Cas-3 para evidenciar apoptosis, la inmunomarcación fue citoplasmática en los mismos tipos celulares (Figura 29 g, h).

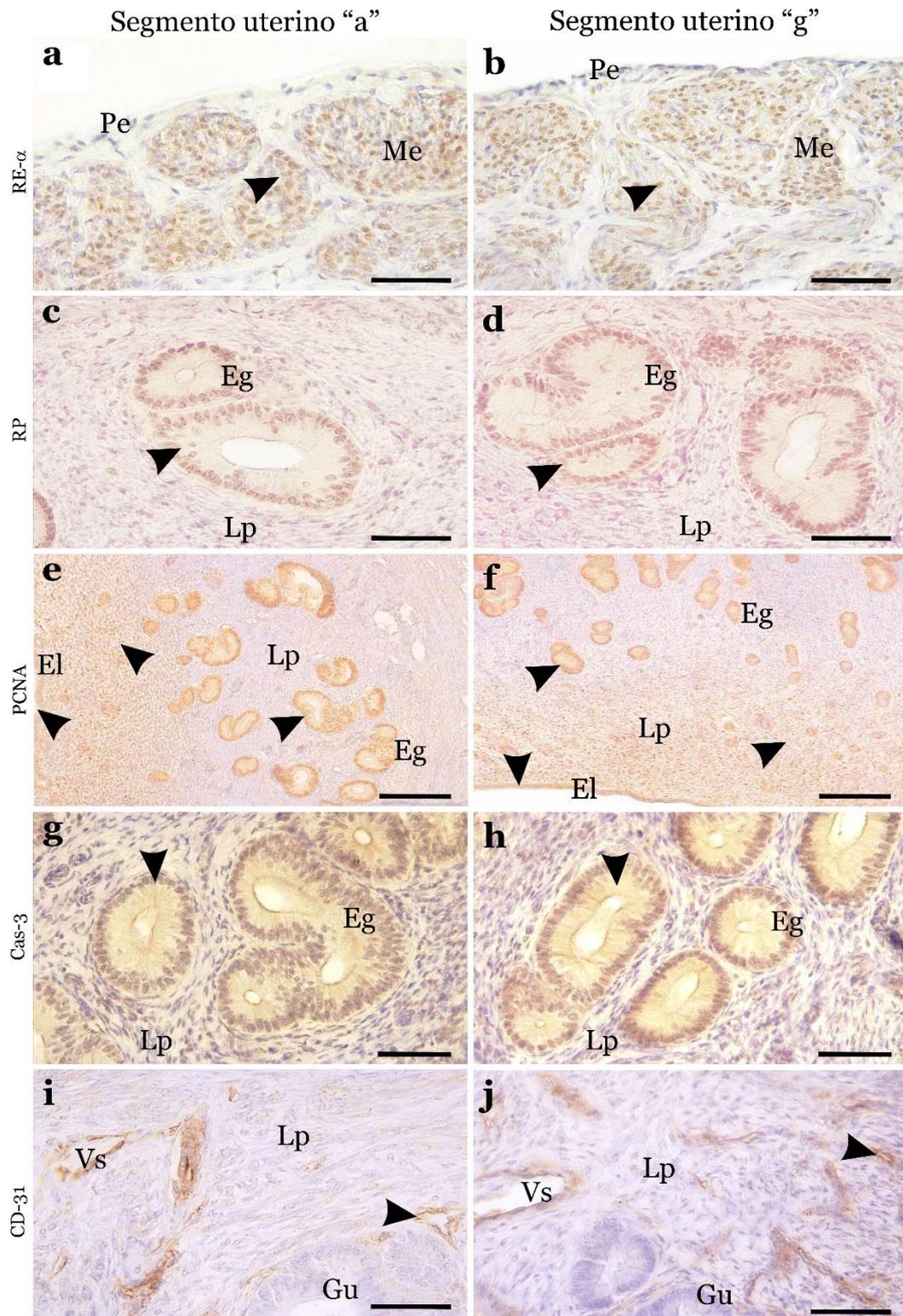


Figura 29. Immunohistoquímica para los receptores hormonales (RE- α y RP) proliferación (PCNA), apoptosis (Cas-3) y células endoteliales (CD-31) para los segmentos uterinos "a" (cranial) y "g" (caudal) de *L. maximus* sin preñez. a y b, c y d. Inmunomarcación nuclear para RE- α y RP en las células de músculo liso y las glándulas uterinas; e y f. Inmunomarcación nuclear positiva para PCNA en los epitelios

luminal y glandular, y la lámina propia; **g y h**. Inmunomarcación citoplasmática positiva para Cas-3 en las glándulas uterinas; **i y j**. Células endoteliales de los vasos sanguíneos endometriales inmunomarcados con CD-31. Las puntas de flechas en cada imagen indican las células positivas para cada anticuerpo primario. Abreviaturas: Eg, epitelio glandular; El, epitelio luminal; Gu, glándulas uterinas; Lp, lámina propia; Lu, lumen; Me, capa muscular externa del miometrio; Pe, perimetrio; Vs, vasos sanguíneos. Barras de escala: 50 μm (a-d; g-j), 200 μm (e y f).

- Morfometria

El estudio morfométrico permitió determinar el aumento significativo del espesor de la pared uterina, el endometrio y el miometrio en sentido craneocaudal; es decir, desde el segmento uterino "a" hasta el "g" (Figura 30 a). En el endometrio, no se hallaron variaciones significativas en la altura de los epitelios luminal y glandular entre los siete segmentos uterinos (Figura 30 b). Sin embargo, el espesor de cada uno de los tres componentes del miometrio, las capas externa e interna y el estrato vascular, aumentó significativamente desde el extremo craneal al caudal (Figura 30 c). Por otro lado, el porcentaje de área ocupado por las glándulas uterinas en el endometrio aumentó significativamente desde el segmento "a" hasta "g" (Figura 30 c).

La inmunomarcación del endotelio vascular con el anticuerpo CD-31 permitió delimitar con mejor precisión a los vasos sanguíneos. En el endometrio y el estrato vascular, el porcentaje de área ocupada por los vasos sanguíneos aumentó significativamente en el mismo sentido que para los otros parámetros mencionados (Figura 30 d).

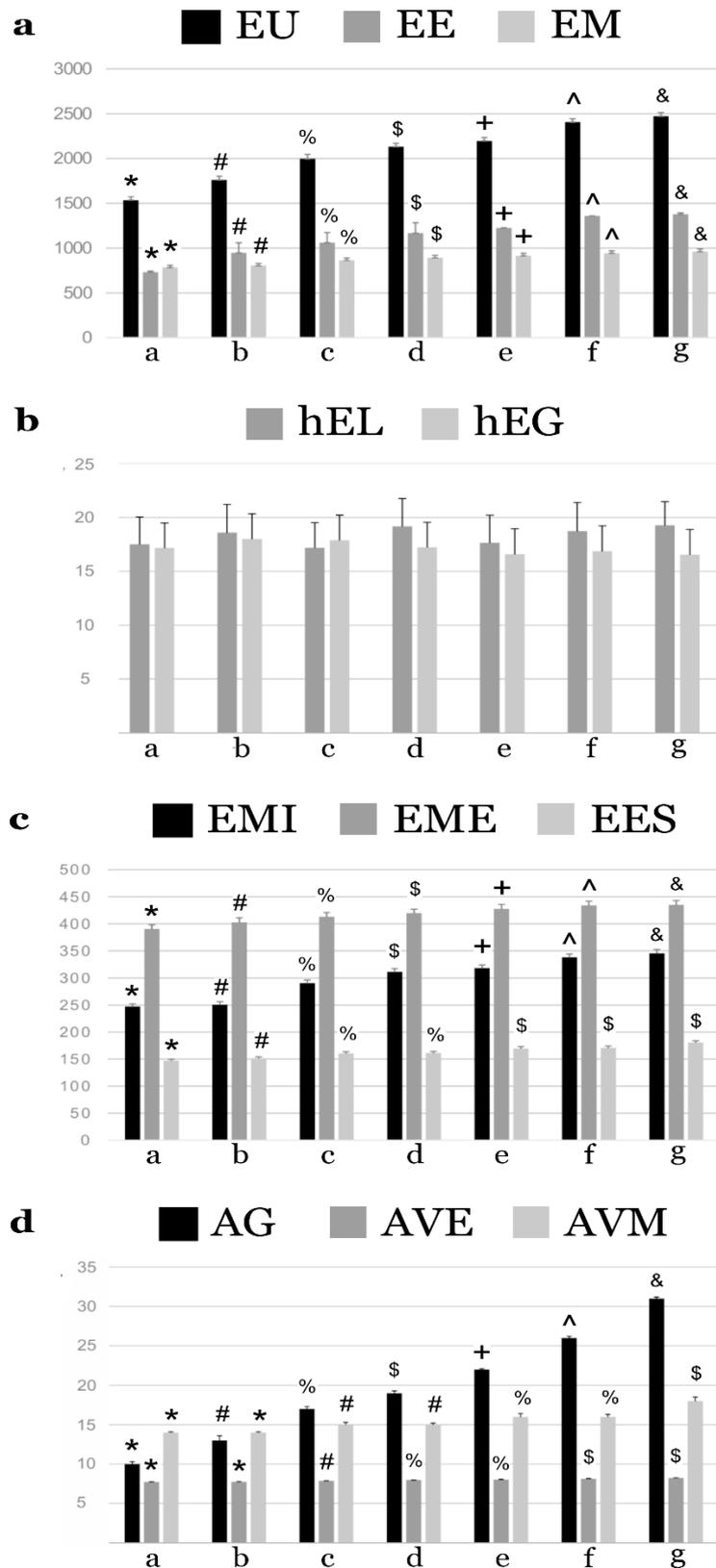


Figura 30. Parámetros morfométricos medidos en los cuernos uterinos de *L. maximus* sin preñez. Todos los valores morfométricos se expresan en μm , excepto para GA, VEA y VMA que se expresan como porcentaje (%). “a-b-c-d-e-f-g” corresponden a los

segmentos uterinos analizados. **a.** Espesor total de la pared uterina (EU), endometrio (EE) y miometrio (EM); **b.** Altura de los epitelios luminal (hEL) y glandular (hEG); **c.** Espesor de la capa muscular interna (EMI), la capa muscular externa (EME) y el estrato vascular (EES); **d.** Áreas glandular (AG), vascular endometrial (AVE) y vascular miometrial (AVM). Diferentes signos indican diferencias significativas para cada parámetro entre los siete segmentos del útero ($p \leq 0,05$).

Discusión

Los histricomorfos, entre ellos, *Hydrochaerus hydrochaeris*, *Octodon degus*, *Agouti paca*, *Cavia porcellus* y *L. maximus*, son modelos animales que pueden resultar útiles para extrapolar estudios sobre la implantación y la placentación, ya que comparten con el humano algunas características, como la implantación intersticial y la placenta de tipo monohemocorial. (Bonatelli y col., 2005; Flamini y col., 2011; Kanashiro y col., 2009; Mess, 2003; Miglino y col., 2002). Dentro de este grupo, *L. maximus* es una especie con características reproductivas poco comunes, incluida la tasa poliovulatoria más alta conocida hasta ahora en los mamíferos, la alta proporción de muerte embrionaria/embrión implantado (5-6 blastocistos resorbidos por cada 6 implantaciones/cuerno uterino) y la persistencia de cuerpos lúteos hasta el final de la preñez (Weir, 1971a, 1971b; Jensen y col., 2008; Flamini y col., 2009; Dorfman y col., 2016; Flamini y col., 2019). Las implantaciones, excepto las localizadas cerca de ambos cérvix uterinos, mueren entre los 26-35 dpc, debido a la reabsorción completa del *conceptus*. En los estudios realizados hace varias décadas no se encontraron diferencias ni en la estructura ni en la vascularización por lo que no consideraron las diferencias regionales en la irrigación y en la morfología uterina entre las causas potenciales de esta muerte (Roberts y Weir, 1973). La muerte embrionaria fisiológica es un proceso que ocurre en algunas especies de mamíferos, como *Elephantulus myurus* (Van der Horst y Gillman, 1941) y dentro de los animales domésticos en la cerda, en la que este proceso se relacionó con la selección de

hembras que ovulan muchos ovocitos para aumentar el número de crías (Stenhouse y col., 2019a, 2019b). Sin embargo, no se informó en otras especies de roedores histricomorfos la poliovulación masiva.

Anatómicamente, la vizcacha tiene un útero doble, conformado por dos cuernos uterinos que se abren en la vagina a través de dos cérvix independientes (Weir, 1971a; Flamini y col., 2012, 2019). Los resultados por ultrasonido mostraron que ambos cuernos uterinos son órganos tubulares que no difieren de los presentes en otros mamíferos euterios filogenéticamente distantes (Davidson y Baker, 2009), aunque varían en el diámetro y espesor de su pared. El mayor diámetro y espesor de la región caudal corresponde al área donde los dos embriones implantados sobrevivientes se desarrollarán, alcanzando el estado precocial al parto (Weir, 1971a; Jackson, 1989; Flamini y col., 2011).

Histológicamente, ambos cuernos uterinos fueron semejantes en cuanto a las características de las tres tunicas típicas del útero: endometrio, miometrio y perimetrio, que coinciden con las descritas en todos los mamíferos euterios (Hayssen y Orr, 2017). Además, las características histológicas de los siete segmentos uterinos no difirieron de las descritas previamente para la región media del útero de *L. maximus* (Flamini y col., 2019). El espesor de la pared uterina aumentó significativamente en el sentido craneocaudal del órgano. En cambio, la altura de los epitelios luminal y glandular del endometrio no varió significativamente entre los siete segmentos. En otras especies, como el cérvido *Aepycerus melampus*, la altura de ambos epitelios es mayor en el cuerno derecho que en el izquierdo; siendo el cuerno derecho el sitio donde ocurre la implantación y posterior placentación (Jones y col., 2019). De manera similar, los segmentos caudales de los cuernos uterinos del insectívoro *Elephantulus* presentan una mayor expansión de las glándulas uterinas; estos segmentos se corresponden con

los únicos sitios de implantación en la especie. En relación a nuestros resultados, hipotetizamos que en los segmentos uterinos de la vizcacha habría una mayor producción de histotrofo, en comparación con los otros segmentos (medios y craneal). El histotrofo es una mezcla de iones y moléculas heterogéneas (incluyendo enzimas, citocinas, factores de crecimiento, hormonas, glucosa, proteínas de transporte) secretada por las glándulas uterinas (Bazer, 1975). Esta secreción resulta de suma importancia para la implantación, la supervivencia y el desarrollo del *conceptus*, la señalización del reconocimiento de la preñez, como así también para el crecimiento fetal y placentario en mamíferos como la oveja (Bazer y col., 1979), la cerda (Simmen y Simmen, 1990), la mujer (Hempstock y col., 2004), los roedores rata y ratón (Kelleher y col., 2018, 2019), la yegua (Bastos y col., 2019), la babuina (Fazleabas y col., 1994), entre otros (Gray y col., 2001; Bazer y col., 2010, 2015; Spencer y col., 2019). En *L. maximus*, la nutrición histotrófica podría tener un rol importante durante la preñez temprana, y la mayor superficie glandular podría relacionarse con que esta nutrición favorezca desde un momento muy temprano la supervivencia de las implantaciones caudales. En especies con placentas invasivas, como la hemocorial del humano, los productos de secreción de las glándulas uterinas llenan el espacio intercelular de la placenta durante el primer trimestre del embarazo. Esto facilitaría la nutrición histotrófica del embrión antes de que se establezca el flujo sanguíneo materno dentro de la placenta (Burton y col., 2020). Estudios recientes en la especie de estudio en esta tesis, demostraron una disminución en el tamaño de las glándulas uterinas durante la preñez intermedia (Flamini y col., 2019). Esto podría reforzar nuestra hipótesis sobre el rol del histotrofo durante la preñez temprana de *L. maximus* y la supervivencia diferencial de las implantaciones a lo largo de los cuernos uterinos. Las glándulas uterinas no solo participarían en la nutrición y supervivencia de los *conceptus*, también permitirían la invasión del trofoblasto, tal como se ha

observado en humanos (Moser y col., 2010, 2011, 2015, 2017; Moser y Huppertz, 2017).

Los resultados de la morfometría en el miometrio demostraron que las capas musculares internas y externas tienen un grosor significativamente mayor en las regiones caudales de ambos cuernos uterinos. En los primeros estudios embriológicos en la vizcacha, se observó que la mayoría de los blastocistos se ubicaron en el extremo craneal de los cuernos, pero que en el momento de la implantación se generaba un espaciado no aleatorio entre los blastocistos a lo largo de los cuernos uterinos. Esto sugeriría que el espaciamiento ocurriría cerca del momento de la implantación (Roberts y Weir, 1973). Originalmente, para explicar el espaciamiento de los blastocistos en mamíferas multíparas se propuso que el primero en ingresar al útero se implantaría cerca del oviducto y produciría un área refractaria. De este modo, la interacción entre el blastocisto y el endometrio influiría estableciendo una zona con determinadas condiciones fisiológicas que se desvanecería hacia otras regiones del útero, favoreciendo, de este modo, la implantación de otros blastocistos (Mossman, 1937). Posteriormente, se demostró que esta teoría no es aplicable en ratones, y que el mecanismo de distribución deriva de la actividad muscular (McLaren y Michie, 1959). Para *L. maximus*, se postuló que este último modelo también es factible. Por tanto, los blastocistos de esta especie podrían distribuirse por la actividad muscular del miometrio (Roberts y Weir, 1973), aunque éste tendría que estar en pausa durante los primeros 15 días de la preñez. En otras especies, como la cerda (Rexroad y Guthrie, 1983), la rata (Kaulenas y col., 1991) y la liebre europea (Drews y col., 2013) se demostró que la actividad del miometrio es responsable de dicha distribución. Teniendo en cuenta nuestros resultados, podríamos asumir que el aumento en el grosor del miometrio desde el extremo craneal hasta el caudal del órgano apoyaría la hipótesis del espaciamiento de blastocisto por actividad del miometrio. Recientemente, Flamini

y col., (2020) postularon que las variaciones en el mecanismo de contracción de la musculatura del miometrio podrían afectar a la vasculatura uterina y, por lo tanto, limitaría el suministro vascular a los embriones.

El éxito de la preñez también requiere varios procesos vasculares. En principio, es necesaria una adecuada vascularización uterina en el momento de la implantación para obtener un óptimo suministro sanguíneo a nivel del endometrio y poco después de la implantación, el desarrollo y la expansión de la vasculatura vellosa placentaria es imprescindible para facilitar el transporte de nutrientes y oxígeno al embrión (Torry y Rongish, 1992; Torry y col., 2007). En el examen macroscópico de vizcachas con 90 días de gestación se observó una vascularización diferencial entre todas las implantaciones de ambos cuernos uterinos, siendo las que se encuentran en las proximidades del cérvix uterino las que recibieron un mayor aporte vascular. Esta diferencia en el flujo vascular ya se había encontrado en fetos femeninos de 50 días (Flamini y col., 2020). A partir de los análisis realizados durante esta tesis, se observó una vascularización diferencial en el sentido craneocaudal del útero sin preñez de la vizcacha debido a un aumento significativo en el área vascular endometrial y miometrial, como del espesor del estrato vascular. Esta observación fue respaldada por los estudios con MOAR y MEB. Estos resultados en úteros de hembras adultas sin preñez y sumados a los encontrados en fetos de hembras de vizcacha (Flamini et al., 2020), permiten postular que estas variaciones vasculares son independientes de los cambios endocrinos que ocurren durante la preñez. Estudios recientes realizados con métodos angiográficos refuerzan nuestra hipótesis de la vascularización diferencial en los cuernos uterinos de vizcachas sin preñez (Giacchino y col., 2020).

Los largos períodos de gestación de los histricomorfos (Pearson, 1949; Burge, 1966; Ehrlich, 1966; Collins y Eisenberg, 1972; Weir, 1971c; Zara, 1973;

Weir, 1974) se relacionan con la tasa de crecimiento extremadamente lenta de los embriones, particularmente en las primeras etapas de la preñez, cuando el desarrollo del *conceptus* está más específicamente relacionado con el establecimiento de la placenta que con la formación del embrión (Roberts y Perry, 1974). Aunque esta vascularización diferencial se observa en un modelo de muerte natural, como el de *L. maximus*, en modelos experimentales de restricción del crecimiento intrauterino realizados en ratas, ratones, ovejas y monos, se demostró que la alteración en el flujo sanguíneo uterino mediante una ligadura bilateral de la arteria uterina causa resorción embrionaria y alteraciones en el desarrollo placentario (Wigglesworth, 1964; Vuguin, 2007; Neitzke y col., 2008; Janot y col., 2014). En los cerdos también se demostró que una mala vascularización puede provocar pérdida embrionaria (Tayade y col., 2006, 2007; Linton y col., 2010; Wright y col., 2016). Sin embargo, en especies que tienen un alto nivel de muerte embrionaria, como los cerdos, no existen diferencias entre la ubicación de la implantación en el útero y las posibilidades de supervivencia fetal (Bidarimath y Tayade, 2017; Stenhouse y col., 2018, 2019a, 2019b). En *L. maximus*, los resultados obtenidos mediante los estudios macroscópicos, microscópicos y morfométricos indican que los cuernos uterinos varían en su sentido craneocaudal y, por tanto, esa heterogeneidad influiría en el éxito del desarrollo de embriones implantados.

En los mamíferos, es conocido el rol de los residuos de azúcares del glicocáliz del epitelio uterino durante la adhesión de los blastocistos (De Paz y col., 1994; Niklaus y col., 1999; Bai y col., 2000; Fouladi-Nashta y col., 2005; Khoza y Hosie, 2008). El patrón de azúcares hallados en el glicocáliz luminal y glandular de vizcachas sin preñez es similar al detectado en células endometriales durante la pre-implantación e implantación de otras especies. En todos los casos, se concluyó que estos estarían participando del proceso de adhesión de los blastocistos (Jones

y col., 2001; Guo y col., 2013; Jones y col., 2014; Clark, 2015; Aliabadi, y col., 2017). Por lo tanto, es factible especular que los residuos de azúcares expresados a lo largo de los cuernos uterinos de vizcachas sin preñez también podrían participar durante la adhesión de los múltiples blastocistos. Por otro lado, resulta importante remarcar que al ser homogénea la expresión de estos azúcares, la interacción endometrio-trofoblasto sería también similar entre las distintas implantaciones y, de este modo, la muerte embrionaria de la especie no se desencadenaría por fallas durante la implantación.

Cuando se estudio la proliferación celular y la apoptosis utilizando los anticuerpos primarios PCNA y Cas-3, respectivamente, se observó un patrón constante a lo largo de los cuernos uterinos de las vizcachas. Durante la preñez temprana de algunos roedores, por ejemplo, rata, ratón y hámster, se observaron variaciones en la expresión de estos marcadores en diferentes componentes del útero conforme avanzaba el tiempo gestacional (Sandow y col., 1979; Sato y col., 1997; Lai y col., 2000; Dharma y col., 2001; Öner y col., 2010; Annie y col., 2019). La ausencia de variación en la proliferación celular y apoptosis entre los siete segmentos uterinos de vizcachas sin preñez indicaría que ambos procesos ocurren de manera homogénea a lo largo de todo el órgano. Por esta razón, la poli-implantación no se vería afectada. Para confirmar esta hipótesis se requieren estudios más profundos durante la implantación de esta especie.

Durante el ciclo reproductivo y la preñez, el sistema reproductor de la hembra cambia debido a las inducciones que generan las hormonas esteroideas estrógeno y progesterona (Słomczyńska y Woźniak, 2000; Saunders, 2005; Brodowska y col., 2007; Knapczyk y col., 2008; Knapczyk y col., 2011). Esta comunicación intercelular uterina no solo requiere la integración de las señales hormonales del ovario y el feto, sino también de la expresión específica de los

receptores de esteroides en los tejidos (Bartol y col., 1999). Las inducciones generadas por los estrógenos están mediadas por los receptores de estrógenos alfa (RE- α) y beta (RE- β), siendo RE- α el predominante en el útero maduro (Sukjumlong y col., 2004). La inmunomarcación de RE- α y RP en diferentes componentes del útero de vizcacha sin preñez resultó ser homogénea entre los siete segmentos analizados; por lo tanto, la sensibilidad del órgano al estrógeno y la progesterona sería similar a lo largo de su extensión. Como consecuencia de estos resultados, se postula que las hormonas esteroideas no estarían involucradas en el origen de la supervivencia diferencial de los embriones.

CAPÍTULO IV

Estudios en úteros de hembras con preñez temprana

Introducción

La muerte embrionaria seguida de resorción es un proceso conservado entre los mamíferos (Drews y col., 2020). Entre las especies poliovulares, este proceso se observó en *Lasirius cinereus* (Bouchard y col., 2001), *Canis familiaris* (Ortega-Pacheco y col., 2007), *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Capra aegagrus* (Bolet, 1986), *Lepus europaeus* (Schröder y col., 2013), *Mus musculus* (Flores y col., 2014) y *Rattus norvegicus* (Fonseca y col., 2014). En cada una de estas especies, la muerte ocurre de manera independiente de la localización del embrión y en un porcentaje mucho menor de lo que ocurre en el roedor histricomorfo *L. maximus*. Regularmente, en esta especie, 8-10 implantaciones de un total de 10-12 (5-6 por cuerno uterino) son resorbidos entre los 26 y 70 dpc de una gestación de $154 \pm 0,4$ días (Weir, 1971a, 1971b; Roberts y Weir, 1973). Solo las dos implantaciones ubicadas en los segmentos caudales de ambos cuernos uterinos sobrevivirán (Flamini y col., 2019). De este modo, *L. maximus* constituye un modelo mamaliano no convencional y fisiológico para el estudio de la muerte embrionaria temprana.

Los primeros estudios realizados en esta especie no encontraron relación entre la muerte embrionaria y la existencia de variaciones morfológicas sectoriales, detectable tanto macro como microscópicamente en los cuernos uterinos (Weir, 1971b); ni con enfermedades específicas o el evento de superfecundación (Roberts y Perry, 1974). Sin embargo, recientemente, estudios morfológicos más exhaustivos, informaron que existe una mayor vascularización en la zona caudal del órgano. Estos cambios en la vasculatura se establecen en la vida prenatal y se corresponden a los sitios donde durante la preñez se ubican los *conceptus* que continuarán con

su desarrollo (Flamini y col., 2020). Estudios angiográficos apoyan nuestra hipótesis de una circulación uterina ascendente desde el cuello uterino hasta el ovario. Además, un mayor calibre en las ramas de las arterias que irrigan a los embriones caudales, con respecto a los cercanos al ovario (Giacchino y col., 2020).

El éxito reproductivo de los mamíferos depende de las inversiones energéticas en las hembras antes y después del parto (Curley y col., 2005). En este sentido, la inversión energética en *L. maximus* está relacionada con la poliovulación de 200-800 ovocitos por estro, la poliimplantación y la gestación (Weir, 1971a, 1971b). La gestación larga de los histricomorfos está relacionada con la lenta tasa de crecimiento de los embriones, particularmente en la gestación temprana, donde el desarrollo de los *conceptus* se centra más en el establecimiento de la placenta que sobre la formación del embrión (Roberts y Perry, 1974). Por otro lado, esta especie pare crías precociales al igual que otras especies de histricomorfos (El Bizri y col., 2017), por lo cual la inversión energética podría resultar mayor en comparación con la de roedores que paren crías altriciales.

Las implantaciones embrionarias (en resorción y viables) correspondientes a una gestación intermedia (50-90 días) se describieron anatómica e histológicamente (Flamini y col., 2020). Sin embargo, se desconocen muchos aspectos de las características de la implantación durante la gestación temprana, período en el que comienza la muerte embrionaria (Roberts y Weir, 1973). La muerte embrionaria durante la gestación temprana de *L. maximus* fue recientemente estudiada, aunque no se explicita el momento gestacional (Giacchino y col., 2020). En consecuencia, resulta difícil establecer una correspondencia entre las características observadas y el tiempo gestacional de las resorciones embrionarias.

Materiales y métodos

Esta sección se encuentra detallada en el CAPÍTULO II

Resultados

- Descripción macroscópica y morfometría

El periodo de gestación de las hembras analizadas fue de 26 a 32 dfp. Esto se estimó a partir de los datos morfométricos obtenidos de embriones y fetos a lo largo de la gestación de la especie (Leopardo y Vitullo, 2017). Se contaron cinco sitios de implantación por cada cuerno uterino en todas las hembras. Estos se denominaron SI-1, SI-2, SI-3, SI-4 e SI-5, siguiendo el eje craneocaudal del órgano. Todos mostraron un color blanco homogéneo. Además, se observó hiperemia en las arterias uterinas izquierda y derecha y sus ramificaciones en el mesometrio (Figura 31).

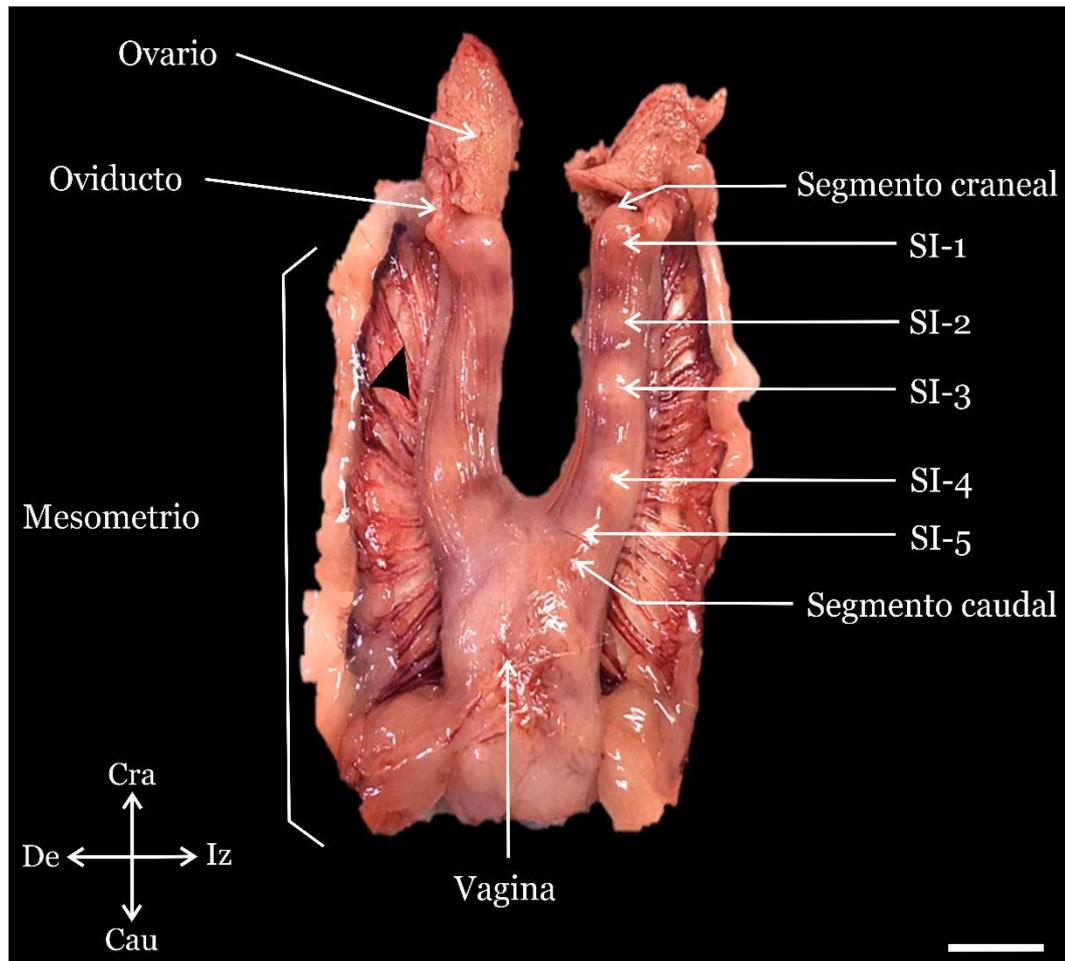


Figura 31. Observación macroscópica del sistema reproductor durante la gestación temprana de *L. maximus*. Se observan los cinco sitios de implantación (SI-1, SI-2, SI-3, SI-4 y SI-5) comprendidos entre los segmentos uterinos craneal y caudal. Las puntas de flecha indican los vasos sanguíneos mesometriales. Abreviaturas: Cau, caudal; Cra, Craneal; De, derecha; Iz, izquierda. Barra de escala: 1 cm.

La longitud y el ancho de los sitios de implantación aumentaron significativamente siguiendo el eje craneocaudal del órgano. Estos parámetros morfométricos difieren significativamente entre el segmento uterino craneal y caudal, lo que resulta en una mayor este último (Figura 32).

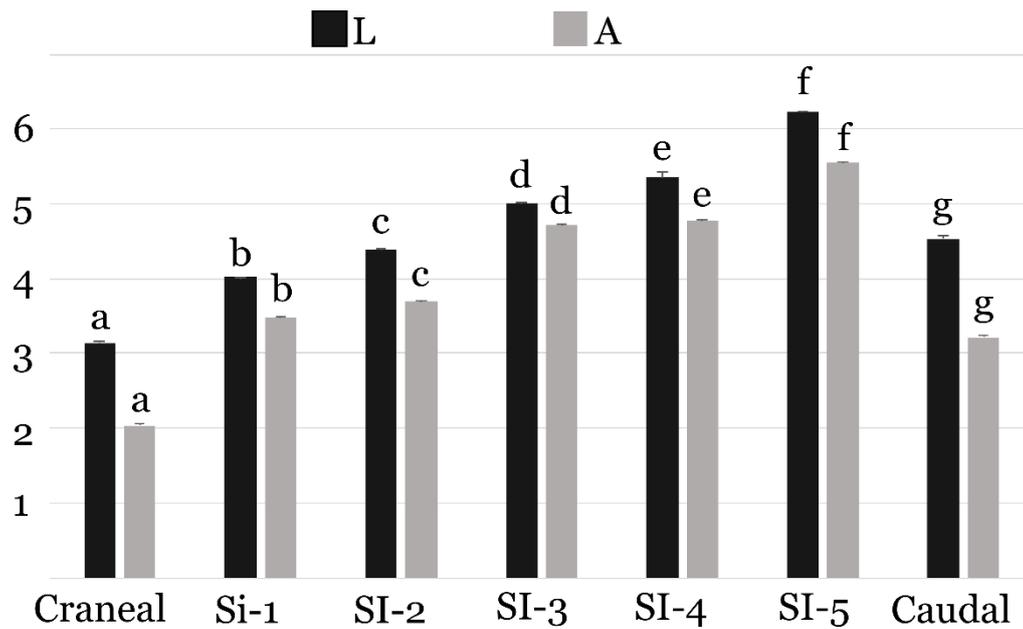


Figura 32. Largo y ancho (mm) de los cinco sitios de implantación y los dos segmentos uterinos durante la gestación temprana de *L. maximus*. Abreviaturas: A, ancho; L, largo. Para cada parámetro morfológico las letras diferentes indican diferencias significativas entre los segmentos uterinos (craneal y caudal) y los SI ($p \leq 0,05$).

- Tasa de reabsorción embrionaria

Los sitios de implantación en resorción se correspondieron con los ubicados en las regiones craneales y medias de los cuernos uterinos. En este estudio, hubo 8 SI (4 SI / cuerno uterino) en comparación con un total de 10 SI (5 SI / cuerno uterino). Por lo tanto, la TR fue del 80%.

- Descripción microscópica e inmunohistoquímica de los segmentos uterinos craneal y caudal

En estos segmentos, la organización típica del útero fue en tres tunicas, endometrio, miometrio y perimetrio (Figura 33 a, b). El endometrio del segmento uterino caudal mostró una mayor cantidad de adenómeros correspondientes a las glándulas uterinas en comparación con el segmento uterino craneal. También se observaron diferencias entre ambos sectores en el miometrio, debido a la gran

cantidad de vasos sanguíneos de diferentes calibres rodeados por tejido conectivo laxo, formando el estrato vascular. Estas variaciones entre ambos segmentos fueron corroboradas por las diferencias significativas en los valores medios de las áreas glandular y vascular. Además, en ambos segmentos, se observó inmunomarcación nuclear para los anticuerpos primarios anti-PCNA y PR en la mayoría de las células del epitelio luminal y glandular, fibroblastos de la lámina propia, células endoteliales de los vasos sanguíneos del endometrio y miometrio, y fibras musculares lisas del miometrio (Figura 33 c-f). Por otro lado, las células de ambos epitelios, luminal y glandular, también fueron positivas para la inmunomarcación con los anticuerpos primarios anti-pancitoqueratina y anti-Cas-3 (Figura 33 g, h).

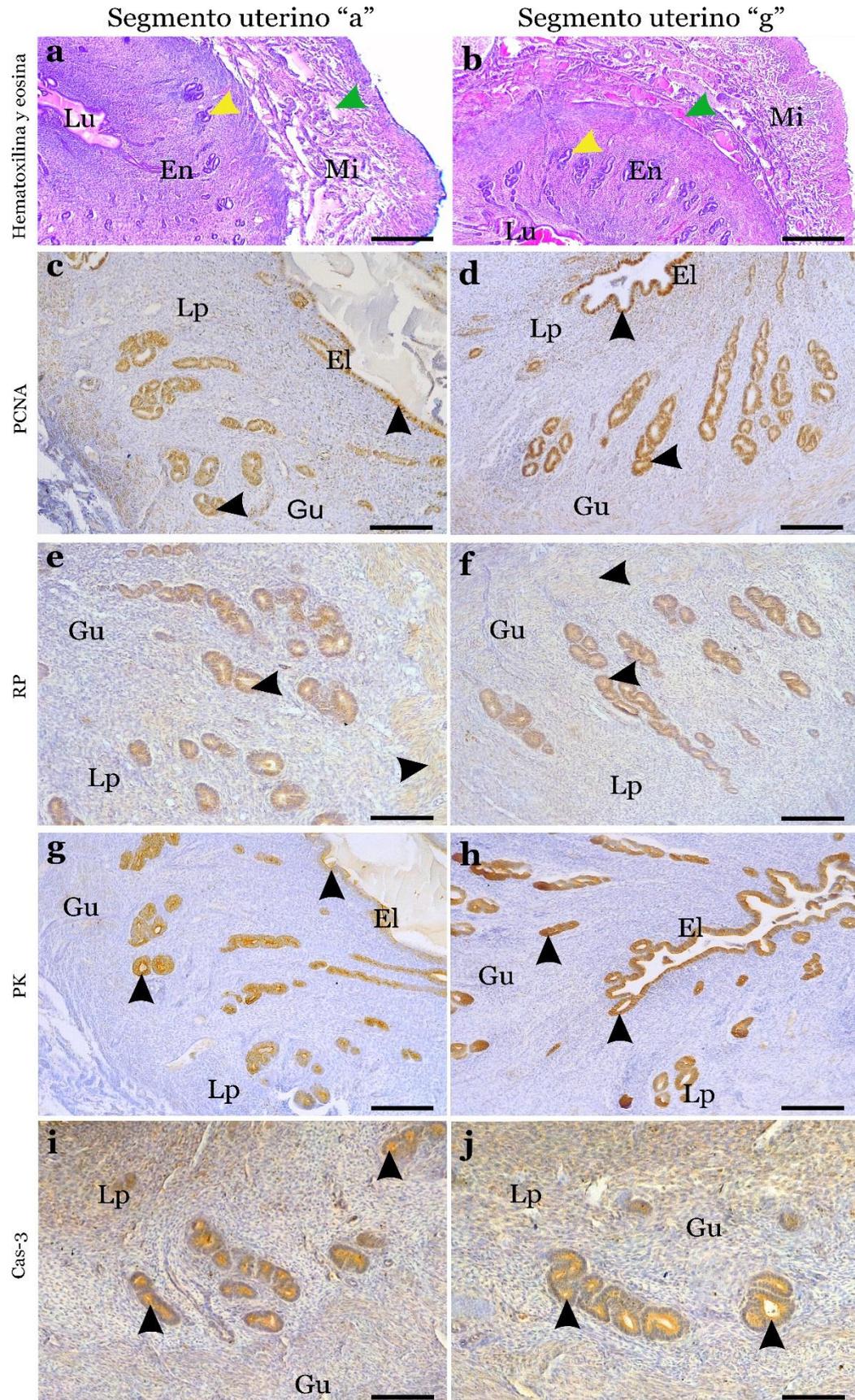


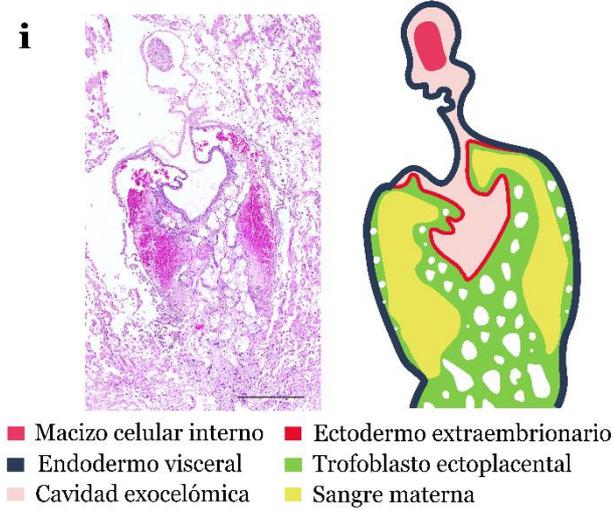
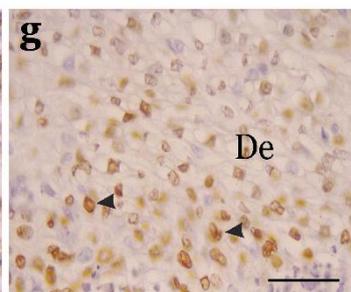
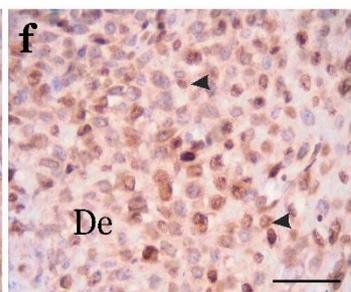
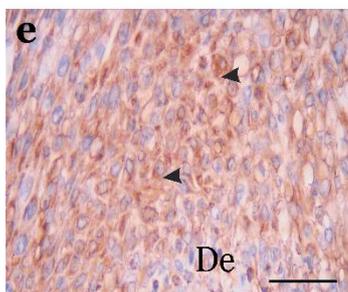
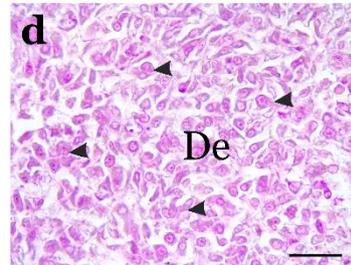
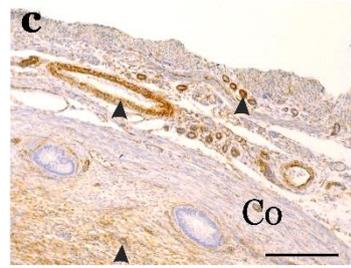
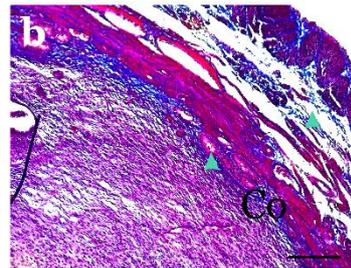
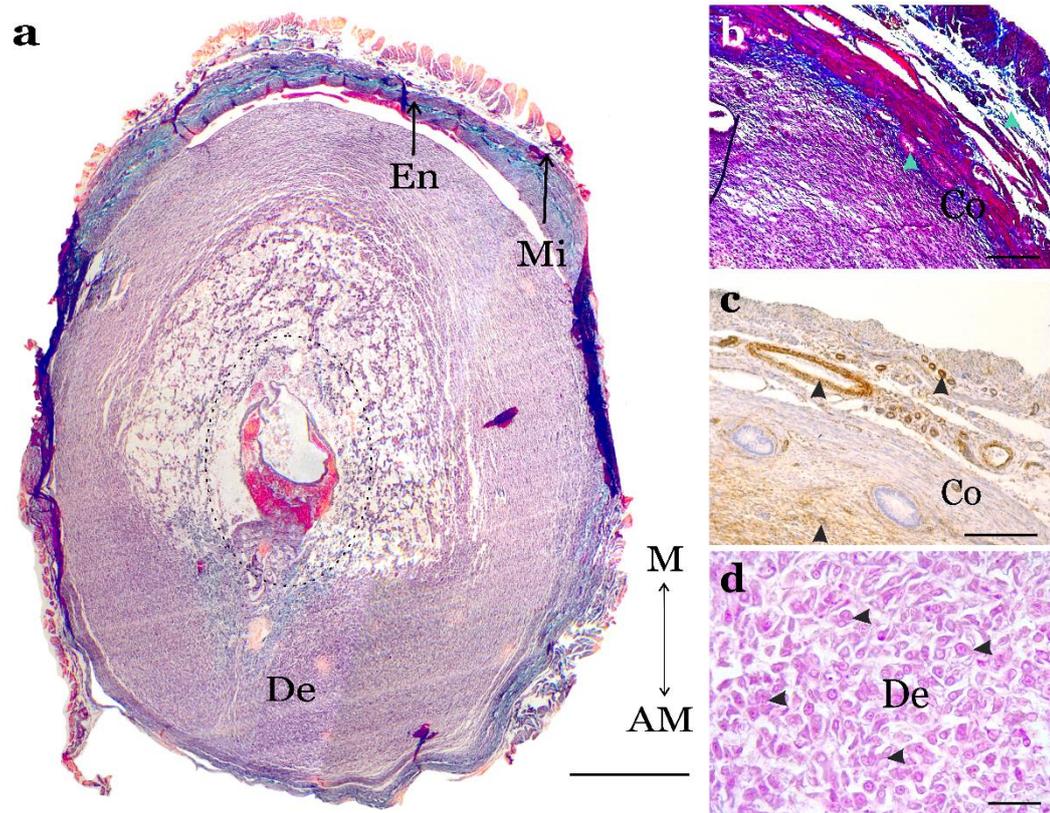
Figura 33. Descripción histológica e inmunohistoquímica de los segmentos uterinos durante la gestación temprana de *L. maximus* a. Organización histológica; b-j. Las cabezas de flecha indican la inmunomarcación para PCNA, RP, PK, y Cas-3, respectivamente. Abreviaturas: En, endometrio; El, epitelio luminal; Lp, lámina propia; Lu, lumen Mi: miometrio; Gu, glándulas uterinas. Las puntas de flecha amarillas y verdes marcan a las glándulas uterinas y los vasos sanguíneos, respectivamente. Barra de escala: 200 μ m.

- Sitios de implantación

Todas las implantaciones observadas en los sitios de implantación fueron de tipo intersticial y con localización antimesometrial. Su forma fue esférica y la luz uterina estuvo restringida a una media luna revestida por un epitelio columnar simple. Se reconocieron restos celulares y fibrina en la luz del órgano (Figura 34 a). El polo mesometrial poseía un epitelio de revestimiento y una lámina propia de tejido conectivo laxo, con glándulas uterinas localizadas en las proximidades del miometrio (Figura 34 b). Entre las capas de músculo liso del miometrio se observó un estrato vascular formado por vasos sanguíneos congestivos de diferente calibre (Figura 34 c). En todos los SI se observó un estroma decidualizado con células deciduales poligonales y grandes, y con núcleo central; la mayoría de las células fueron positivas para VIM y PAS (Figura 34 d y e). Estas células estaban localizadas en las regiones basal y lateral de cada SI, formando la *decidua basalis y parietalis*. Al igual que el epitelio glandular, la mayoría de las células de la decidua fueron positivas para PCNA y PR (Figura 34 f y g). En cuanto a Cas-3, se localizó en la decidua, los vasos sanguíneos y el epitelio glandular.

En el centro de cada sitio de implantación, se observó un blastocisto alargado hacia el polo mesometrial (“embrión cilíndrico”) (Figura 34 k y l). En el que se reconocieron el macizo celular interno (MCI) y los tejidos extraembrionarios (TEx): endodermo visceral (EnVi), trofoblasto ectoplacentario (TrEc) y células gigantes ectoplacentarias (CGEP). El EnVi delimitó la cavidad exocelómica en la

que se encontró el MCI, mientras que el TrEc delimitó a una cavidad ectoplacentaria que contenía sangre materna extravasada y células trofoblásticas extraplacentarias. En el polo mesometrial, se observaron extensiones tubulares del trofoblasto hacia la decidua. Tanto el MCI como los TEx fueron positivos a PCNA, PK y RP (Figura 34 h-j). También se identificaron células *uNK* a partir de la marcación positiva de sus gránulos con la técnica histoquímica PAS y la lectinohistoquímica con la lectina DBA (Figura 34 m y n). En los SI-1, SI-2, SI-3 y SI-4 se observaron algunas zonas necróticas e infiltración de leucocitos con predominio de linfocitos (Figura 34 o), como así también fibroblastos y fibrina entre las células trofoblásticas y deciduales (Figura 34 p).



■ Macizo celular interno ■ Ectodermo extraembrionario
■ Endodermo visceral ■ Trofoblasto ectoplacental
■ Cavidad exocelomica ■ Sangre materna

Figura 34. Descripción histológica e inmunohistoquímica de los sitios de implantación durante la gestación temprana de *L. maximus*. **a.** Reconstrucción de SI-1 como modelo para todos los sitios de implantación. En el centro se observa una implantación intersticial y antimesometrial, con un blastocisto alargado (línea discontinua ovalada). Tricrómico de Masson; **b y c.** Detalle de las glándulas uterinas (puntas de flecha verdes; tricrómico de Masson) y vasos sanguíneos (puntas de flecha negras; identificación con CD-31) en SI-2, respectivamente; **d-g.** Decidua, identificada con PAS e inmunomarcación positiva para VIM, PCNA y RP en SI -3, respectivamente; **h-j.** Inmunomarcación positiva del MCI y los tejidos extraembrionarios con PCNA, PK y RP en SI -4, respectivamente. Barra de escala: 500 μ m (a, h-j), 200 μ m (b y c) y 50 μ m (d-g).

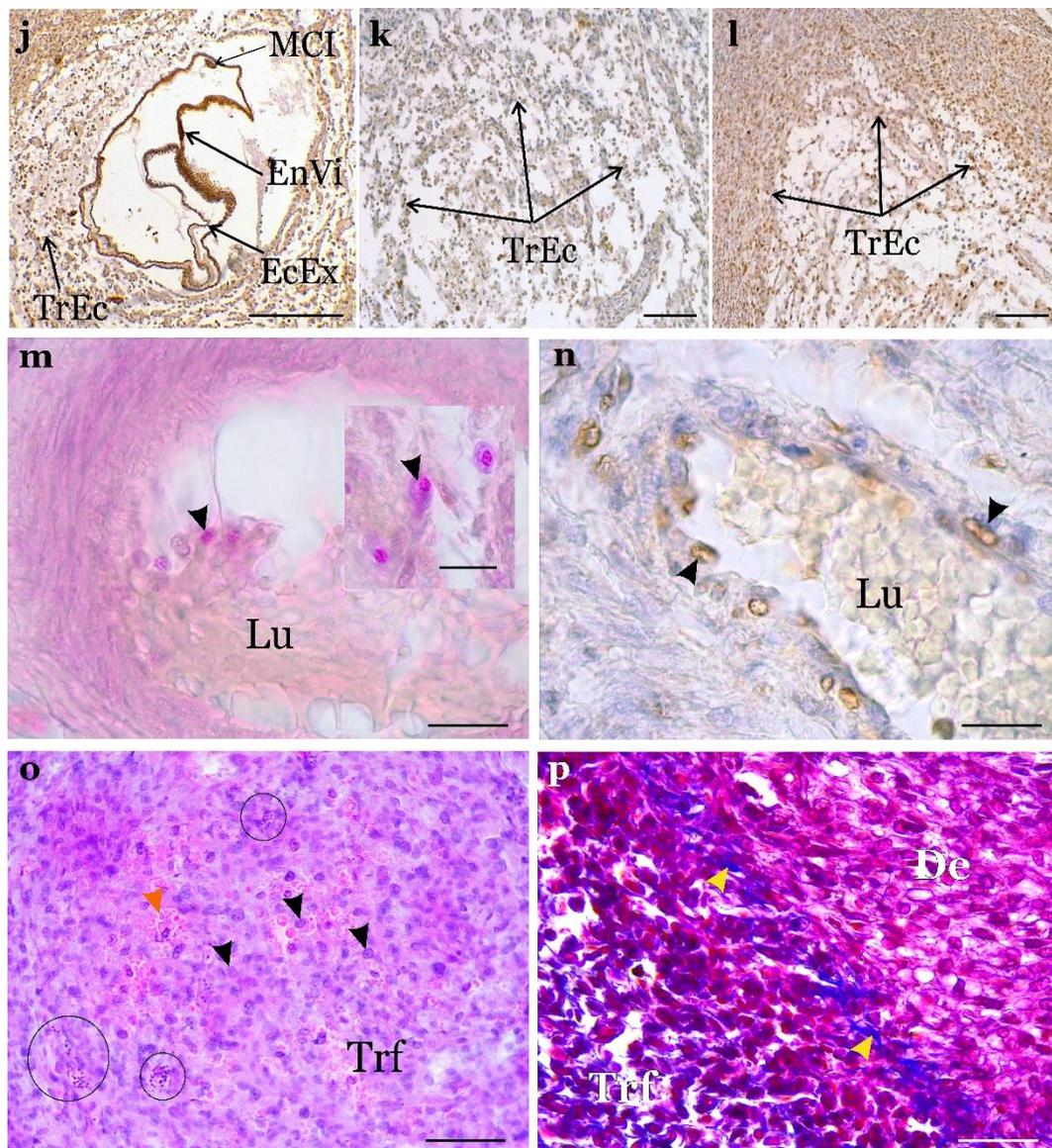


Figura 34-continuación. k. Reconstrucción de la implantación caudal (SI-5). **l.** Detalle del blastocisto alargado del SI-5 y representación esquemática de sus tejidos embrionarios y extraembrionarios; **m.** Identificación de las *uNK* (puntas de flecha) en la luz de un vaso

sanguíneo. El inserto muestra el contenido granular de estas células (técnica de PAS). Barra de escala: 20 μm ; **n**. Identificación lectinhistoquímica con DBA de las *uNK* en la pared de un vaso sanguíneo (puntas de flecha); **o**. Células con signos de necrosis (cabezas de flecha negro), hemorragia (cabezas de flecha naranja) e infiltración de leucocitos (círculos) en SI -1. Hematoxilina y eosina; **p**. Fibrina (puntas de flecha) entre el trofoblasto y la decidua de SI -3. Tricrómico de Masson. Abreviaturas: A, antimesometrial; An, antimesometrial; Co, *conceptus*; De, decidua; EcEx, ectodermo extraembrionario; En, endometrio; Lu, lumen; MCI, macizo celular interno; Mi, miometrio; Trf, trofoblasto; TrEc, trofoblasto ectoplacentario; EnVi, endodermo visceral. Barras de escala: 500 μm (k, l), 50 μm (m, o), 20 μm (n, p).

- Microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

A partir de los cortes para MOAR de los sitios de implantación craneal (SI-1), medio (SI-3) y caudal (SI-5) se observaron células trofoblásticas con un tamaño mayor a otros tipos celulares presentes. Además, en el SI-1 se identificaron (Figura 35).

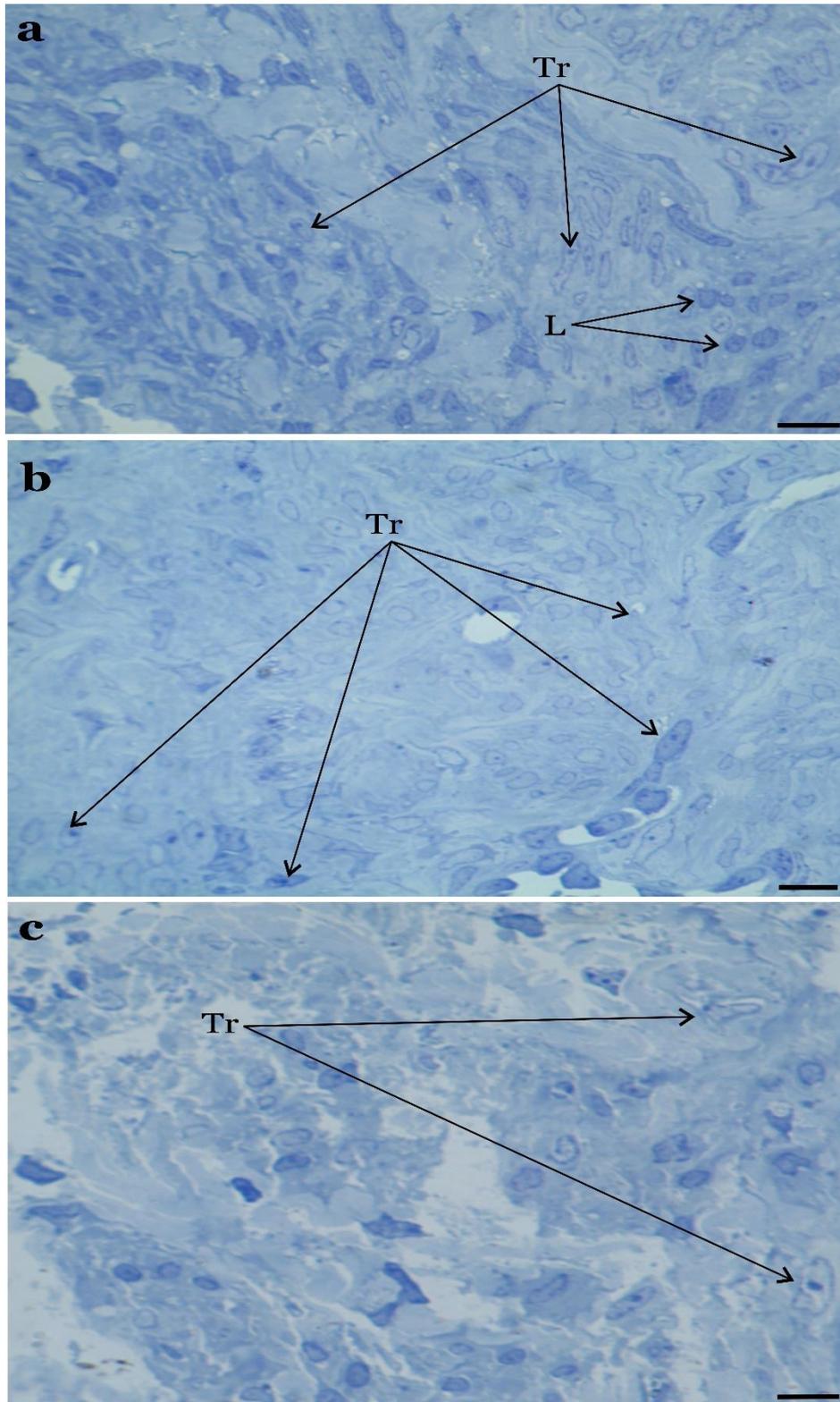


Figura 35. Microscopía óptica de alta resolución en los sitios de implantación durante la gestación temprana de *L. maximus*. a. Craneal (SI-1); **b.** medio (SI-3); **c.** caudal (SI-5) Abreviaturas: L, linfocitos; Tr, células trofoblásticas. Barras de escala: 100 μm .

- Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La observación de los sitios de implantación craneal (SI-1), medio (SI-3) y caudal (SI-5) al MEB demostró la presencia de vasos sanguíneos que carecían de endotelio (Figura 36 a-c). Con magnificaciones mayores, tanto el SI-1 como el SI-3 tenían zonas oscuras, a diferencia del SI-5 que careció de las mismas y, por lo tanto, las células trofoblásticas se observaron individualmente (Figura 36 d-f). Además, las células trofoblásticas en el SI-5 se encontraron en íntimo contacto con las glándulas uterinas (Figura 36 g-i).

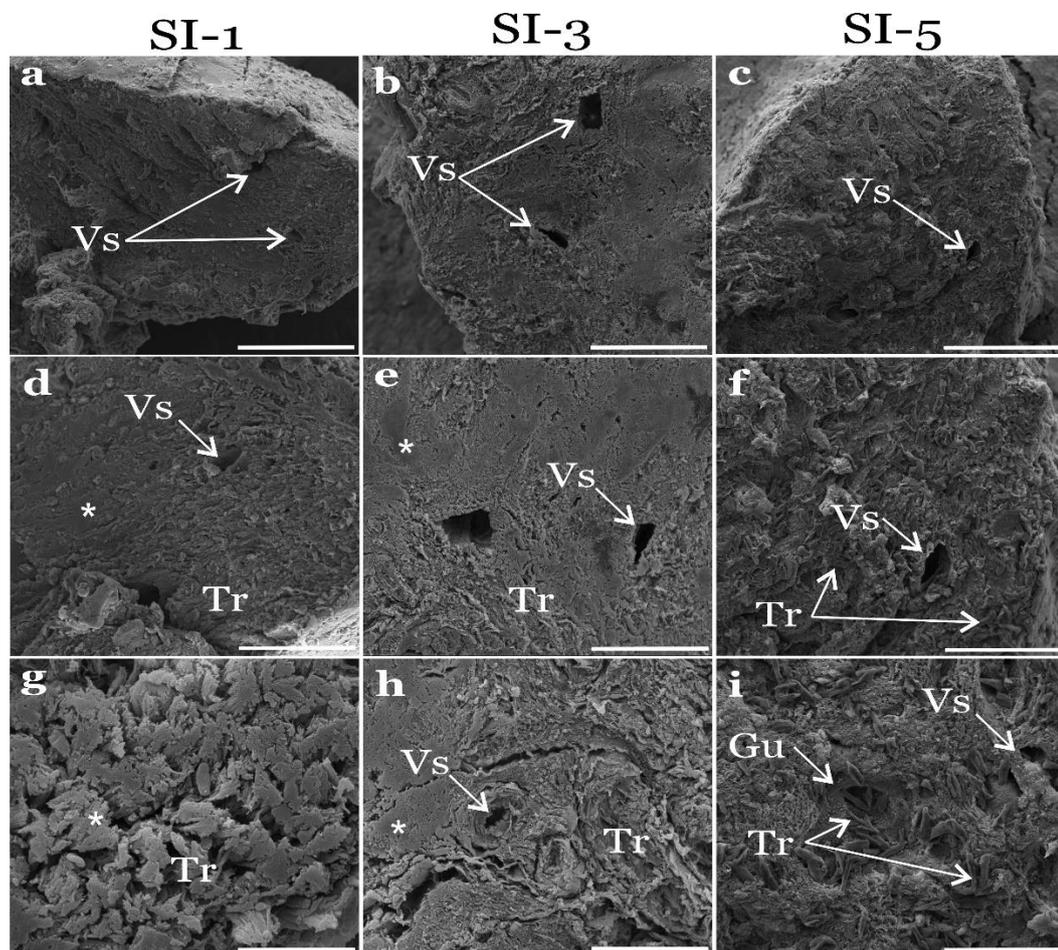


Figura 36. Microscopía electrónica de barrido de los sitios de implantación craneal (SI-1), medio (SI-3) y caudal (SI-5) durante la gestación temprana de *L. maximus*. Abreviaturas: Gu, glándulas uterinas; Tr, células trofoblásticas; Vs, vasos sanguíneos; *, compactación. Barra de escala: 500 μm (a y g), 400 μm (d), 300 μm (b, e y h), 100 μm (i) y 50 μm (c y f).

- Expresión de glucoconjugados

La identificación de GCs en los glicocálices de los epitelios luminal y glandular mediante las técnicas histoquímica y lectinhistoquímicas fue similar entre los segmentos uterinos craneal y caudal, y los sitios de implantación. Utilizando PAS y AB a tres pH diferentes se demostró que el glicocáliz de ambos epitelios presenta glucoconjugados neutros, altamente sulfatados, con ésteres O-sulfatados, y con grupos carboxílicos y/o con ésteres O-sulfatados (Figura 37 a-c). Mediante la técnica lectinhistoquímica, las lectinas biotiniladas identificaron varios residuos glicosídicos, tales como, β -DMan, α -D-Glc, β -D-GlcNAc, NeuNAc, α -D-GalNAc, β -D-GalNAc, β -Gal, β -D-Gal (β 1-3) > D-GalNAc y L-Fuc, en ambos glicocálices (Figura 37 d, e). Las intensidades de marca se reúnen en las tablas 6 y 7.

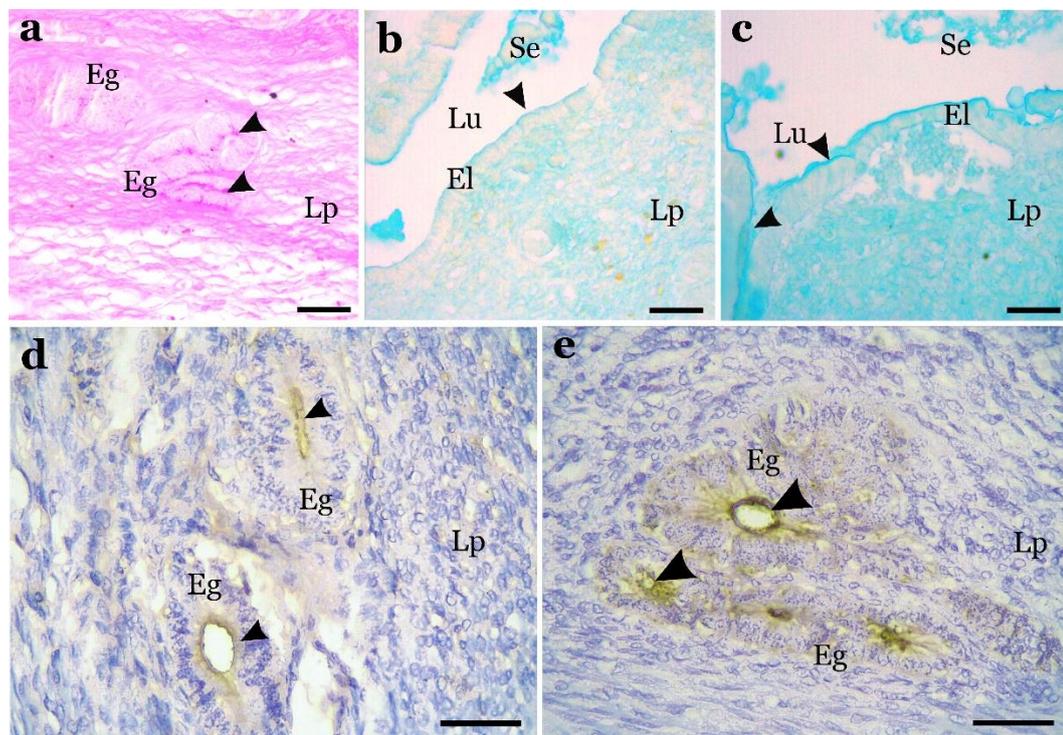


Figura 37. Histoquímica y lectinhistoquímica de los glicocáliz luminal y glandular para los segmentos uterinos y sitios de implantación durante la gestación temprana de *L. maximus*. Las puntas de flecha indican la localización de la marca positiva para cada técnica. **a.** PAS en el SI-1; **b.** AB pH 0,5-1 en el SI-2; **c.** AB pH 2,5

en el SI-3; **d.** Lectinohistoquímica con CON-A en el SI-4; **e.** Lectinohistoquímica con WGA en el SI-5. Abreviaturas: Eg, epitelio glandular; El, epitelio luminal; Lp, lámina propia; Lu, lumen; Se, secreción. Barra de escala: 50 μm .

Tabla 6. Marcación de cada técnica histoquímica en los glicocáliz luminal (Gl) y glandular (Gg) de vizcachas con preñez temprana.

Técnica Histoquímica	Gl	Gg
PAS	3	3
AB pH 0,5	1	1
AB pH 1	1	1
AB pH 2,5	2	2

Tabla 7. Marcación de cada técnica histoquímica en los glicocáliz luminal (Gl) y glandular (Gg) de vizcachas con preñez temprana.

Lectinas	Gl	Gg
CON-A	1	1
WGA	3	3
DBA	3	3
SBA	3	3
RCA-I	2	2
PNA	2	2
UEA-I	3	3

- Áreas glandulares y vasculares

Los valores medios de las AG y AV entre los segmentos uterinos craneal y caudal difirieron significativamente. Entre los SI, ambos parámetros aumentaron significativamente en el sentido craneocaudal del órgano (Figura 38).

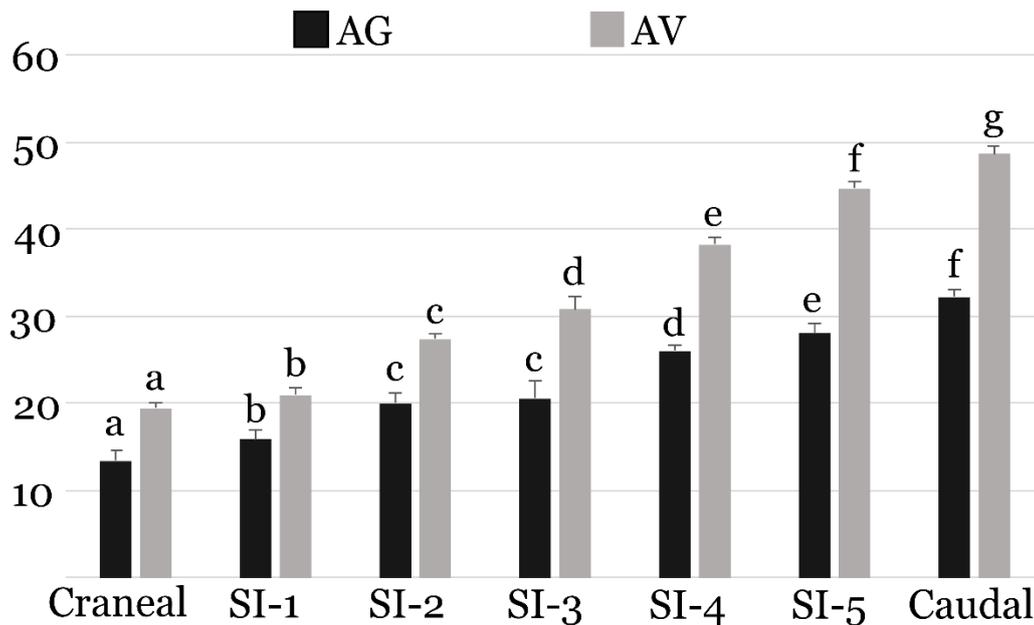


Figura 38. Áreas glandular y vascular (%) de los cinco sitios de implantación y los dos segmentos uterinos (craneal y caudal a las implantaciones) durante la gestación temprana de *L. maximus*. Abreviaturas: AG, área glandular; AV, área vascular. Para cada parámetro morfológico, las letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Discusión

La muerte embrionaria de *L. maximus* es temprana ya que comienza a los 26-35 dpc en una gestación de aproximadamente 5 meses, y espontánea, ya que no es causada por agentes etiológicos u otros eventos anormales (Weir, 1971b; Roberts y Perry, 1974). La resorción embrionaria (Jubb y col., 2015) puede ser parcial o total si ocurre en algunos o todos los *conceptus* (Conaway y col., 1960). En este estudio, se determinó que la tasa de resorción de la especie es del 80%. Este valor es superior al observado en la muerte embrionaria espontánea de roedores

miomorfos como *Rattus norvegicus* (9%) y *Mus musculus* (10%). Es incluso mayor que la obtenida mediante el modelo murino de pérdida embrionaria generado por el cruzamiento entre las cepas CBA / cepa J x DBA / 2 (30%) (Clark y col., 2008; Fonseca y col., 2014). La tasa de reabsorción de *L. maximus* también es mayor que en animales de producción como los cerdos, en los que la reabsorción embrionaria es alta como consecuencia de la selección de hembras con un alto nivel de implantaciones (Bazer y Johnson, 2014).

En diferentes mamíferos, incluidos camélidos, macroscelidos, cérvidos, pangolines, murciélagos nectarívoros (Glossophaginae) y escadentios, el útero tiene áreas particulares en las que ocurre el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia del *conceptus* (Hayssen y Orr, 2017; Jones y col., 2019; Mendoza y col., 2013).

En *L. maximus*, los sitios de implantación analizados en este estudio se ubicaron entre los segmentos uterinos craneal y caudal. Las características histológicas, histoquímicas, lectinhistoquímicas e inmunohistoquímicas de ambos segmentos no difirieron de los observados en hembras no gestantes, resultados obtenidos de trabajos previos (Flamini y col., 2019) como así también del capítulo III.

En relación a los sitios de implantación, todos ellos mostraron una tonalidad blanquecina debido a la ausencia de zonas necróticas oscuras. En vizcachas con gestación intermedia, las implantaciones en resorción (craneales y medias) se diferenciaron macroscópicamente por su tono marrón en comparación con el blanco-amarillento de las viables (Flamini y col., 2019). Esta observación coincide con lo observado en la perra doméstica *Canis familiaris*, especie de la que provienen la mayor parte de los detalles macroscópicos de la resorción (England y Russo, 2006; Ortega-Pacheco y col., 2006; Totton y col., 2010). Sin embargo, en

este estudio, concluimos que la tonalidad externa no debe ser considerada como criterio que indica reasorción durante la gestación temprana de *L. maximus*, ya que el proceso apenas comienza. Aunque la apariencia externa de los sitios de implantación fue homogénea, el estudio morfométrico determinó la presencia de diferencias significativas en el largo y el ancho entre los mismos. Esto podría deberse al hecho de que las implantaciones caudales (más grandes) se implantan primero, seguidas de las ubicadas en la región media, siendo las más pequeñas aquellos sitios de implantación de la región craneal de los cuernos (Roberts y Weir, 1973). Sin embargo, las diferencias en la longitud y el ancho de los sitios de implantación no solo se deben a los diferentes tiempos de implantación, sino que también se pueden originar debido al cese en el desarrollo de las implantaciones craneales y medias. El cese en el desarrollo de los sitios de implantación es una característica observada en la muerte embrionaria temprana y espontánea de roedores múridos, como el ratón y la rata (Flores y col., 2014; Fonseca y col., 2014). Por lo tanto, esta variación en ambos parámetros morfométricos no debe usarse como una herramienta macroscópica para determinar el inicio de la muerte embrionaria temprana de *L. maximus*.

En la observación macroscópica, los sitios de implantación se ubicaron a lo largo ambos cuernos uterinos con una distancia similar entre sí. En los roedores histricomorfos, el espaciamiento de los blastocistos no es un proceso aleatorio y la musculatura uterina tiene un papel fundamental (Roberts y Weir, 1973). Las contracciones uterinas durante la preñez y el parto están reguladas por la progesterona (P4) (Mendelson y col., 2019). En este estudio, la expresión del receptor de progesterona se observó en el miometrio a lo largo de todo el cuerno uterino grávido. Por tanto, podemos inferir que el espaciamiento de los sitios de implantación en la vizcacha estaría regulado por P4.

El desarrollo prenatal temprano de la vizcacha es uno de los aspectos menos estudiados de su biología reproductiva. Cuando se produce la interacción blastocisto-epitelio luminal uterino, la reacción decidual desencadenada conduce a la formación de la decidua. Luego, el trofoblasto invade el estroma endometrial, lo que resulta en una implantación intersticial y antimesometrial. Este proceso es similar a lo que se describió en otros roedores histricomorfos, como *Galea musteloides*, *Proechimys guairae*, *Octodon degus*, *Chinchilla laniger* (Weir, 1971a, 1971b; Roberts y Weir, 1973; Roberts y Perry, 1974), *Dasyprocta leporina* (Rodrigues y col., 2006), *Galea spixii* (Oliveira y col., 2008), *Hydrocaeris hydrocaeris* (Kanashiro y col., 2009), y *Thrichomys laurentinus* (Franco de Oliveira y col., 2012). En *L. maximus*, la decidualización ya se observa a los 24 dpc (Weir, 1971b). En los sitios de implantación analizados en este estudio, se observó una decidua debido a las características morfológicas de las células endometriales VIM positivas. Las células deciduales fueron también positivas para PCNA y Cas-3, lo que permite explicar el recambio celular mediante proliferación y apoptosis. La decidua también expresó al RP. La presencia del RP en la decidua demuestra su sensibilidad a P4, ya que en otras especies es fundamental para su formación y función (Wetendorf y DeMayo, 2012). Esto guarda relación con el aumento significativo de los niveles séricos de P4 desde el comienzo hasta la mitad de la gestación (Dorfman y col., 2013).

En los sitios de implantación se observó a un blastocisto alargado (“embrión cilíndrico”). Esta característica no es exclusiva de *L. maximus* ya que también está presente en otros roedores histricomorfos, incluyendo al cuis, el casiragua y la chinchilla (Roberts y Weir, 1973; Roberts y Perry, 1974). Los sitios de implantación aquí estudiados se correspondieron a un tiempo de posfertilización de 26 a 32 días (Leopardo y Vitullo, 2017). En el blastocisto alargado se identificaron los tejidos embrionarios, como la masa celular interna

(MCI) y los tejidos extraembrionarios (TE_x), entre ellos, el endodermo visceral (EnVi), las células gigantes ectoplacentarias (CGEP) y el trofoblasto ectoplacentario (TrEc). El EnVi delimitó la cavidad exocelómica, en la que se encontró el MCI. Además, el EnVi es el reponsable de la forma alargada del blastocisto, debido a su expansión en el sentido meso-antimesometrial (Roberts y Weir, 1973). Las CGEP observadas en *L. maximus* se asociaron con funciones fagocíticas (Roberts y Perry, 1974) e invasivas (Flamini y col., 2011). El TrEc delimitó la cavidad ectoplacentaria repleta de sangre materna extravasada y células trofoblásticas extraplacentarias. Estas características también se observan en la nutria y chinchilla (Tibbitts y Hillemann, 1959; Hillemann y Gaynor, 1961). A través de sus extensiones, el TrEc ancla al blastocisto a la decidua y establece el sitio de la futura placenta de la especie (Roberts y Perry, 1974). Además, el grado de extensión del trofoblasto ectoplacentario, así como la regulación de la respuesta inmune de la hembra, podría ser controlado por la decidua, como se ha observado en *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens* (Fonseca y col., 2014; Sharma y col., 2016). La inmunomarcación positiva para PCNA y PR en el MCI y los TE_x demuestra la capacidad proliferativa del blastocisto de cada sitio de implantación y su sensibilidad a la progesterona en las primeras etapas de la gestación. La resorción en *L. maximus* se extiende hasta los 70 días posteriores a la fertilización, período intermedio de gestación. En ese momento, la viabilidad del *concepti* se limita a los implantados cerca del cuello uterino (Weir, 1971b), momento en el que también ocurre el aumento sérico de P₄ en comparación con la gestación temprana (Dorfman y col., 2013). Aunque la supervivencia del *concepti* caudal se ha relacionado con la disponibilidad de P₄ (Fraunhofer y col., 2017), en este estudio en la gestación temprana postulamos que la sensibilidad a P₄ de los sitios de implantación sería similar ya que no observamos variaciones en la expresión de PR entre los *conceptus*.

En cuanto a la respuesta inmune, la infiltración de linfocitos fue observada a los 18 dpc en las implantaciones caudales de *L. maximus* (Roberts y Weir, 1973). En este trabajo postulamos que esos linfocitos podrían estar participando en eventos celulares que son parte de la tolerancia inmunológica del órgano a la concepción, ya que este período gestacional coincide con el período de la implantación. En este estudio a los 26 dpc, los sitios de implantación viables (caudales) no mostraron una marcada infiltración de linfocitos. Por otro lado, observamos una respuesta inflamatoria con un predominio de linfocitos en los sitios de implantación que serán resorbidos, craneales y medios. Además de la respuesta inflamatoria, se observó necrosis en los mismos sitios de implantación. Ambas características son más marcadas en las implantaciones de *L. maximus* con un estado avanzado de resorción (Flamini y col., 2020; Giacchino y col., 2020) y también se han encontrado en la muerte embrionaria temprana y fisiológica de ratas y ratones (Gendron y col., 1990; Drews y col., 2020). Durante la preñez, las citocinas y quimiocinas son fundamentales para el éxito de la implantación, la invasión del trofoblasto y la regulación inmunológica del sistema inmunológico materno (Kaislasuo y col., 2020). La implantación está estrictamente regulada por células inmunes presentes en la decidua, que secretan citocinas y quimiocinas proinflamatorias para atraer al blastocisto (Mor y col., 2017). Se ha demostrado que la depleción de cualquiera de los tipos de células inmunes es perjudicial, resultando en la pérdida fetal o el crecimiento deficiente. La inflamación excesiva también puede ser perjudicial. El blastocisto secreta factores inmunomoduladores para amortiguar la inflamación y gradualmente cambiar el entorno a un perfil antiinflamatorio como se establece durante la placentación (Kaislasuo y col., 2020). Citoquinas proinflamatorias como el TNF- α producido por monocitos / macrófagos a menudo se ha asociado con un mayor riesgo de aborto espontáneo (Zhao y col., 2019). La presencia de células inflamatorias en los sitios de

implantación craneales y medios podrían estar relacionada con su posterior resorción.

En nuestro estudio, también observamos fibroblastos y fibrina, entre las células trofoblásticas y deciduales. En modelos experimentales de muerte embrionaria seguida de resorción, también se produjo una respuesta inflamatoria y depósito de fibrina (Barbeito y col., 2008; Sordelli y col., 2017). Independientemente si las reasorciones son experimentales o fisiológicas, como en *L. maximus*, los eventos en ambas situaciones son similares.

Como ocurre en la gestación de otras especies de roedores, entre ellas, *Mus musculus* (Croy y col., 2003; Faas y de Vos, 2017), *Necromi lasiurus*, *Cerradomys gr. subflavus*, *Euryoryzomys sp*, *Hylaeamys megacephalus*, *Oligorryzomys* (Favaron y col., 2011) y *Thrychomis laurentinus* (Franco de Oliveira y col., 2012), se observaron *uNK* con características morfológicas y un patrón de distribución similar entre los SI. En la placentación de *L. maximus*, las *uNK*, consideradas esenciales durante la preñez (Sojka y col., 2019), se relacionaron con un efecto modulador sobre la invasión del trofoblasto (Flamini y col., 2011). En otras especies con placenta hemocorial, como *Mus musculus* y *Homo sapiens*, las *uNK* también se asociaron con la invasión trofoblástica e incluso con la remodelación de la vasculatura asociada con la decidua (Gaynor y Colucci, 2017). Por lo tanto, las *uNK* podrían participar en la invasión trofoblástica y la renovación de la vasculatura, dos eventos necesarios para la formación de la placenta durante la gestación temprana en *L. maximus*.

Durante el ciclo estral y la gestación, ocurren cambios hormonales que modifican diversos aspectos de la morfofisiología del oviducto y del útero, como la actividad de las glicosiltransferasas (Tulsiani y col., 1997). Esto se observa, por ejemplo, en la expresión de moléculas de superficie que participan en la interacción

entre el embrión y las células luminales uterinas (Varki, 2017). En nuestro análisis histoquímico y lectinohistoquímico, se observó la expresión homogénea de glicoconjugados y residuos glicosídicos. Esto indicaría que los glicoconjugados podrían actuar como moléculas de adhesión entre los blastocistos y el epitelio luminal uterino durante la implantación y que no estarían relacionados con la supervivencia diferencial de los *conceptus*. Los glicoconjugados uterinos no solo se encuentran en las células sino también en las secreciones (Clark, 2015). El histotrofo, secretado por las glándulas uterinas está involucrado en la activación del blastocisto, la receptividad uterina, la decidualización y la supervivencia y el crecimiento de los *conceptus*, como se ha demostrado para varias especies de mamíferos (Bastos y col., 2019; Kelleher y col., 2019; Salamonsen y col., 2013; Spencer y col., 2019; Wetendorf y DeMayo, 2012). En *L. maximus*, observamos diferencias en el área glandular de los cinco sitios de implantación a través del incremento significativo de este parámetro en el sentido craneocaudal del órgano. En este estudio, las glándulas uterinas expresaron al RP. En diferentes especies domésticas, la producción y secreción de histotrofo está relacionada con P4 (Spencer y col., 2004b; Steinhäuser y col., 2017) y *L. maximus* no serían la excepción. Aunque no se observaron diferencias en la distribución de la expresión del receptor de progesterona entre los sitios de implantación estudiados, el aumento significativo en el área glandular en el sentido craneocaudal en las vizcachas con preñez temprana implicaría una mayor cantidad de tejido glandular. Por tanto, postulamos que podría existir una mayor producción de histotrofo y que este influiría diferencialmente en la supervivencia de los SI, favoreciendo a los caudales.

Los vasos sanguíneos son otro componente uterino con un rol esencial durante el desarrollo temprano. Son la base de la nutrición hemotrófica y el intercambio de gases en la placenta (Torry y col., 2007). La muerte embrionaria

puede deberse a diversos factores, entre ellos, a una mala vascularización como ocurre en diferentes especies, incluida la cerda (Linton y col., 2010) y el ratón (Woods y col., 2018). La observación externa de los cuernos uterinos reveló la congestión de los vasos sanguíneos, específicamente las arterias uterinas, y sus ramificaciones. Inicialmente se informó que el suministro vascular a cada implantación de *L. maximus* sería similar en todo el cuerno (Roberts y Perry, 1974). Sin embargo, recientemente se demostró que es mayor la vascularización en la región caudal del órgano (Flamini y col., 2020). En los cuernos uterinos de fetos de 50 y 90 dfp, se observó un mayor desarrollo de vasos sanguíneos en la región caudal (Flamini y col., 2020). Este desarrollo continúa en la etapa posnatal, ya que, en hembras adultas sin preñez, hay mayor vascularización (Giacchino y col., 2020). En este estudio, determinamos que el patrón de área vascular que se observa en las hembras no preñadas se mantiene en los cuernos uterinos con preñez temprana, razón por la cual las implantaciones cercanas al cuello uterino tienen un mayor suministro vascular. Este suministro vascular no solo está relacionado con nutrición hemotrófica, sino también al desarrollo de la placentación hemomonocorial de la especie (Flamini y col., 2011).

Basado en los datos obtenidos de este estudio y de trabajos anteriores realizado en nuestro laboratorio (Flamini y col., 2020) consideramos que el aumento de la vascularización en el sitio de implantación de los embriones viables se origina durante la organogénesis uterina y no se debe a una respuesta diferencial a factores angiogénicos durante la preñez. En otras especies como la alpaca (*Vicugna pacos*) y el impala (*Aepycerus melampus*) hay diferencias entre la vascularización entre los cuernos uterinos. En la alpaca, se encontró que la vasculatura está más desarrollada en el cuerno izquierdo desde la vida prenatal e incluso luego, en la posnatal. Este cuerno se corresponde con el sitio donde ocurre la implantación (Mendoza y col., 2013), mientras que, en el impala, el cuerno

derecho es el más vascularizado (Jones y col., 2019). Recientemente se observó que en implantaciones embrionarias viables correspondiente a una gestación intermedia se establece una óptima interfase materno-fetal, en comparación con las implantaciones bajo reabsorción embrionaria (Flamini y col., 2020).

CAPÍTULO V

Estudios en úteros de hembras con preñez intermedia

Introducción

El crecimiento y la supervivencia del *conceptus* depende de la remodelación uterina regulada, entre otros factores, por las hormonas sexuales (Spencer, 2014b; Deng y col., 2018). Aunque la remodelación sea homogénea en toda su extensión, la implantación y la placentación en algunas especies ocurren en sitios específicos del órgano. Entre los camélidos, se demostró que el cuerno uterino izquierdo de *Vicugna pacos* presenta una mayor vascularización (Mendoza y col., 2013) y expresión de transcritos en la matriz extracelular endometrial (Barraza y col., 2020), que el derecho, y se corresponde con el sitio de implantación en esta familia. En los artiodáctilos, los cuernos uterinos del cérvido *Aepycerus melampus* varían entre sí. El cuerno uterino derecho, que es en el que ocurre la implantación, es más grande que el izquierdo, incluso la altura de los epitelios luminal y glandular es mayor (Jones y col., 2019). En otras especies de artiodáctilos, entre ellas, *Neotragus moschatus*, el cuerno uterino izquierdo es más pequeño que el derecho, e incluso las carúnculas del mismo tienen menor desarrollo (Buechner, 1961; Mossman y Mossman, 1962; Lee y col., 1977; Loskutoff y col., 1990; Hayssen y Orr, 2017; Wilsher y col., 2020). Entre los quirópteros, la implantación y la placentación en las especies *Megaderma lyra* y *Molossus ater* ocurren respectivamente en el extremo craneal del cuerno uterino derecho e izquierdo lo que ha sido relacionado con una mayor vascularización en las mencionadas regiones (Gopalakrishna y Khaparde, 1978; Rasweiler, 1990, 1991). En el insectívoro *Elephantulus myurus*, los extremos uterinos caudales presentan una gran expansión de las glándulas uterinas y se corresponden con los sitios de la implantación y la placentación

(Tripp, 1971). Todas estas especies tienen en común que la implantación de solo uno o dos blastocistos ocurre en sitios particulares de uno o ambos cuernos, sin que ocurra muerte embrionaria masiva. En cambio, en *L. maximus*, hay poli-implantación de 5-6 blastocistos/cuerno uterino, y a partir de los 26 dpc los sitios de implantación craneales y medios se resorben hasta los 70 dpc. Sin embargo, los caudales progresan y dan lugar al nacimiento de crías precociales (Weir, 1971a, 1971b; Roberts y Weir, 1973). No se ha encontrado, hasta el presente, algo similar en ningún otro mamífero. Estudios morfológicos realizados en úteros de *L. maximus* durante su vida prenatal demostraron que las regiones caudales tienen un mayor aporte vascular en comparación con el resto del útero (Flamini y col., 2020). A partir de los resultados obtenidos y descritos en el capítulo III, se encontró que el útero de hembras adultas sin preñez también varía, en sentido craneocaudal, tanto en el espesor del endometrio y el miometrio como en las áreas ocupadas por las glándulas uterinas y los vasos sanguíneos. Estudios angiográficos realizados por otros investigadores refuerzan nuestros resultados (Giacchino y col., 2020). Las variaciones uterinas observadas en las hembras sin preñez se incrementan en la gestación temprana, esto se ha relacionado con la muerte embrionaria temprana y fisiológica de la especie, según los resultados obtenidos en el capítulo III. Considerando la heterogeneidad uterina prenatal y posnatal de *L. maximus*, como así también las características de la gestación temprana e intermedia descritas previamente por nuestro grupo (Flamini y col., 2019, 2020) y en este trabajo de investigación, podemos presuponer que las variaciones uterinas restringen el crecimiento y promueven la muerte del embrión y, posteriormente la pérdida de la homeostasis placentaria, en los SI craneales y medios.

Materiales y métodos

Esta sección se encuentra detallada en el CAPÍTULO II

Resultados

- Observación ultrasonográfica y macroscópica de los SI

El ultrasonido reveló la presencia de cuatro sitios de implantación/cuerno uterino, denominados SI-1, SI-2, SI-3 y SI-4, en el sentido craneocaudal del órgano. La extrapolación del diámetro del IS-4 permitió determinar un tiempo gestacional de 46-53 días post-fertilización. Es importante aclarar que en estas tres hembras la implantación craneal no se detectó a nivel macro ni microscópico debido a la resorción.

Todos los SI presentaron forma esférica. Los SI-1, SI-2 e SI-3 se observaron con ecogenicidad mixta debido a la presencia de áreas hipoecoicas irregulares, y sin una clara diferenciación de una placenta y un embrión (Figura 39 a). En cambio, en el SI-4 se determinó que las paredes del saco gestacional son gruesas y sólidas, con una ecogenicidad media (Figura 39 b). En un corte longitudinal del SI-4 se observó una cavidad llena de fluido aneicoico en la que se evidenció a un embrión como una estructura alargada de ecogenicidad media y con un polo cefálico que se corresponde al sitio de mayor diámetro con presencia de cavitaciones aneicoicas (Figura 39 c). El corte transversal del SI-4 evidenció un engrosamiento regional de la pared del saco gestacional, sitio donde se localizó la placenta. Este órgano se observó como una estructura sólida, protruido parcialmente hacia la luz del saco gestacional y con ecogenicidad media (Figura 39 d). Mediante *Eco-Doppler* color se determinó la viabilidad del embrión del IS-4 por la presencia de actividad cardíaca de color azul (Figura 39 e). El Doppler espectral estimó una frecuencia cardíaca promedio de 217 latidos por minuto (Figura 39 f)

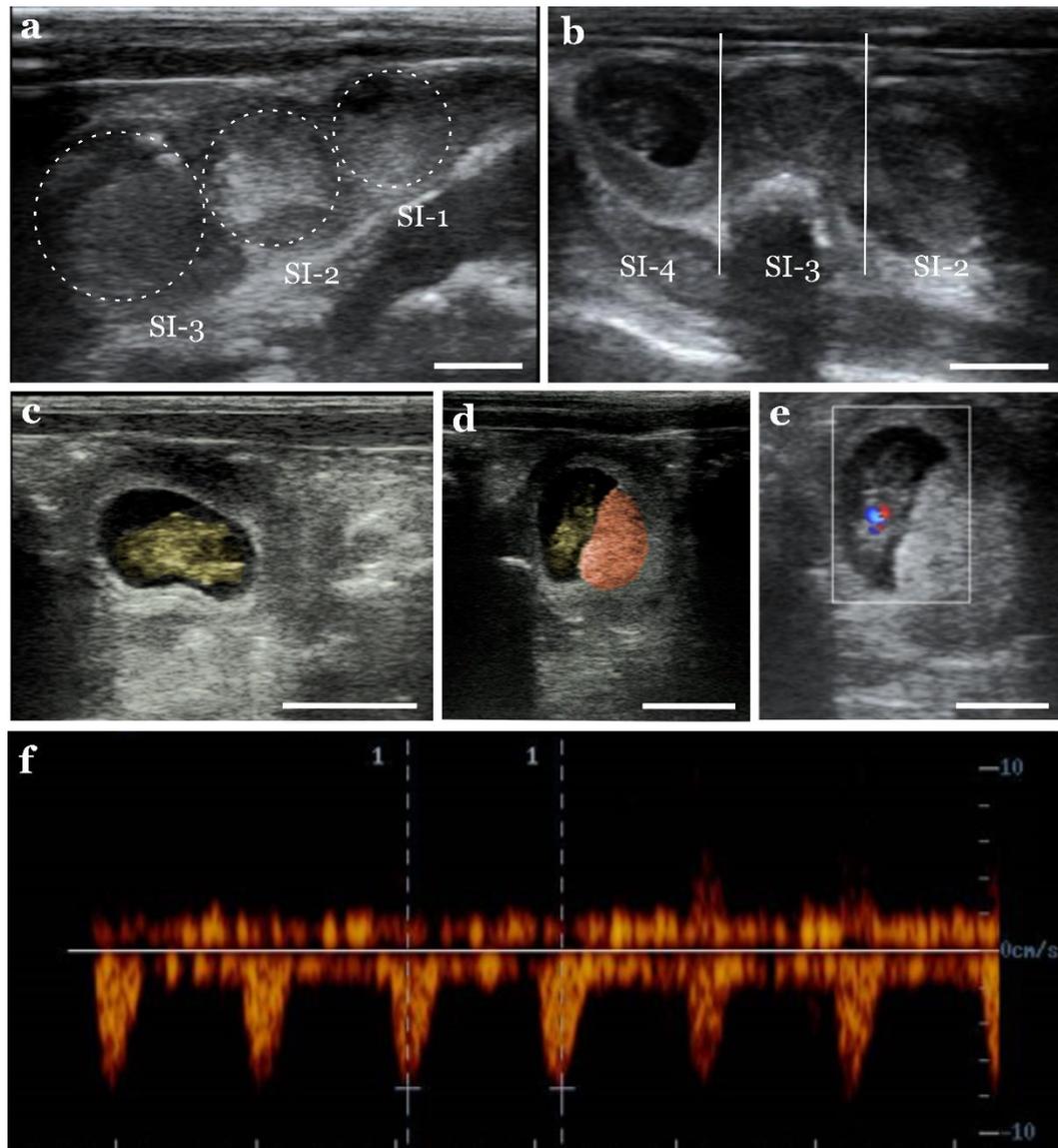


Figura 39. Ultrasonografía de los cuernos uterinos durante la gestación intermedia de *L. maximus*. **a.** SI-1, SI-2 y SI-3, en resorción; **b.** Sección transversal de los SI-4, SI-3 y SI-2. El SI-4 (viable) con cavidad y embrión. Los restantes (en resorción) macizos; **c.** SI-4, en amarillo se observa el embrión; **d.** SI-4, embrión y placenta discoidea (naranja); **e.** Viabilidad del SI-4 mediante Doppler color; **f.** Frecuencia cardíaca del embrión de SI-4 mediante Doppler espectral. Barras de escalas: 1 cm (a), 0, 2 cm (b), 0, 5 cm (c-e).

La observación macroscópica permitió confirmar la existencia de los cuatros SI evidenciados con ultrasonido, con forma esférica y color blanco variable en su extensión (Figura 40 a). En el sitio antimesometrial de los SI-1, 2 y 3 se observó una zona necrótica de color negro y consistencia semi-fluida, que se

desintegró durante el procesamiento histológico. La placenta en formación de estos sitios no fue definida (Figura 40 b). En cambio, el SI-4 estuvo conformado por un embrión en el que se diferenciaron los polos craneal y caudal, y una placenta bien reconocible (Figura 40 c y d).

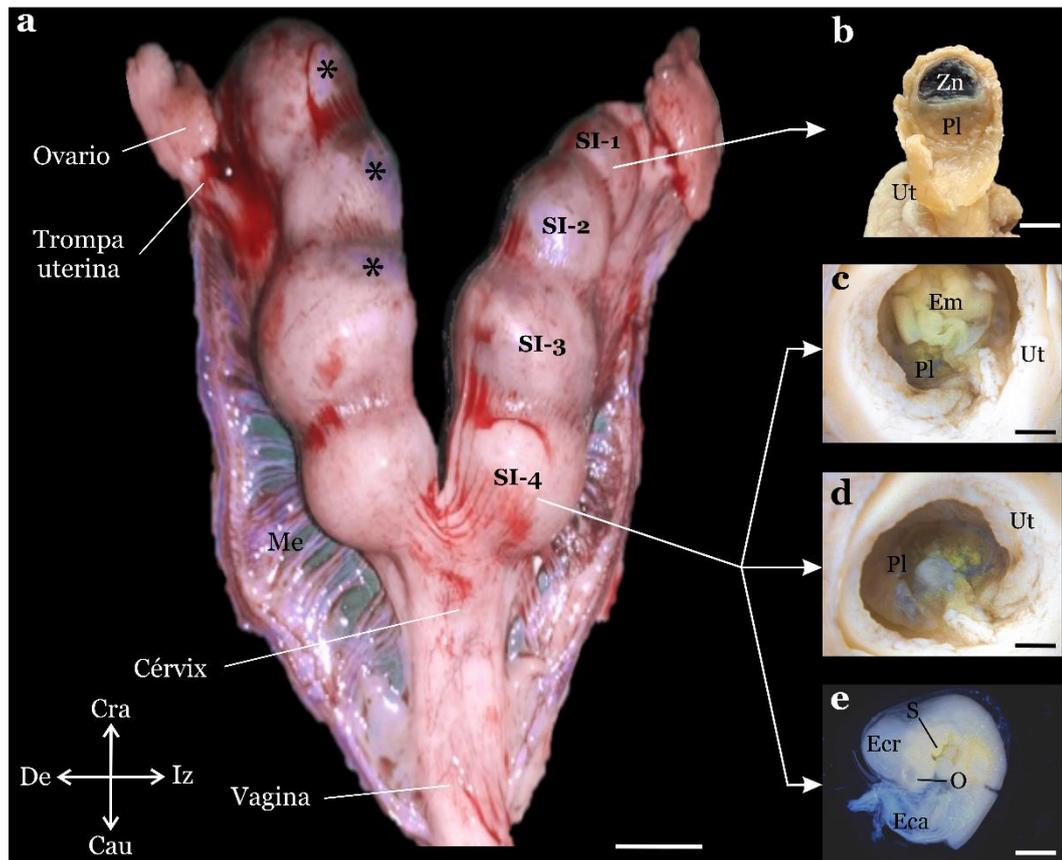


Figura 40. Sistema reproductor de *L. maximus* durante su gestación intermedia. **a.** SI-1, SI-2 y SI-3, en resorción, y el SI-4 viable. Los asteriscos en SI-1, SI-2 y SI-3 indican la zona necrótica; **b.** Sección transversal del SI-1, se observa un SI macizo en el que se reconocen dos zonas, la necrótica y la correspondiente al sitio de desarrollo de la placenta; **c.** Sección paralela al eje craneocaudal del SI-4 en donde se reconoce al embrión (Em) y la placenta en formación (Pl); **d.** SI-4 sin embrión; **e.** Embrión de 46 dpc. Se reconoce los extremos craneal (Ecr) y caudal (Eca), uno de los ojos (O) y las somitas (S). Abreviaturas: Cau, caudal; Cra, craneal; D, derecha; I, izquierda; M, masa necrótica; Ut, útero. Barras de escalas: 1 cm (a), 0, 5 cm (b), 0, 5 cm (b-d).

- Características histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas de los SI

Tal como se mencionó anteriormente, en el sitio donde se localizó el embrión en los SI-1,-2 y -3 había una masa de color marrón oscuro que por su consistencia semi-fluida se disolvió durante el procesamiento histológico. El resto de cada uno de estos SI presentó desorganización y desintegración tisular (Figura 41 a, b). Se observó hemorragia y una abundante infiltración leucocitaria con predominio de neutrófilos. También se identificaron mastocitos (Figura 41 c), células gigantes de cuerpo extraño, macrófagos con hemosiderina y residuos endocitados (Figura 41 d-f) y células en apoptosis (Figura 41 g). Las implantaciones de estos SI en resorción se encontraron circunscriptos por una malla de fibras colágenas y fibroblastos (de localización más externa) cuyo límite externo fue el miometrio (Figura 41 h).

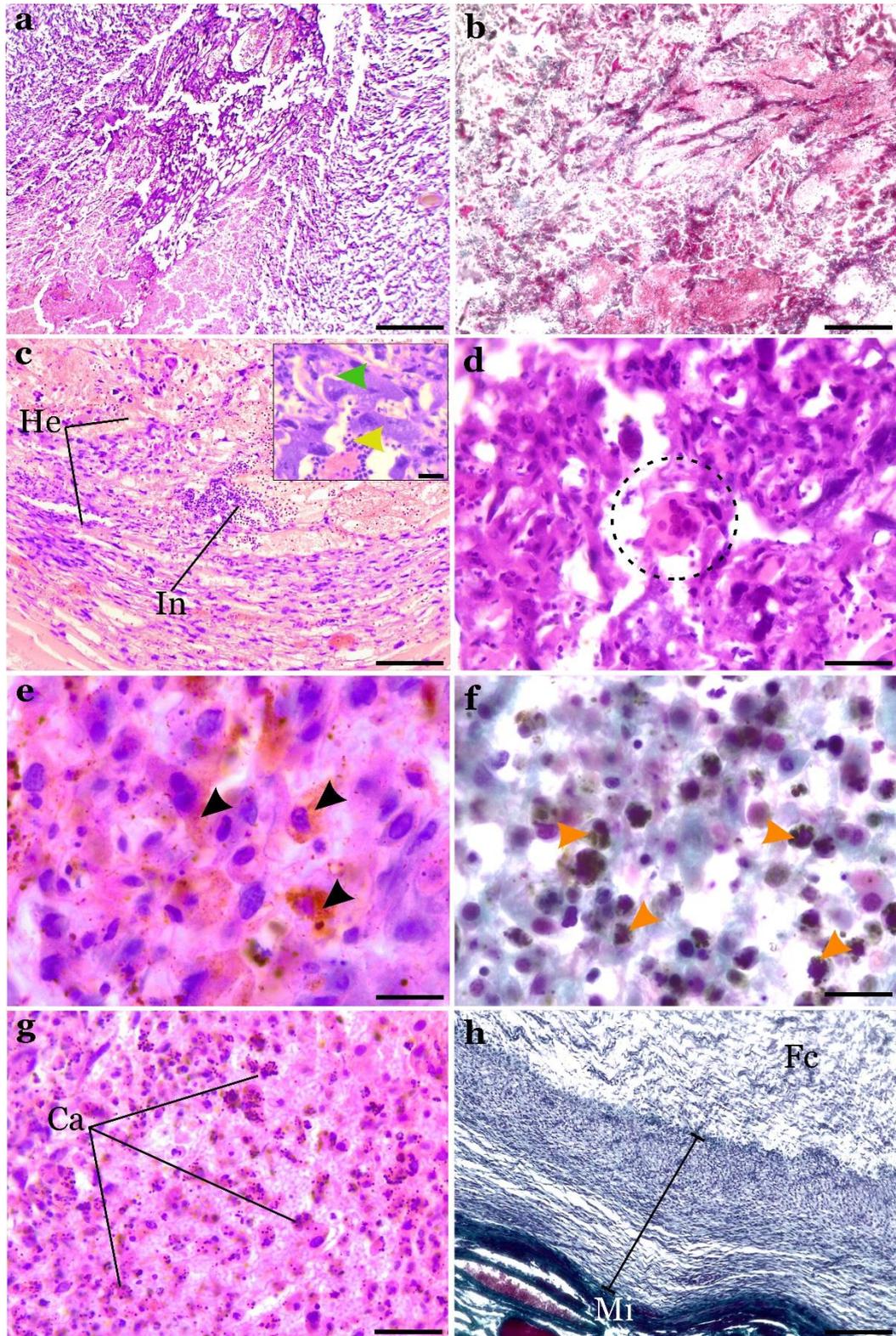


Figura 41. Morfología de los SI-1, -2 y -3 durante la gestación intermedia de *L. maximus*. a y b. Desorganización tisular y desintegración celular, representación con el SI-1 (a) y SI-2 (b). Hematoxilina y eosina, y tricrómico de Gomori, respectivamente; c. Hemorragia (He) e infiltración de neutrófilos (In), representación con el SI-1. En el inserto

se observan neutrófilos (cabeza de flecha amarilla) y mastocitos (cabeza de flecha verde). Barra de escala: 50 μm ; **d.** Células gigante de cuerpo extraño delimitada por óvalo con línea discontinua, representación con el SI-2; **e.** Macrófagos con acúmulo de hemosiderina en su citoplasma (cabezas de flechas), representación con el SI-2. Hematoxilina y eosina; **f.** Macrófagos con residuos citoplasmáticos, cabezas de flechas naranjas, representación con el SI-2. Tricrómico de Gomori; **g.** Células con cuerpos apoptóticos (Ca), representación con el SI-3; **h.** Fibroblastos y pared de fibras colágenas, representación con el SI-3. Tricrómico de Gomori. Barras de escalas: 500 μm (a), 200 μm (b,c), 40 μm (d, f, h), 20 μm (e, f).

El sincitiotrofoblasto fue PK+, al igual que otras células aisladas como en aquellas que circunscribían a los vasos sanguíneos (Figura 42 a-c). Estas células también fueron positivas con PCNA por lo que se infiere que se encontraron en proliferación (Figura 42 d). Por otro lado, la apoptosis observada en los cortes coloreados con hematoxilina-eosina fue confirmada por la marcación positiva para Cas-3 (Figura 42 e). Los fibroblastos de la malla que circunscribió a cada implantación de los SI en resorción resultaron Vim+ y PCNA+ (Figura 42 f-h).

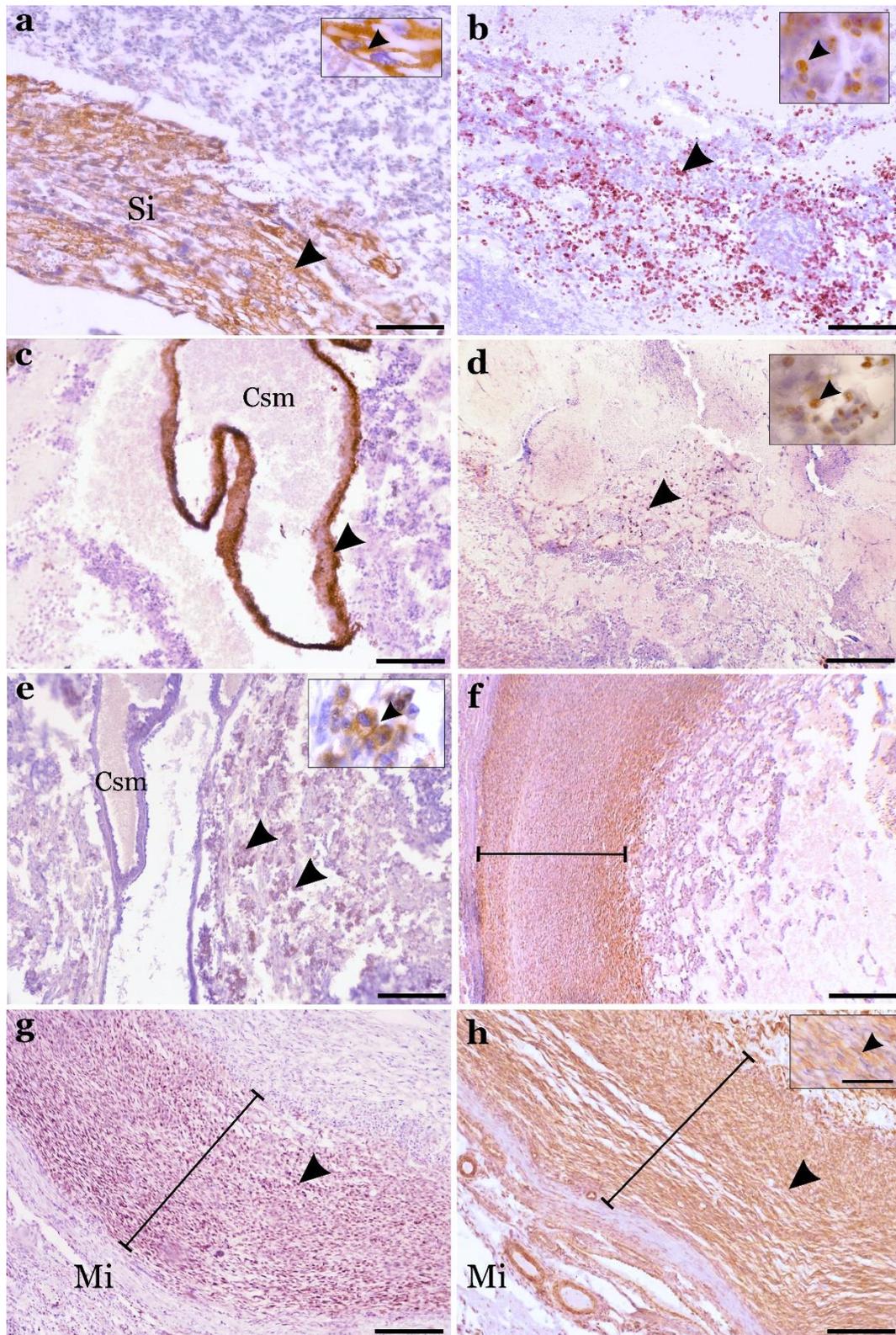


Figura 42. Caracterización inmunohistoquímica de diferentes tejidos y procesos en los SI-1, -2 y -3 durante la gestación intermedia de *L. maximus*. Las cabezas de flechas indican las inmunomarcaciones para cada uno de los anticuerpos primarios utilizados. **a.** Sincitiotrofoblasto PK+; **b.** Células trofoblásticas dispersas PK+;

c. Sincitiotrofoblasto PK+ delimitando a un vaso sanguíneo materno; **d.** Células trofoblásticas en proliferación (PCNA); **e.** Células trofoblásticas en apoptosis (Cas-3); **f.** Capa de fibroblasto en proliferación (PCNA); **g.** Mayor magnificación de los fibroblastos PCNA+; **h.** Capa de fibroblastos Vim+. Cada inserto se corresponde a una mayor magnificación de la foto. Barra de escala: 50 μm . Abreviaturas: Mi, miometrio; Si, sincitiotrofoblasto; Vs, vaso sanguíneo materno. Barras de escalas: 500 μm (d, f), 200 μm (a-c, e, g, h).

Por su parte, los SI-4 presentaron una implantación intersticial que ocupó la mayor parte de la luz uterina (Figuras 43 a). La implantación se encontró unida al endometrio del polo antimesometrial mediante una mesoplacenta compuesta por tejido epitelial y conectivo (Figuras 43 b). En la sección del embrión se observaron diferentes estructuras y órganos en desarrollo, entre ellos, tubo neural, notocorda, miembros torácicos y pelvianos, tiroides, pulmones, estómago, corazón, hígado, y tubo digestivo, cápsula de Bowman, cresta genital, cordón nefrogénico, conducto de Wolff (Figuras 43 c y d).

El embrión se encontró próximo a la placenta y la subplacenta en desarrollo (Figuras 42 d). En la placenta se reconocieron dos poblaciones de células trofoblásticas, el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto, como así también una organización lobulada (Figuras 42 e). Asimismo, la placenta también presentó inicios de una vascularización dual, debido a la presencia de vasos sanguíneos embrionarios (Figuras 43 f) y cámaras sanguíneas maternas delimitadas por sincitiotrofoblasto (Figuras 43 g). Por su parte, la subplacenta se halló entre la excavación de la placenta y el área de decidualización (vértice que está en contacto con la *decidua basalis*). Su disposición presentó un aspecto lamelar, en cuya perifería se observó citotrofoblasto, mientras que en el centro de las lamelas al mesénquima (Figuras 43 h). Se reconocieron anexos extraembrionarios como el amnios, conformado por un epitelio cúbico simple, y el saco vitelino. Este último estaba conformado por endodermo compuesto por epitelio cilíndrico simple, tejido

conectivo mesenquimático y vasos sanguíneos en cuyas luces se hallaron hemangioblastos. Por otro lado, el saco vitelino se encontró diferenciado en las hojas parietal y visceral (Figuras 43 i, j). Las células deciduales, grandes, poligonales y PAS+, estaban presentes tanto en la *decidua basalis* como la *parietalis* (Figuras 43 k).

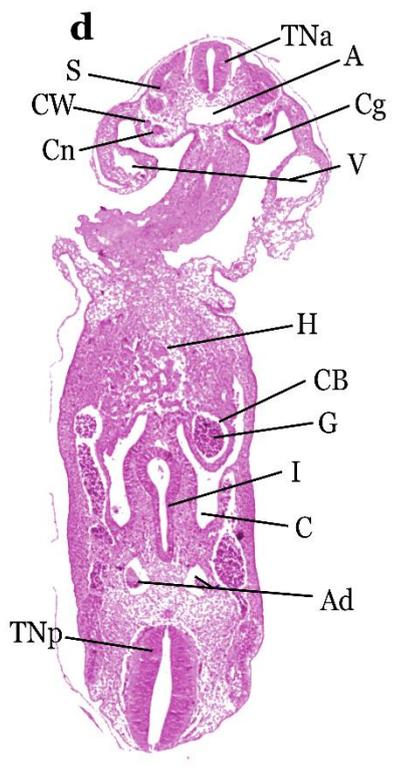
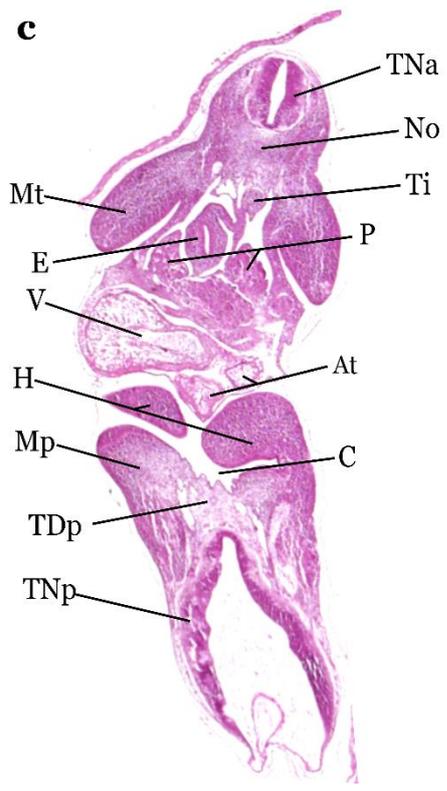
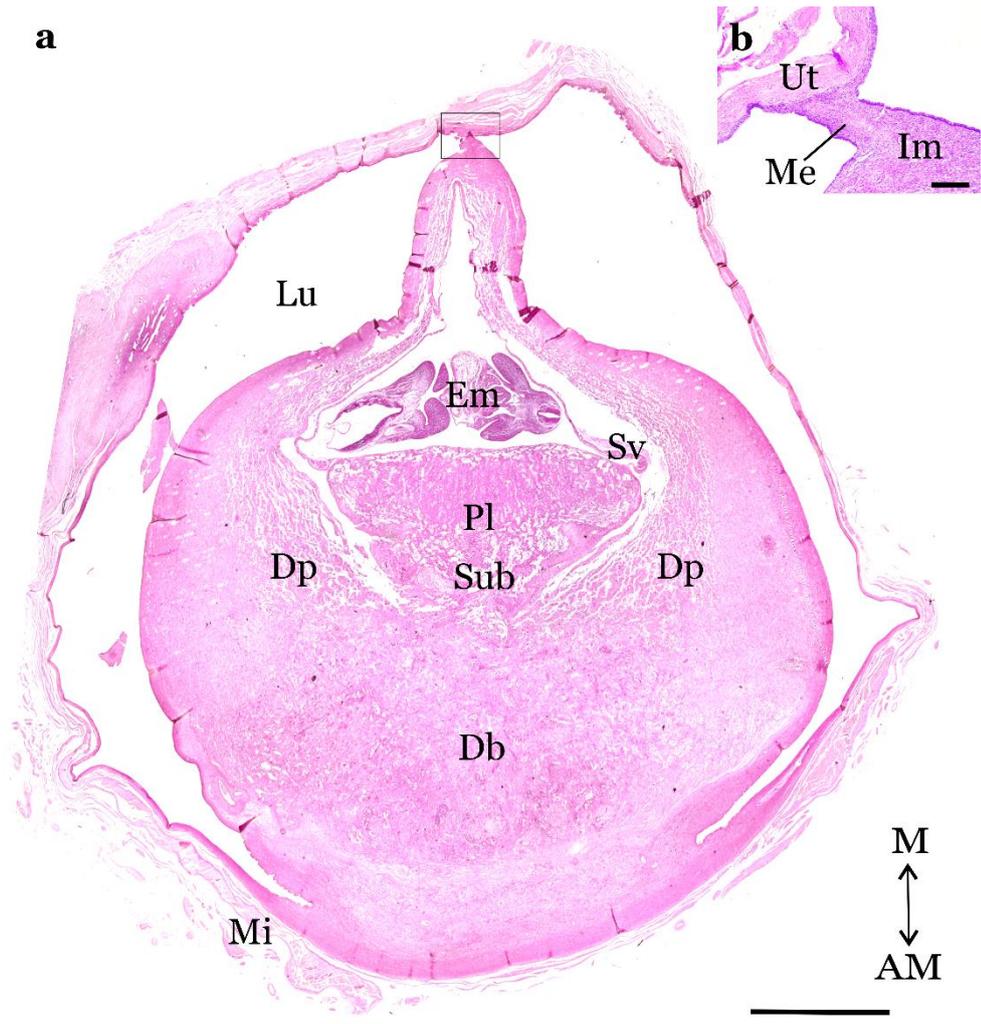


Figura 43. Descripción morfológica del SI-4 (viable) durante la gestación intermedia de *L. maximus*. **a.** Morfología del SI-4. Se reconoce una implantación intersticial y antimesometrial con un embrión, la placenta, la subplacenta, los anexos extraembrionarios y la decidua (*basalis* y *parietalis*); **b.** Detalle del recuadro mostrado en “a”, mesoplacenta; **c.** Sección anterior del embrión de 46 dpc; **d.** Sección posterior del embrión de 46 dpc. Abreviaturas: A, aorta; Am, antimesometrial; At, atrio; Ad, aorta dorsal; C, celoma; CB, cápsula de Bowman; Cg, cresta genital; Cn, cordón nefrogénico; CW, conducto de Wolff; Db, *decidua basalis*; Dp, *decidua parietalis*; E, esófago; Em, embrión; H, hígado; Im, implantación; I, intestino; Lu, lumen; M, mesometrial; Me, mesoplacenta; Mp, miembro pelviano; Mt, miembro torácico; No, notocorda; Pl, placenta; Sub, subplacenta; Sv, saco vitelino. TDp, tubo digestivo posterior; TNa, tuno nervioso anterior; TNp, tubo nervioso posterior. Barras de escala: 500 μm (a) y 50 μm (b).

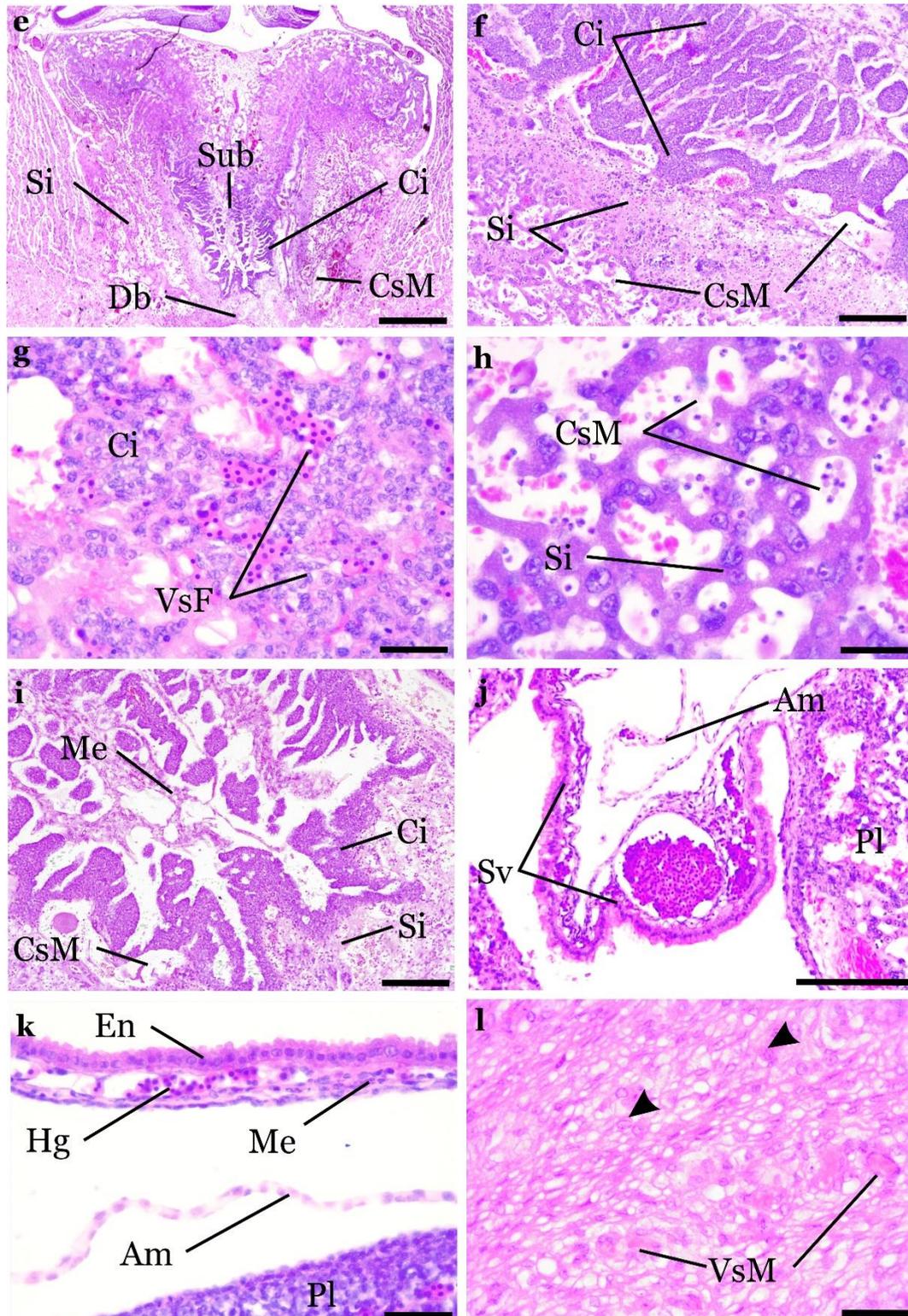


Figura 43- continuación. e. Placenta, Subplacenta y *decidua basalis*; e. Células trofoblásticas conformando al citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto; f. Vasos sanguíneos embrionarios; g. Cámaras sanguíneas maternas delimitadas por sincitiotrofoblasto; h. subplacenta. Se observan los pliegues delimitados por citotrofoblasto; i. Amnios y saco vitelino; j. Saco vitelino vascularizado. En el interior de los vasos sanguíneos se observan

hemangioblastos; **k**. Decidua, células PAS+. Abreviaturas: Am, amnios; Ci, citotrofoblasto; CsM, cámaras sanguíneas maternas; Db, *decidua basalis*; Dp, *decidua parietalis*; Hg, hemangioblastos; Im, implantación; Lu, lumen; Me, mesénquima; Pl, placenta; Si, sincitiotrofoblasto; Sub, subplacenta; Sv, saco vitelino; VsF, vaso sanguíneo fetal; VsM, vaso sanguíneo materno. Barras de escalas: 500 μm (e), 200 μm (h, i), 100 μm (f, g, j), 40 μm (k, l).

Discusión

En estudios previos se formuló como hipótesis la heterogeneidad de los cuernos uterinos de *L. maximus* tanto en su vida prenatal como posnatal. Esta posteriormente se contrastó. A partir de la misma se han inferido algunas de las causas de la muerte embrionaria temprana, masiva y sectorizada de la especie (Flamini y col., 2019, 2020; Giacchino y col., 2020). Esta muerte se inicia a los 26 dpc y extiende hasta los 70 dpc (Weir 1971b; Roberts y Perry, 1974). Tal como se concluyó en el capítulo IV, a los 26 dpc se observaron indicios de muerte embrionaria en las implantaciones craneales y medias (tasa de resorción 80%) mediante infiltración linfocitaria, hemorragia, depósito de fibrina y tejido necrotico; características más evidentes durante la gestación intermedia (Flamini y col., 2020; Giacchino y col., 2020). En ratones, la resorción espontánea sigue un patrón específico que es independiente del tiempo en que se inicia este proceso durante la gestación, y se resume en cuatro etapas: 1. Retraso en el desarrollo o el crecimiento del *conceptus*, 2. Disfunción cardíaca, 3. Muerte del embrión, desintegración de las membranas extraembrionarias y, finalmente, pérdida de la integridad placentaria, y 4. presencia de hemorragia y necrosis, tejido cicatrizal y fibrinoide. Además de estas características microscópicas, esta etapa también se caracteriza por la visualización macroscópica del sitio de implantación en resorción en el exterior del útero (Flores y col., 2014). En el presente estudio no se pudo seguir la secuencia exacta, aunque se hallaron las características de las cuatro

etapas en las resorciones de *L. maximus*. La etapa 1 en la gestación temprana de *L. maximus* se reconoció por los valores significativamente menores de los parámetros largo y ancho en los sitios de implantación craneal y medios, datos obtenidos en el capítulo III; durante la gestación intermedia también se observó esta variación de tamaño, aunque no fue cuantificada (Flamini y col., 2020; Giacchino y col., 2020). En este estudio a los 46 dpc, hay tendencia de menor tamaño en las implantaciones en resorción (SI-1, SI-2 y SI-3) respecto de la viable (SI-4). Por otro lado, el estudio ultrasonográfico también confirma el cese del desarrollo que caracteriza a esta etapa. Además, en el estudio ultrasonográfico los sitios en resorción se observaron como estructuras sólidas, con ecogenicidad y ausencia de estructuras embrionarias. Estas características tampoco difieren de las informadas para la resorción embrionaria en la perra doméstica *Canis familiaris* (England y Russo, 2006) y en la liebre europea *Lepus europaeus* (Schröder y col., 2013). En cambio, en el SI-4 se observó un embrión y una placenta, cuyas sondas de ecos no difieren a los hallados en los sacos embrionarios viables de *C. familiaris* (England y Russo, 2006). La etapa 2 se evidenció por la ausencia de actividad cardíaca en los sitios de resorción, a diferencia del sitio de implantación viable en el que se registró actividad y frecuencia cardíaca. La etapa 3 estuvo representada por sitios de implantación en los que no se encontró un embrión, pero sí una placenta. Por su parte, la etapa 4 es evidente a partir de signos macroscópicos externos en los sitios de resorción. En este estudio se observó un foco necrótico, en el extremo donde se localizó el embrión en los SI-1, SI-2 y SI-3, que al momento del procesamiento era de color marrón oscuro y de consistencia semi-fluida. La necrosis que se observa en esta zona y no en el sitio donde se desarrollaría la placenta podría asociarse con dos aspectos. Por un lado, la gestación larga de los roedores histricomorfos está relacionada con la tasa de crecimiento lenta de los embriones, particularmente en periodos tempranos de la gestación donde el

crecimiento de la placenta es proporcionalmente mucho mayor que el del embrión (Roberts y Perry, 1974). Por otra parte, la placenta tiene un nivel de oxígeno superior al del feto (Wooding y Burton, 2008). Estos resultados en relación con las conclusiones de estudios previos sugieren una estrecha relación entre la vascularización diferencial y el desarrollo de la placenta hemocorial, en cada sitio de implantación. De esta manera, los menores aportes vasculares en los sitios de implantación en resorción darían lugar a niveles de oxígeno insuficientes (Flamini y col., 2020) y, en consecuencia, la hipoxia generaría la necrosis en el embrión. Esta hipótesis en *L. maximus* está apoyada por observaciones en unidades en resorción de roedores múridos. Según Kaloglu y Bulut (2007), las anomalías estructurales en la vasculatura uteroplacentaria del ratón disminuyen el flujo sanguíneo placentario y generan hipoxia tanto en la placenta como en el feto. Algo similar ha sido propuesto para las resorciones embrionarias espontáneas en *Rattus norvegicus domestica* (Fonseca y col., 2014).

En la necrosis hay destrucción celular que conlleva a la liberación del contenido intracelular, que contiene moléculas que son considerados como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Los clásicos DAMPs incluyen al ácido úrico, proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), familia de las proteínas S100 (S100), adenosín trifosfato (ATP), proteína de shock térmico (HSP)70 y al ácido nucleico celular libre (cfDNA) que incluye al ADN fetal y mitocondrial. Estos DAMPs están asociados a enfermedades de la preñez, entre ellas, la preclamsia y el parto pretérmino, y en cualquiera de ambos casos desencadenan una respuesta inflamatoria estéril tras su unión a los receptores de patrones específicos, RRP (Chen y Nuñez, 2010; Brien y col., 2019). Consideramos que la destrucción tisular y la liberación del contenido celular asociado a la necrosis de los *concepti* de los SI-1, SI-2 y SI-3 de la vizcacha incluiría diferentes DAMPs.

Los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), entre ellos, receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo Nod (NLRs), receptor de lectina tipo C (CLRs), y receptores para productos finales de la glicosilación avanzada (RAGEs), se expresan tanto en las células presentadoras de antígenos, como así también en el miometrio, la decidua y la placenta (Koga y Mor, 2010; Lappas, 2013; Zhang y col., 2014). En la inflamación a nivel de la placenta, las células trofoblásticas (citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto y trofoblasto extraveloso) son el único tipo celular que contacta directamente con el sistema inmune de la hembra como así también con los patógenos y los DAMPs (Abrahams, 2011; Brien y col., 2019). De manera similar a lo que ocurre en la inflamación inducida por patógenos, la unión DAMPs-RRPs activa células no inmunes, como células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, y también a células de la inmunidad innata, como neutrófilos, eosinófilo, macrófagos y células dendríticas. La activación de estas células conduce a la producción de varias citocinas que, a su vez, reclutan células y activan respuestas inmunes adaptativas (Gong y col., 2020). En relación a esto, en los SI en resorción se identificó una abundante infiltración neutrofílica, como así también eosinófilos, macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño. La presencia de macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño está en relación con la cantidad de detritus generados a partir de la necrosis del *concepti* como así también de los cuerpos apoptóticos derivados de células en apoptosis en la placenta, que también reclutarían células fagocíticas mediante la expresión de receptores de muerte. A esta conclusión también han llegado otros estudios mediante el análisis de la resorción espontánea en ratones de la cepa C57BL/6 (Drews y col., 2020). Algunos autores consideran que en etapas finales de la apoptosis hay pérdida de la integridad de membrana, por lo que se desarrolla una necrosis (Zhang y col., 2018). De esta forma, la ruptura de membrana actuaría como DAMP y desencadenaría inflamación estéril. A su vez, la presencia de las células de la inmunidad también

tiene relación con otras características de la inflamación estéril. La destrucción de los tejidos se debe a especies reactivas de oxígeno (ROS), proteasas y factores de crecimiento secretados por neutrófilos y macrófagos; además de la proliferación de fibroblastos, la acumulación aberrante de colágeno y la fibrosis (Chen y Nuñez, 2010). Si bien en este estudio identificamos por inmunohistoquímica a componente placentarios, como el sincitiotrofoblasto y las células trofoblásticas en proliferación, observamos ausencia de cohesión y desintegración de tejidos y estructuras placentarias, que podrían deberse al efecto de las ROS y las proteasas. También, se hallaron múltiples puntos hemorrágicos que serían consecuencia de las mismas moléculas que generarían corrosión y pérdida de la continuidad del endotelio vascular o bien del sincitiotrofoblasto que delimita a los vasos sanguíneos maternos para conformar a las cámaras sanguíneas maternas. Estos mismos sitios presentaron una abundante cantidad de fibras colágenas hacia la implantación y una capa de fibroblastos en proliferación y fibras colágenas en el límite con el miometrio. La abundante cantidad de fibras colágenas se debería a la proliferación de los fibroblastos que las sintetizan en grandes cantidades, y podría establecer un límite que contenga a todo el sitio de implantación en resorción evitando potenciales consecuencia en la implantación viable (SI-4) o bien en algún órgano del sistema reproductor de la hembra. Tanto el infiltrado neutrofílico como la desorganización tisular, la hemorragia y la fibrosis observadas en los SI-1, SI-2 y SI-3 de *L. maximus* son características histológicas que han sido observadas en resorciones embrionarias de roedores múridos, tanto espontáneas (Drews y col., 2020) como inducidas (Woudwyk y col., 2015; Sordelli y col., 2017).

Algunos autores plantean que el compartimento útero-placentario es un sensor de peligro y factores estresantes inflamatorios "extraños" (Nadeau-Vallée y col., 2016), entre ellos, la hipoxia (Nakashima y col., 2020). En este sentido, consideramos que la heterogeneidad en la vascularización uterina de *L. maximus*,

originaría hipoxia en los sitios de implantación con localización craneal y caudal, y esta la necrosis en la placenta y los tejidos embrionarios y extraembrionarios, porque no permitiría un flujo sanguíneo acorde al crecimiento placentario y embrionario. Así, los DAMPs resultantes de la necrosis serían censados por la placenta en desarrollo de esos mismos sitios de implantación. La interacción DAMPs-RRPs induciría una respuesta inflamatoria estéril en donde la homeostasis de la placenta también se vería afectada y se generarían DAMPs. La inflamación estéril resultante no solo se resolvería a través de la inmunidad celular, sino también mediante una fibrosis que limitarían el foco inflamatorio de los sitios en resorción, evitando de este modo la viabilidad de las implantaciones caudales. Estudios *in vitro* con explantos de placenta humana han concluido en la existencia de una relación similar entre la hipoxia, los DAMPs y el desarrollo de una respuesta inflamatoria estéril (Baker y col., 2021).

Tal como se concluyó en los capítulos III y IV, la heterogeneidad uterina en *L. maximus* también se debe a diferencias en el área de las glándulas endometriales y el espesor de la pared uterina y sus tónicas, que influirían en el desarrollo diferencial de los sitios de implantación, favoreciendo a los caudales respecto de los restantes. Los SI-4 son los únicos viables, a partir de los cuales se desarrollarán fetos que serán paridos como crías con un alto grado de precocialidad. Las características del desarrollo embrionario temprano de los roedores histricomorfos, incluida la vizcacha, fueron descritas por diferentes autores en la década de los 70 y recopiladas por Roberts y Perry (1974) en “Hystricomorph Embriology”. En el caso particular de *L. maximus*, muchas de estas fueron actualizadas (Leopardo y Vitullo, 2017), ampliadas y relacionadas con la muerte embrionaria a partir de estudios recientes (Giacchino y col., 2020) como los obtenidos en esta tesis. En relación con la gestación intermedia hasta el presente no hay datos disponibles. En este estudio centrado en los 46 dpc, observamos que

el sitio de implantación viable de *L. maximus* no difiere del patrón de desarrollo de otros euterios filogenéticamente cercanos o distantes (Marcela y col., 2012; Alberto y col., 2013; Pieri y col., 2015). Con respecto a otras características del SI-4, observamos la placenta, la subplacenta, la decidua y otros anexos extraembrionarios como el saco vitelino y el amnios. Si bien las características de estos fueron descritas por Flamini y col (2011) y Barbeito y col. (2021), esta tesis incorpora información complementaria. La placenta principal en desarrollo presentó, ya en este momento del desarrollo, una incipiente organización lobulada y una vascularización dual mediante vasos sanguíneos fetales y cámaras sanguíneas maternas. Esta organización y vascularización madura se extiende durante la placentación y genera una amplia superficie de intercambio materno-fetal (Flamini y col., 2011) que se ha relacionado con el desarrollo de crías precociales (Mess, 2003), características de estos roedores (Rodrigues y col., 2006). Por su parte, la subplacenta, una estructura constante y con una morfología muy similar entre los histricomorfos, pero ausente en otros euterios (Miglino y col., 2021), se localizó entre la placenta y la decidua. La subplacenta es una fuente de trofoblasto invasivo, una característica derivada entre los roedores, particularmente en *L. maximus* se sabe que la misma tiene un incremento de espesor conforme avanza la preñez (Flamini y col., 2011). Estudios recientes sobre la morfología, la vascularización y la actividad secretora de hormonas esteroideas durante la gestación de algunas especies de histricomorfos (*Hydrochaeris hydrochaeris*, *Agouti paca*, *Dasyprocta leporina*, *Kerodon rupestris* y *Cavia porcellus*) permite confirmar el rol endocrino de esta estructura (Miglino y col., 2021). En este estudio, la subplacenta se halló en contacto con la decidua. A diferencia de lo observado en el capítulo IV, en la gestación temprana, la decidua *basalis* y *parietalis*, que contienen abundantes por células PAS+, ocuparon gran parte del sitio de implantación. La observación microscópica nos permitió

identificar una estructura no descripta hasta el momento en *L. maximus*: la mesoplacenta. Esta deriva de la decidua y es un continuo con el endometrio del extremo mesometrial del sitio de implantación. La mesoplacenta no es exclusiva de la vizcacha de llanura, ya que se encontró en otros histricomorfos, entre ellos, *Chinchilla lanigera* (Tibbitts y Hillemann, 1959), *Dasyprocta aguti* y *Agouti paca* (Miglino y col., 2002). Según Becher (1921 a, b), la mesoplacenta se adelgaza conforme avanza la gestación. Estudios comparativos en otras especies han permitido establecer equivalencias entre la mesoplacenta y otras estructuras como el tallo placentario en *Hydrochaerus hydrochaeris* y *Cavia porcellus* (Ibsen, 1928; Uhlendorf y Kaufmann, 1979). Se ha sugerido que su función estaría vinculada a restringir el daño al útero al momento del parto, permitiendo la regeneración rápida del útero y, así, posibilitar la ocurrencia de una siguiente preñez tras un apareamiento postparto (Uhlendorf y Kaufmann, 1979). Esta función de la mesoplacenta guarda relación con lo observado por Flamini y col (2009) durante un estudio de la biología ovárica de la especie en la provincia de Buenos Aires. Estos autores, a diferencia de lo observado por Llanos y Crespo (1952) para ejemplares capturados en de la región litoral de la Argentina con estros postparto esporádicos e irregulares observaron que alrededor de un 70,6% de las hembras capturadas en la región pampeana presentaron una preñez derivada del estro postparto. Posiblemente, las diferencias de ocurrencia del estro postparto de los ejemplares de ambas regiones se deban a variaciones estacionales, ya que la especie tiene hábitos crepusculares y su actividad endocrina depende de las variaciones estacionales de las regiones (Barbeito y col., 2021). En cuanto a los anexos embrionarios, se observó un saco vitelino diferenciado en las hojas parietal y visceral. En el interior de los vasos sanguíneos se hallaron hemangioblastos. El saco vitelino constituye el primer sitio hematopoyético del embrión (Baron y col., 2012), como así también de células madres mesenquimales, tal como se ha observado en *Necomys lasiurus*

(Favaron y col., 2014) y *Bos taurus* (Oliveira y col., 2017) mediante diferentes marcadores moleculares como Stro-1, CD90, CD105, CD73, Oct3/4, Nanog y CD117. Para tiempos gestacionales posteriores a los de este estudio, el saco vitelino se diferencia, y particularmente la hoja visceral forma pliegues cuyas células presentan abundante microvilli en su dominio apical (Flamini y col., 2011). En otros histricomorfos como la paca (*Agouti paca*), las células de esta hoja tienen una gran actividad endocítica que se asocia con una transferencia pasiva de la inmunidad desde la madre hacia el feto (Bonatelli y col., 2005). Considerando la estabilidad morfofuncional de la placenta y los anexos extraembrionarios entre los histricomorfos, se podría considerar que el saco vitelino en *L. maximus* podría presentar también esta misma función.

Los resultados de este estudio completan a los desarrollados anteriormente sobre la biología reproductiva de *L. maximus* con énfasis en la comprensión de la muerte embrionaria temprana y espontánea (Flamini y col., 2009, 2011, 2019, 2020; Giacchino y col., 2020; Barbeito y col., 2021). Si bien este tipo de muerte es común entre los euterios debido a que es un proceso conservado (Drews y col., 2020), la tasa de resorción del 80% (resultado obtenido en el capítulo III) en la vizcacha de llanura supera ampliamente a la observada en otras especies filogenéticamente cercanas o distantes, entre ellas, *Equus caballus* 8% (Rose y col., 2014), *Bos taurus* 20% (Berg y col., 2009), *Lepus europeos* 42% (Schroeder y col., 2011). Además, las características asociadas con la inflamación estéril consecuencia los potenciales DAMPs involucrados permitirá extrapolar los resultados a modelos convencionales para el estudio de aquellas enfermedades relacionadas a la preñez. A su vez, el estudio refleja la capacidad uterina de la vizcacha de llanura para remodelarse en toda su extensión y dar lugar a la implantación de múltiples *conceptus*, pero a su vez solo permitir la supervivencia

y el crecimiento de los implantados en los segmentos uterinos caudales debido a la heterogeneidad en toda la extensión del órgano.

CAPÍTULO VI

Conclusiones

Los cuernos uterinos de *L. maximus* sin preñez presentaron:

- Diámetro creciente en sentido craneocaudal según el estudio ultrasonográfico.
- Morfología microscópica similar en toda su extensión.
- Expresión homogénea de glicoconjugados y de residuos glicosídicos específicos a lo largo del órgano.
- Patrón de expresión homogéneo entre los segmentos analizados para marcadores de renovación celular, PCNA y Cas-3, como así también de los receptores hormonales.
- Incrementos significativos en el espesor de la pared uterina y sus tunicas, áreas glandular y vascular, en el sentido craneocaudal.
- Ausencia de variaciones en las alturas de los epitelios luminal y glandular.

Los cuernos uterinos de *L. maximus* con preñez temprana (26 dpc) presentaron:

- Diferencias significativas en largo y ancho tanto en los segmentos uterinos craneal y caudal, como entre los cinco sitios de implantación comprendidos entre dichos segmentos.
- Forma esférica y tonalidad blanquecina en los cinco sitios de implantación.
- Tasa de resorción del 80%.
- Morfología microscópica similar en la implantación intersticial y antimesometrial de cada sitio de implantación.
- Macizo celular interno y tejidos extraembrionarios positivos a RP, PCNA y PK.
- Decidua con marcación positivas para RP, PCNA, VIM y PAS.

- Expresión homogénea de glicoconjugados y de residuos glicosídicos específicos entre los glicocalices de los sitios de implantación.
- Células *uNK* PAS y DBA +, en la luz y el endotelio de los vasos sanguíneos de cada SI.
- Áreas glandular y vascular con valores medios significativamente crecientes desde el sitio de implantación craneal (SI-1) hasta el caudal (SI-5).
- Infiltración linfocitaria, hemorragia y necrosis en los sitios de implantaciones craneales y medios (SI-1, SI-2, SI-3 y SI-4).

Los cuernos uterinos de *L. maximus* con preñez intermedia (46-53 dpc) presentaron:

- Cuatro sitios de implantación con forma esférica, con ausencia y presencia de embrión en los sitios de implantación craneales y medios (SI-1, SI-2 y SI-3) y viable (SI-4), respectivamente, según estudio ultrasonográfico.
- Sitio de implantación caudal (SI-4) con embrión y placenta definidos en el según estudio ultrasonográfico.
- Embrión viable del SI-4 según estudio *Doppler* color y estimación de la actividad cardíaca.
- Morfología macroscópica diferente entre los sitios de implantación debido a una zona necrótica en el sitio donde se localizó el embrión en los SI-1, SI-2 y SI-3.
- Morfología microscópica desorganizada en la placenta en formación y la decidua en los SI-1, SI-2 y SI-3.
- Restos de tejidos extraembrionarios positivos a PK, PCNA y Cas-3 en los SI-1, SI-2 y SI-3.

- SI-1, SI-2 y SI-3 con respuesta inflamatoria estéril con abundante infiltración neutrofílica, hemorragia, macrófagos, mastocitos y células gigantes de cuerpo extraño.
- Células trofoblásticas en apoptosis.
- Capa de fibroblastos, PCNA y VIM +, y fibras colágenas, circunscribiendo a los SI-1, SI-2 y SI-3.
- Embrión del SI-4 con diferentes sistemas de órganos en desarrollo.
- Placenta en desarrollo con una incipiente organización laberíntica y sistema vascular dual (materno-fetal).
- Subplacenta con mesénquima fetal y dos poblaciones trofoblásticas diferenciadas, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto.
- *Decidua basalis y parietalis* PAS+.
- Mesoplacenta uniendo a la implantación a la pared uterina del extremo mesometrial. Esta estructura se describe por primera vez para la especie.

Consideraciones Finales

Desde 1970 a la fecha se continúan investigando ciertas características de la biología reproductiva de la vizcacha, entre ellas, la poliovulación y la muerte embrionaria temprana y espontánea. A partir del año 2000 se realizaron estudios morfológicos y endocrinológicos por parte de los grupos de investigación de la Dra. Alicia Flamini y el Dr. Alfredo Vitullo, respectivamente, con la finalidad de comprender con mayor profundidad la muerte embrionaria de la especie. Los mismo confluyen en que no hay una sola causa que pueda explicar completamente a este evento, y que futuros estudios y a otros niveles de organización serán necesarios para comprenderlo de manera íntegral.

Referencias bibliográficas

1. Abba AM, Barquez RM, Castilla MC, Coda JA, Damino V, Díaz MM, Periago ME, Pia M, Priotto J, Superina M, Tamburini D, Torres R. Categorización. En Torres R, Tamburini D (Eds.), Mamíferos de Córdoba y su estado de conservación. Córdoba: Editorial de la UNC; 2018. pp. 327-330.
2. Absalón-Medina VA, Butler WR, Gilbert RO. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31(4): 393–409.
3. Abbot P, Rokas A. Mammalian pregnancy. *Curr Biol.* 2017; 27(4): R127–R128.
4. Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol.* 2011; 88(2): 112–117.
5. Acuña F, Tano de la Hoz MF, Díaz AO, Portiansky EL, Barbeito CG, Flamini MA. Histochemistry of the zona pellucida of the ovary of a species with natural polyovulation: *Lagostomus maximus* (Rodentia, Hystricomorpha, Chinchillidae). *Reprod Domest Anim.* 2019; 54(2): 207–215.
6. Adnane M, Meade KG, O'Farrelly C. Cervico-vaginal mucus (CVM) - an accessible source of immunologically informative biomolecules. *Vet Res Commun.* 2018; 42(4): 255–263.
7. Alberto ML, Meirelles FV, Perecin F, Ambrósio CE, Favaron PO, Francioli AL, Mess AM, Dos Santos JM, Rici RE, Bertolini M, Miglino MA. Development of bovine embryos derived from reproductive techniques. *Reprod Fert Dev.* 2013; 25(6): 907–917.
8. Aliabadi E, Makoolati Z, Talaei-Khozani T, Mesbah Ardekani F. Stress affects surface glycoconjugates of the rat endometrium at the time of implantation. *Glycoconj J.* 2017; 34(5): 671–677.
9. Annie L, Gurusubramanian G, Roy VK. Estrogen and progesterone dependent expression of visfatin/NAMPT regulates proliferation and apoptosis in mice uterus during estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019; 185: 225–236.
10. Álvarez A, Arévalo RLM, Verzi DH. Diversification patterns and size evolution in caviomorph rodents. *Biol J Linn Soc Lond.* 2017; 121(4): 907–922.
11. Alves BG, Alves KA, Gastal GDA, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. Spatial distribution of preantral follicles in the equine ovary. *PLoS One.* 2018; 13(6): e0198108.
12. Amoroso E. Placentation. In Parkes A (Ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction*. Boston, MA, USA: Little Brown & Co; 1952. pp. 127–311.

13. Anani S, Bhat S, Honma-Yamanaka N, Krawchuk D, Yamanaka Y. Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development*. 2014; 141(14): 2813–2824.
14. Andrabi SM, Maxwell WM. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sc*. 2007; 99, 223–243.
15. Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat Genet*. 2000; 25(3): 311–314.
16. Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J. Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol*. 2005; 288(1): 276–283.
17. Arendt D, Nübler-Jung K. Rearranging gastrulation in the name of yolk: evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs. *Mech Dev*. 1999; 81(1–2): 3–22.
18. Armon L, Eisenbach M. Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28359.
19. Bahr JM. Ovary, Overview. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier. 2018. pp. 3-7.
20. Bai Y Y, Xu LB, Yang ZM. Ulex europeus (UEA-I) binding and hormonal regulation in mouse uterus during early pregnancy, estrous cycle and pseudopregnancy. *Chin J Vet Sci*. 2000; 20(6): 601–604.
21. Baker BC, Heazell AEP, Sibley C, Wright R, Bischof H, Beards F, et al. Hypoxia and oxidative stress induce sterile placental inflammation in vitro. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 7281.
22. Baldock R, Bard J, Davidson DR, Morris-Kay G. Kaufman's Atlas of mouse development supplement. 2015. Elsevier Inc.
23. Barbeito CG. Historia de las placentas y su relación con la morfología. *Rev Cs Morfol*, 2008; 10(2): 1-15.
24. Barbeito C, Woudwyk M, Cacciato C, Soto P, Portiansky E, Catena M, et al. *Tritrichomonas foetus*: experimental infection in pregnant BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 2008; 120(2): 156–160. Barbeito CG, Zanuzzi CN, Gimeno EJ. Introducción a las técnicas de lectinhistoquímica, Curso de técnica de inmunohistoquímica y lectinhistoquímica. FCV-UNLP. 2020.
25. Barbeito CG, Acuña F, Miglino MA, Portiansky EL, Flamini MA. Placentation and embryo death in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Placenta*. 2021; 108: 97–102.

26. Barraza DE, Zampini R, Apichela SA, Pacheco JI, Argañaraz ME. Changes in mucins and matrix metalloproteases in the endometrium of early pregnant alpacas (*Vicugna pacos*). *Acta Histochem.* 2018; 120(5): 438–45.
27. Barraza DE, Zampini R, Apichela SA, Pacheco JI, Argañaraz ME. Modifications of extracellular matrix features in the left and right uterine horns during the embryo pre-implantation period in *Vicugna pacos*. *Theriogenology.* 2020; 157: 440–448.
28. Baron MH, Isern J, Fraser ST. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood.* 2012; 119(21): 4828–37.
29. Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, Ott TL, Bazer FW, Gray CA, et al. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. *J Reprod Fert.* 1999; 54, 287–302.
30. Basavaraja R, Madusanka ST, Drum JN, Shrestha K, Farberov S, Wiltbank MC, et al. Interferon-tau exerts direct prosurvival and antiapoptotic actions in luteinized bovine granulosa cells. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 14682.
31. Bastos HBA, Martinez MN, Camozzato GC, Estradé MJ, Barros E, Vital CE, et al. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. *Theriogenology.* 2019; 125: 224–35.
32. Battlehner CN, Caldini EG, Pereira JCR, Luque EH, Montes GS. How to measure the increase in elastic system fibres in the lamina propria of the uterine cervix of pregnant rats. *J Anat.* 2003; 203(4): 405–18.
33. Bazer FW. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci.* 1975; 41(5): 1376–1382.
34. Bazer FW, Roberts RM, Basha SM, Zavy MT, Caton D, Barron DH. Method for obtaining ovine uterine secretions from unilaterally pregnant ewes. *J Anim Sci.* 1979; 49(6): 1522–1527.
35. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 2009; 138(2), 195–209.
36. Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16(3): 135–52.
37. Bazer FW. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; S3(2): 745–67.
38. Bazer FW, Johnson GA. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation.* 2014; 87(1–2): 52–65.
39. Bazer FW, Wang X, Johnson GA, Wu G. Select nutrients and their effects on conceptus development in mammals. *Anim Nutr.* 2015; 1(3): 85–95.

40. Becher H. Die Entwicklung des Mesoplacentariums und die Placenta bei Aguti (*Dasyprocta azarae* Schl.). Z Anat Entwickl Gesch. 1921a; 61(3–6): 337–364.
41. Becher H. Der feinere Bau die reifen Placenta von Aguti (*Dasyprocta azarae* Schl.). Z Anat EntwGesch. 1921b; 61: 439–454.
42. Behringer RR, Eakin GS, Renfree MB. Mammalian diversity: gametes, embryos and reproduction. Reprod Fertil Dev. 2006; 18(1–2): 99–107.
43. Bell SC. Decidualization: regional differentiation and associated function. In Finn CA (Ed.), Reviews of Reproductive Biology. Oxford, UK: Clarendon Press; 1983. pp. 220–271.
44. Bellofiore N, Ellery SJ, Mamrot J, Walker DW, Temple-Smith P, Dickinson H. First evidence of a menstruating rodent: the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). Am J Obstet Gynecol. 2017; 216(1): 40.e1–40.e11.
45. Berg DK, van Leeuwen J, Beaumont S, Berg M, Pfeffer PL. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. Theriogenology. 2010; 73(2): 250–60.
46. Bezerra FVF, Favaron PO, Mess AM, Araújo Júnior HN, Oliveira GB, Pereira AF, et al. Subplacental development in *Galea spixii*. Pesqui Vet Bras. 2018; 38(11): 2175–2182.
47. Biancardi MF, dos Santos FCA, de Carvalho HF, Sanches BDA, Taboga SR. Female prostate: historical, developmental, and morphological perspectives: Female prostate revisited. Cell Biol Int. 2017; 41(11):1174–1183.
48. Bidarimath M, Tayade C. Pregnancy and spontaneous fetal loss: A pig perspective. Mol Reprod Dev. 2017; 84(9): 856–869.
49. Blackburn DG. Evolution of vertebrate viviparity and specializations for fetal nutrition: A quantitative and qualitative analysis: Viviparity and Fetal Nutrition. J Morphol. 2015; 276(8): 961–990.
50. Blandau RJ. Embryo-endometrial interrelationship in the rat and guinea pig. Anat Rec. 1949; 104(3): 331–359.
51. Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature. 1992; 356(6366): 248–252.
52. Blois S, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA, et al. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the feto-maternal interface in murine pregnancies. J Immunol. 2005; 174(4): 1820–1829.

53. Boiani M, Casser E, Fuellen G, Christians ES. Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: a model under revision. *J Reprod Fertil.* 2019; 158(2): R49–R65.
54. Bolet G. Timing and extent of embryonic mortality in pigs, sheep and goats: Genetic variability. In Sreenan JM, Diskin MG (Eds.), *Embryonic mortality in farm animals*. Dordrecht: Springer; 1986. pp. 12–43.
55. Bonatelli M, Carter AM, Machado MRF, De Oliveira MF, de Lima MC, Miglino MA. Placentation in the paca (*Agouti paca* L). *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3(1): 9.
56. Bouchard S, Zigouris J, Fenton MB. Autumn mating and likely resorption of an embryo by a Hoary Bat, *Lasiurus cinereus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Am Midl Nat.* 2001; 145, 210–212.
57. Branch LC, Villarreal D, Fowler GS. Recruitment, dispersal, and group fusion in a declining population of the Plains vizcacha (*Lagostomus maximus*; Chinchillidae). *J Mammal.* 1993; 74(1): 9–20.
58. Brandt JF. Beiträge zur nahern Kenntniss der Säugethiere Russlands. *Mémoires de l'Académie Impériale des Sciences de Saint Pétersbourg.* 1855; 69, 1-375.
59. Brawand D, Wahli W, Kaessmann H. Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *PLoS Biol.* 2008; 6(3): e63.
60. Breazile JE, Brown EM. Anatomy. In Wagner JE, Manning PJ (Eds.), *The Biology of the Guinea Pig*. New York, NY: Academic Press; 1976. pp. 53–62.
61. Breed WG. Morphological variation in the female reproductive tract of Australian rodents in the genera *Pseudomys* and *Notomys*. *J Reprod Fertil.* 1985; 73(2): 379–84.
62. Brien M-E, Baker B, Duval C, Gaudreault V, Jones RL, Girard S. Alarmins at the maternal-fetal interface: involvement of inflammation in placental dysfunction and pregnancy complications 1. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019; 97(3): 206–212.
63. Brodowska A, Laszczynska M, Starczewski A, Karakiewicz B, Brodowski J. The localization of estrogen receptor alpha and its function in the ovaries of postmenopausal women. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007; 45(4): 325–30.
64. Brüßow K-P, Rátky J, Rodriguez-Martinez H. Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43(2): 245–51.
65. Buechner HK. Unilateral implantation in the Uganda kob. *Nature.* 1961; 190(4777): 738–739.
66. Burge BL. Vaginal casts passed by captive porcupine. *J Mammal.* 1966; 47(4): 713–714.
67. Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta.* 2007; 28 Suppl A: S64-9.

68. Burton GJ, Scioscia M, Rademacher TW. Endometrial secretions: creating a stimulatory microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2011; 89(2): 118–125.
69. Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental origins of chronic disease. *Physiol Rev.* 2016; 96(4): 1509–1565.
70. Burton GJ, Cindrova-Davies T, Turco MY. Review: Histotrophic nutrition and the placental-endometrial dialogue during human early pregnancy. *Placenta.* 2020; 102: 21–26.
71. Bruscia EM, Ziegler EC, Price JE, Weiner S, Egan ME, Krause DS. Engraftment of donor-derived epithelial cells in multiple organs following bone marrow transplantation into newborn mice. *Stem Cells.* 2006; 24(10): 2299–2308.
72. Cambiaggi VL, Terminello Correa JD. Evolución embrionaria del ectodermo: la formación embrionaria del sistema nervioso y la piel. En Zuccolilli G (Ed.), *Embriología sistemática. Desarrollo temprano de los sistemas y los aparatos de los mamíferos domésticos.* EDULP-UNLP; 2020. pp. 65–99.
73. Cameo P, Srisuparp S, Strakova Z, Fazleabas AT. Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2(1): 50.
74. Capellini I. The evolutionary significance of placental interdigitation in mammalian reproduction: contributions from comparative studies. *Placenta.* 2012; 33(10): 763–768.
75. Cardoso R C, West SM, Maia TS, Alves B, Williams GL. Nutritional control of puberty in the bovine female: prenatal and early postnatal regulation of the neuroendocrine system. *Domest Anim Endocrinol.* 2020; 73, 106434.
76. Carlson BM. *Embriología humana y biología del desarrollo.* 5ta edición. Ed. Elsevier: Madrid; 2014.
77. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, et al. Embryo implantation. *Develop Biol.* 2000; 223(2): 217–237.
78. Carter AM, Mess A. Mammalian placentation: implications for animal models, in McManus LM, Mitchell R (Eds.), *Pathobiology of Human Disease.* Elsevier: San Diego; 2014. pp. 2423–2442.
79. Carter AM. Comparative Placentation. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 129–136.
80. Catalini L, Fedder J. Characteristics of the endometrium in menstruating species: lessons learned from the animal kingdom. *Biol Reprod.* 2020; 102(6): 1160–1169.
81. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod.* 2000; 15(2): 199–206.

82. Categorización de los Mamíferos de la Argentina. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible-Argentina y Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM). *Lagostomus maximus*, vizcacha de llanura <https://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/lagostomus-maximus>
83. Chavan AR, Griffith OW, Stadtmauer DJ, Maziarz J, Pavličev M, Fishman R, et al. Evolution of embryo implantation was enabled by the origin of decidual stromal cells in eutherian mammals. *Mol Biol Evol.* 2021; 38(3): 1060–1074.
84. Chavatte-Palmer P, Tarrade A. Placentation in different mammalian species. *Ann Endocrinol.* 2016; 77(2): 67–74.
85. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(12): 826–837.
86. Clark DA, Petitbarat M, Chaouat G. How should data on murine spontaneous abortion rates be expressed and analyzed? Mean or median abortion rate? *Am J Reprod Immunol.* 2008; 60(3): 192–196.
87. Clark GF. Functional glycosylation in the human and mammalian uterus. *Fertil Res Pract.* 2015; 1(1): 17.
88. Clement PB, Cooney TP. Idiopathic multifocal calcification of the ovarian stroma. *Arch Pathol Lab Med.* 1992; 116(2): 204–205.
89. Cobb SP, Watson ED. Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle. *Res Vet Sci.* 1995; 59(3): 238–241.
90. Codón SM, Casanave E B. Comparative morphology of the ovaries of three species of Dasypodidae (Mammalia Xenarthra). *Rev Chil Anat.* 2000; 18(2): 251–257.
91. Collins LR, Eisenberg JF. Notes on the behavior and breeding of pacaranas, *Dynomis branickii*, in captivity. *Int Zoo Yearb.* 1972; 12: 108–114.
92. Conaway CH, Baskett TS, Toll JE. Embryo resorption in the swamp rabbit. *J Wildl Manage.* 1960; 24(2): 197.
93. Cook PS, Spencer TE, Bartol FF, Hayashi K. Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod.* 2013; 19(9): 547–558.
94. Cook PS, Nanjappa MK, Mesa AM. Cell Biology of Uterus. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 298–304.
95. Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, Teixeira NA. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta.* 2004; 25(6): 538–547.

96. Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compernelle V, Maltepe E, Adelman DM, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(23): 10479–10491.
97. Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *J Reprod Fertil.* 2012; 144(6): 649–60.
98. Coy P, Yanagimachi R. The common and species-specific roles of oviductal proteins in mammalian fertilization and embryo development. *Bioscience.* 2015; 65(10): 973–84.
99. Coy Fuster P, Avilés M, Latorre Reviriego R. Fallopian Tube/Oviduct. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 276–281.
100. Creighton C. The formation of the placenta in the guinea-pig. *J Anat Physiol.* 1878; 12(4): 534-590.
101. Critchley HOD, Maybin JA, Armstrong GM, Williams ARW. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation. *Physiol Rev.* 2020; 100(3): 1149–1179.
102. Croy BA, Waterfield A, Wood W, King GJ. Normal murine and porcine embryos recruit NK cells to the uterus. *Cell Immunol.* 1988; 115(2): 471–80.
103. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *J Reprod Fertil.* 2003; 126(2): 149–60.
104. Curley JP, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher R, Miyoshi N, Surani MA, et al. Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene *Peg3*. *FASEB J.* 2005; 19(10): 1302–4.
105. da Costa Ferreira Junior JM. Estudo morfológico da modulação das fibras do sistema elástico induzida por esteróides ováricos na lâmina própria da cuello uterino da rata. Tesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Pablo. Brazil; 1995.
106. de Oliveira GB, de Araújo Júnior HN, da Silva Costa H, Silva AR, de Moura CEB, de Oliveira Rocha HA, et al. Post-implantation development of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Anim Reprod Sci.* 2017; 182: 35–47.
107. Das SK. Regional development of uterine decidualization: molecular signaling by *Hoxa-10*. *Mol Reprod Dev.* 2010; 77(5): 387–396.
108. Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24(2): 55–63.
109. Decreto 297/2020. Aislamiento Social, Preventivo y Obligatorio. Boletín Oficial de la República Argentina.

110. Deng L, Li C, Chen L, Liu Y, Hou R, Zhou X. Research advances on embryonic diapause in mammals. *Anim Reprod Sci.* 2018; 198: 1–10.
111. De Paz P, Sanchez AJ, Fernandez JG, Garcia C, Chamorro CA, Anel L. Ultrastructural localization of lectin receptors in the preimplantation ovine embryo. *Anat Rec.* 1994; 240(4): 537–544.
112. Desmarest AG. Gerboise premiere espèce: la grande gerboise *Dipus maximus* Blainv. *Nou Dict d'Hist Nat.* 18717; 13: 117–119.
113. Deutscher E, Hung-Chang Yao H. Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis. *Dev Biol.* 2007; 307(2):227–36.
114. Dequéant M-L, Glynn E, Gaudenz K, Wahl M, Chen J, Mushegian A, et al. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. *Science.* 2006; 314(5805): 1595–1598.
115. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004; 25(3): 341–373.
116. Dharma SJ, Kholkute SD, Nandedkar TD. Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle. *Indian J Exp Biol.* 2001; 39(3): 218–222.
117. Diessler M, Ventureira M, Hernandez R, Sobarzo C, Casas L, Barbeito C, et al. Differential expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine early placenta. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52(1): 35–43.
118. Dobrzycka B, Kinalski M, Piechocka D, Terlikowski SJ. The role of estrogens in angiogenesis in the female reproductive system. *Endokrynol Pol.* 2009; 60(3): 210–214.
119. Domínguez S, Piezzi RS, Scardapane L, Guzmán JA. A light and electron microscopic study of the pineal gland of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *J Pineal Res.* 1987; 4(2): 211–219.
120. Dorfman VB, Fraunhoffer N, Inserra PIF, Loidl CF, Vitullo AD. Histological characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus of the South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *J Mol Histol.* 2011; 42(4): 311–21.
121. Dorfman VB, Saucedo L, Di Giorgio NP, Inserra PIF, Fraunhoffer N, Leopardo NP, et al. Variation in progesterone receptors and GnRH expression in the hypothalamus of the pregnant South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). *Biol Reprod.* 2013; 89(5): 115.

122. Dorfman VB, Inserra PIF, Leopardo NP, Halperin J, Vitullo AD. The South American plains viscacha, *Lagostomus maximus*, as a valuable animal model for reproductive studies. *JSM Anat Phy*. 2016; 1, 1004.
123. dos Santos AC, Machado BB, Carvalho VD, Gomes VB, de Oliveira MF, Miglino MA, et al. The morphology of female genitalia in *Galea spixii* (Caviidae, Caviinae). *Biosc Journal*. 2014; 30: 1793–1802.
124. dos Santos AC, Oliveira FP, Carvalho VD, Olivotti FA, Oliveira M, Menezes Oliveira SF, et al. Intrauterine development of female genital organs in *Cavia porcellus* (Rodentia: Caviidae). *Pak J Zool*. 2016; 46: 389–397.
125. Ducibella T, Albertini DF, Anderson E, Biggers JD. The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev Biol*. 1975; 45(2): 231–50.
126. Ducibella T, Anderson E. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol*. 1975; 47(1): 45–58.
127. Duval M. La placenta des rongeurs. Le placenta du cochon d'Inde. *J Anat Phy*. 1892; 28: 58–98.
128. Drews B, Ringleb J, Waurich R, Hildebrandt TB, Schröder K, Roellig K. Free blastocyst and implantation stages in the European brown hare: correlation between ultrasound and histological data. *Reprod Fertil Dev*. 2013; 25(6): 866–878.
129. Drews B, Landaverde LF, Kühl A, Drews U. Spontaneous embryo resorption in the mouse is triggered by embryonic apoptosis followed by rapid removal via maternal sterile purulent inflammation. *BMC Dev Biol*. 2020; 20(1): 1.
130. Edelsztein NY, Grinspon RP, Schteingart HF, Rey RA. Anti-Müllerian hormone as a marker of steroid and gonadotropin action in the testis of children and adolescents with disorders of the gonadal axis. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2016; 2016(1): 20.
131. Ehrlich S. Ecological aspects of reproduction in nutria *Myocastor coypus*. *Mammalia*. 1966; 30(1), 142–152
132. El Bizri HR, Monteiro FOB, de Andrade RDS, Valsecchi J, Guimarães DA de A, Mayor P. Embryonic and fetal morphology in the lowland paca (*Cuniculus paca*): A precocial hystricomorph rodent. *Theriogenology*. 2017; 104: 7–17.
133. Elliot MG, Crespi BJ. Phylogenetic evidence for early hemochorial placentation in eutheria. *Placenta*. 2009; 30(11): 949–967.

134. Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 141(4): 408–416.
135. Edwards MJ, Deakin JE. The marsupial pouch: implications for reproductive success and mammalian evolution. *Aust J Zool.* 2012; 61(1): 41–47.
136. Emera D, Romero R, Wagner G. The evolution of menstruation: A new model for genetic assimilation: Explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness. *Bioessays.* 2012; 34(1): 26–35.
137. England GCW, Russo M. Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology.* 2006; 66(6–7): 1694–1698.
138. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31, 387–411.
139. Fabre PH, Hautier L, Dimitrov D, Douzery EJP. A glimpse on the pattern of rodent diversification: a phylogenetic approach. *BMC Evol Biol.* 2012; 12: 88.
140. Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta.* 2017; 56: 44–52.
141. Favaron PO, Carter AM, Ambrósio CE, Morini AC, Mess AM, de Oliveira MF, et al. Placentation in Sigmodontinae: a rodent taxon native to South America. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9(1): 55.
142. Favaron PO, Mess A, Will SE, Maiorka PC, de Oliveira MF, Miglino MA. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from New World mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. *PLoS One.* 2014; 9(2): e95575.
143. Fazleabas AT, Hild-Petito S, Verhage HG. Secretory proteins and growth factors of the baboon (*Papio anubis*) uterus: potential roles in pregnancy. *Cell Biol Int.* 1994; 18(12): 1145–1153.
144. Felipe A, Callejas S, Cabodevila J. Anatomicohistological characteristics of female genital tubular organs of the South American nutria (*Myocastor coypus*). *Anat Histol Embryol.* 1998; 27(4): 245–250.
145. Felipe A, Cabodevila J, Callejas S. Anatomicohistological characteristics of the ovary of the coypu (*Myocastor coypus*). *Anat Histol Embryol.* 1999; 28(2): 89–95.
146. Felipe A, Callejas S, Cabodevila J. Descripción Anatómica e Histológica del Cuello Uterino de *Myocastor coypus* (Coipo). *FAVE.* 2011; 15(1):15–2.
147. Felipe AE, Cabodevila JA, Callejas SS. Morfología de la unión útero-tubárica en *Myocastor coipus* (COIPO). *Rev. Chil. Anat.* 2002; 20(2): 139–144.

148. Ferjentsik Z, Hayashi S, Dale JK, Bessho Y, Herreman A, De Strooper B, et al. Notch is a critical component of the mouse somitogenesis oscillator and is essential for the formation of the somites. *PLoS Genet.* 2009; 5(9): e1000662.
149. Ferner K, Schultz JA, Zeller U. Comparative anatomy of neonates of the three major mammalian groups (monotremes, marsupials, placentals) and implications for the ancestral mammalian neonate morphotype. *J Anat.* 2017; 231(6): 798–822.
150. Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Morphological characterization of the female prostate (Skene's gland or paraurethral gland) of *Lagostomus maximus maximus*. *Ann Anat.* 2002; 184(4): 341–345.
151. Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. *Acta Zool.* 2009; 90(4): 390–400.
152. Flamini MA, Portiansky EL, Favaron PO, Martins DS, Ambrósio CE, Mess AM, et al. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) - a caviomorph rodent with natural polyovulation. *Placenta.* 2011; 32(12): 963–968.
153. Flamini MA, Díaz AO, Barbeito CG, Portiansky EL. Morphology, morphometry, histochemistry and lectin histochemistry of the vagina of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Biotech Histochem.* 2012; 87(2): 81–94.
154. Flamini MA, Barbeito CG, Portiansky EL. A morphological, morphometric and histochemical study of the oviduct in pregnant and non-pregnant females of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Acta Zool.* 2014; 95(2): 186–195.
155. Flamini MA, Barbeito CG, Portiansky EL. Morphological characteristics of the uterus and uterine cervix of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Acta Zool.* 2019; 101(4): 353–365.
156. Flamini MA, Barreto RSN, Matias GSS, Birbrair A, Harumi de Castro Sasahara T, Barbeito CG, et al. Key characteristics of the ovary and uterus for reproduction with particular reference to poly ovulation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*, Chinchillidae). *Theriogenology.* 2020; 142: 184–195.
157. Flamini MA, Barbeito CG, Díaz AO, Portiansky EL. Comparison of the structural and ultrastructural characteristics of the female prostate between pregnant and non-pregnant plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Tissue Cell.* 2021; 68(101458): 101458.
158. Flaws JA, Spencer TE. Female reproduction. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier; 2018. p. 1.

159. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci.* 2001; 6: D1000–D1007.
160. Flores LE, Hildebrandt TB, Kühn AA, Drews B. Early detection and staging of spontaneous embryo resorption by ultrasound biomicroscopy in murine pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014; 12(1): 38.
161. Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O’Herlihy C, O’Farrelly C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium: Endometrial lymphocytes during the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol.* 2000; 43(4): 209–217.
162. Fonseca BM, Almada M, Costa MA, Teixeira NA, Correia-da-Silva G. Rat spontaneous foetal resorption: altered α 2-macroglobulin levels and uNK cell number. *Histochem Cell Biol.* 2014; 142(6): 693–701.
163. Forde N, Lonergan P. Interferon-tau and fertility in ruminants. *J Reprod Fertil.* 2017; 154(5): F33–43.
164. Fortes EA de M, Ferraz MS, Bezerra DO, Júnior AMC, Cabral RM, Sousa F das CA, et al. Prenatal development of the agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831): External features and growth curves. *Anim Reprod Sci.* 2013; 140(3–4): 195–205.
165. Fouladi-Nashta AA, Jones CJP, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, et al. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev Biol.* 2005; 281(1): 1–21.
166. Franco de Oliveira M, Favaron PO, Ambrósio CE, Miglino MA, Mess AM. Chorioallantoic and yolk sac placentation in *Thrichomys laurentinus* (Echimyidae) and the evolution of hystricognath rodents. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2012; 318(1): 13–25.
167. Frankenberg SR, de Barros FRO, Rossant J, Renfree MB. The mammalian blastocyst: The mammalian blastocyst. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016; 5(2): 210–32.
168. Frankenberg S. Pre-gastrula development of non-eutherian mammals. *Curr Top Dev Biol.* 2018; 128: 237–66.
169. Fraunhoffer NA, Jensen F, Leopardo N, Insera PIF, Abuelafia AM, Espinosa MB, et al. Hormonal behavior correlates with follicular recruitment at mid-gestation in the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Gen Comp Endocrinol.* 2017; 250: 162–174.
170. Frum T, Murphy TM, Ralston A. HIPPO signaling resolves embryonic cell fate conflicts during establishment of pluripotency in vivo. *Elife.* 2018; 7.

171. Frum T, Watts JL, Ralston A. TEAD4, YAP1 and WWTR1 prevent the premature onset of pluripotency prior to the 16-cell stage. *Development*. 2019; 146(17): dev179861.
172. Gao F, Bian F, Ma X, Kalinichenko VV, Das SK. Control of regional decidualization in implantation: Role of FoxM1 downstream of Hoxa10 and cyclin D3. *Sci Rep*. 2015; 5(1): 13863.
173. Gaynor LM, Colucci F. Uterine natural killer cells: Functional distinctions and influence on pregnancy in humans and mice. *Front Immunol*. 2017; 8: 467.
174. Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG. Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *J Reprod Fertil*. 1990; 90(2): 395–402.
175. Genneser F. *Histología*. Madrid: Panamericana. 2018.
176. Giacchino M, Inserra PIF, Lange FD, Gariboldi MC, Ferraris SR, Vitullo AD. Endoscopy, histology and electron microscopy analysis of foetal membranes in pregnant South American plains vizcacha reveal unusual excrescences on the yolk sac. *J Mol Histol*. 2018; 49(3): 245–255.
177. Giacchino M, Claver JA, Inserra PI, Lange FD, Gariboldi MC, Ferraris SR, et al. Nutritional deficiency and placenta calcification underlie constitutive, selective embryo loss in pregnant South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Theriogenology*. 2020; 155: 77–87.
178. Gilbert SF, Barresi MJF. *Developmental Biology*. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 2018.
179. Gil E, Forneris M, Domínguez S, Penissi A, Fogal T, Piezzi RS, et al. Morphological and endocrine study of the ovarian interstitial tissue of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anat Rec (Hoboken)*. 2007; 290(7): 788–794.
180. Givens MD, Marley MSD. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*. 2008; 70(3): 270–285.
181. Goad J, Ko Y-A, Kumar M, Syed SM, Tanwar PS. Differential Wnt signaling activity limits epithelial gland development to the anti-mesometrial side of the mouse uterus. *Dev Biol*. 2017; 423(2): 138–151.
182. Gobello C. Pubertad y ciclo estral. En Gobello C (Ed.), *Manual de Fisiología Reproductiva Veterinaria*. FCV-UNLP; 2019. pp. 22-32.
183. Godoy Pieri NC, da Silva Santos PR, Santos Roballo KC, Flamini MA, Barbeito CG, Ambrosio CE, et al. Seasonal variations cause morphological changes and altered spermatogenesis in the testes of viscacha (*Lagostomus maximus*). *Anim Reprod Sci*. 2014; 149(3-4): 316–324.
184. Gopalakrishna A, Khaparde MS. Early development, implantation and amniogenesis in the Indian vampire bat, *Megaderma lyra lyra* (Geoffroy). *Proc. Indian Acad. Sci*. 1978; 87: 91–104.

185. Goldstein IJ, Hayes CE. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1978; 35: 127–340.
186. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Def Res. Part B, Develop Reprod Tox.* 2007; 80(2): 84–97.
187. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020; 20(2): 95–112.
188. Goswami A, Randau M, Polly PD, Weisbecker V, Bennett CV, Hautier L, et al. Do developmental constraints and high integration limit the evolution of the marsupial oral apparatus? *Integr Comp Biol.* 2016; 56(3): 404–415.
189. Graham CE. Cyclic changes in the squamo-columnar junction of the mouse cervix uteri. *Anat Rec.* 1966; 155(2): 251-260.
190. Grant TR. Ornithorhynchidae. In Walton DW, Richardson B J (Eds.), *Fauna of Australia.* Australian Government Publishing Service: Canberra; 1989. pp. 436-450.
191. Graphodatsky AS, Trifonov VA, Stanyon R. The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogenet.* 2011; 4(1): 22.
192. Gray CA, Taylor KM, Ramsey WS, Hill JR, Bazer FW, Bartol FF, et al. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol Reprod.* 2001; 64(6): 1608-1613.
193. Griffith M. *Echidnas.* Pergamon Press: Oxford; 1968.
194. Griffith M. *The biology of Monotremes.* Academic Press: New Yor; 1978.
195. Griffith M. Tachyglossidae. In Walton DW, Richardson BJ (Eds.), *Fauna of Australia.* Australian Government Publishing Service: Canberra; 1989. pp. 407–435.
196. Griffith OW, Chavan AR, Protopapas S, Maziarz J, Romero R, Wagner GP. Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(32): E6566-6575.
197. Griffith OW. Novel tissue interactions support the evolution of placentation. *J Morphol.* 2021; 282(7): 1047-1053.
198. Griffiths K, Hou R, Wang H, Zhang Z, Zhang L, Zhang T, et al. Prolonged transition time between colostrum and mature milk in a bear, the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca.* *R Soc Open Sci.* 2015; 2(10): 150395.

199. Gross SA, Didio LJ. Comparative morphology of the prostate in adult male and female *Praomys (Mastomys) natalensis* studied with electron microscopy. *J Submicrosc Cytol.* 1987; 19(1): 77–84.
200. Guérin P, Ménéz Y. Review: role of tubal environment in preimplantation embryogenesis: application to co-culture assays. *Zygote.* 2011; 19(1): 47–54.
201. Guernsey MW, Chuong EB, Cornelis G, Renfree MB, Baker JC. Molecular conservation of marsupial and eutherian placentation and lactation. *Elife.* 2017; 6: e27450.
202. Gumus E, Bulut HE, Kaloglu C. Cytoskeletal changes in oocytes and early embryos during in vitro fertilization process in mice. *Anat Histol Embryol.* 2010; 39(1): 51–58.
203. Guo B, Duan CC, Wang QY, Yue ZP. Differential expression and regulation of PNA and UEA-1 bindings in rabbit uterus during preimplantation period: PNA and UEA-1 Bindings in Rabbit Uterus. *Microsc Res Tech.* 2013; 76(4): 398–403.
204. Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, et al. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res.* 2012; 349(3): 665-678.
205. Guraya SS, Greenwald GS. A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *Anat Rec.* 1964; 149(3): 411–433.
206. Guzzetta A, Koska M, Rowton M, Sullivan KR, Jacobs-Li J, Kweon J, et al. Hedgehog-FGF signaling axis patterns anterior mesoderm during gastrulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117(27): 15712–15723.
207. Hafez ESE. Female reproductive organs. In ESE Hafez (Ed.), *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals.* Philadelphia, PA: Lea and Febiger; 1970. pp. 74–106.
208. Hafez B, Hafez E. Anatomy of Female Reproduction. In Hafez B, Hafez E (Eds.), *Reproduction in Farm Animals.* Lippincott Williams & Wilkins; 2016.
209. Halperin J, Dorfman VB, Fraunhoffer N, Vitullo AD. Estradiol, progesterone and prolactin modulate mammary gland morphogenesis in adult female plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *J Mol Histol.* 2013; 44(3): 299–310.
210. Hansen JM, Harris C. Glutathione during embryonic development. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(8): 1527–1542.
211. Harman MT, Prickett M. The development of the external form of the guinea-pig (*Cavia cobaya*) between the ages of eleven days and twenty days of gestation. *Am J Anat.* 1932; 49(3): 351-378.

212. Hautier L, Lebrun R, Saksiri S, Michaux J, Vianey-Liaud M, Marivaux L. Hystricognathy vs Sciurognathy in the rodent jaw: a new morphometric assessment of hystricognathy applied to the living fossil *Laonastes* (Diatomyidae). *PLoS One*. 2011; 6(4): e18698.
213. Hayssen V, Orr TJ. *Reproduction in mammals: The female perspective*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press; 2017.
214. Hedrick BP, Dickson BV, Dumont ER, Pierce SE. The evolutionary diversity of locomotor innovation in rodents is not linked to proximal limb morphology. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 717.
215. Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 2(1): 58.
216. Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78(2): 337–342.
217. Hillemann HH, Gaynor AI, Stanley HP. The genital systems of nutria (*Myocastor coypus*). *Anat Rec*. 1958; 130(3): 515–531.
218. Hillemann HH, Gaynor AI. The definitive architecture of the placentae of nutria, *Myocastor coypus* (Molina). *Am J Anat*. 1961; 109(3): 299–317.
219. Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS. Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology*. 1998; 139(1): 266–71.
220. Holt WV, Johnston S. Mammalian Reproduction Overview. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press: Elsevier, 2018. pp. 486–494.
221. Huchon D, Douzery EJ. From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. *Mol Phylogenet Evol*. 2001; 20(2): 238–251.
222. Ibsen HL. Prenatal growth in guinea-pigs with special reference to environmental factors affecting weight at birth. *J Exp Zool*. 1928; 51(1): 51–93.
223. Iizuka-Kogo A, Ishidao T, Akiyama T, Senda T. Abnormal development of urogenital organs in *Dlgh1*-deficient mice. *Development*. 2007; 134(9): 1799–1807.
224. Infostat-software estadístico. InfoStat, <http://www.infostat.com.ar/?lang=en>. Universidad Nacional de Córdoba.
225. Inomata T, Ninomiya H, Somiya H, Saito H, Mochizuki K. Histological observation on the female prostate in *Mongolian gerbils* (*Meriones unguiculatus*). *Jikken Dobutsu*. 1992; 41(3): 383–386.

226. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 2005; 434(7030): 234–238.
227. Inserra PIF, Leopardo NP, Willis MA, Freysselinard AL, Vitullo AD. 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*. 2014; 147(2): 199-209.
228. Inserra PIF, Charif SE, Di Giorgio NP, Saucedo L, Schmidt AR, Fraunhoffer N, et al. ERα and GnRH co-localize in the hypothalamic neurons of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *J Mol Histol*. 2017; 48(3): 259–273.
229. Inserra PIF, Charif SE, Fidel V, Giacchino M, Schmidt AR, Villarreal FM, et al. The key action of estradiol and progesterone enables GnRH delivery during gestation in the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020; 200(105627): 105627.
230. Ishmael J. Occurrence of calcium deposits in the ovaries of the baboon. *Lab Anim*. 1975; 9(4): 383–6.
231. Jackson JE, Branch LC, Villarreal D. *Lagostomus maximus*. *Mamm Species*. 1966; 543: 1–6.
232. Jackson JE. Reproductive parameters of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in San Luis Province, Argentina. *Vid Sil Neo*. 1989; 2: 57–62.
233. Janot M, Cortes-Dubly M-L, Rodriguez S, Huynh-Do U. Bilateral uterine vessel ligation as a model of intrauterine growth restriction in mice. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014; 12(1): 62.
234. Jensen F, Willis MA, Albamonte MS, Espinosa MB, Vitullo AD. Naturally suppressed apoptosis prevents follicular atresia and oocyte reserve decline in the adult ovary of *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *J Reprod Fertil*. 2006; 132(2): 301–308.
235. Jensen F, Willis MA, Leopardo NP, Espinosa MB, Vitullo AD. The ovary of the gestating South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*): suppressed apoptosis and corpora lutea persistence. *Biol Reprod*. 2008; 79(2): 240–246.
236. Jones CJ, Ortíz ME, Croxatto HB, Manzur A, Slevin G, Aplin JD. Muc1 and glycan expression in the oviduct and endometrium of a New World monkey, *Cebus apella*. *Biol Reprod*. 2001; 64(5): 1535-1544.
237. Jones CJP, Skepper JN, Renfree MB, Aplin JD. Trophoblast specialisations during pregnancy in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*: a morphological and lectin histochemical study. *Placenta*. 2014; 35(7): 467-475.

238. Jones CJP, Allen WRT, Wilsher S. A preliminary study of the heterogeneity in endometrial morphology and glycosylation in the uterine horns of the non-pregnant impala (*Aepyceros melampus*). *Anim Reprod Sci.* 2019; 204: 66-75.
239. Joshi AA, Vaidya SS, St-Pierre MV, Mikheev AM, Desino KE, Nyandege AN, et al. Placental ABC transporters: Biological impact and pharmaceutical significance. *Pharm Res.* 2016; 33(12): 2847–2878.
240. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Pathology of domestic animals.* 6th ed. Saunders Ltd: Canada; 2015.
241. Kaislasuo J, Simpson S, Petersen JF, Peng G, Aldo P, Lokkegaard E, et al. IL-10 to TNF α ratios throughout early first trimester can discriminate healthy pregnancies from pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol.* 2020; 83(1): e13195.
242. Kamat MM, Vasudevan S, Maalouf SA, Townson DH, Pate JL, Ott TL. Changes in myeloid lineage cells in the uterus and peripheral blood of dairy heifers during early pregnancy. *Biol Reprod.* 2016; 95(3): 68.
243. Kanashiro C, Santos TC, Miglino MA, Mess AM, Carter AM. Growth and development of the placenta in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7(1): 57.
244. Kane MT, Morgan PM, Coonan C. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update.* 1997; 3(2): 137–157.
245. Kaloglu C, Bulut HE. Vascular endothelial growth factor production by rat granulated metrial gland cells and their morphological features in normal and pathological conditions. *Reprod Fertil Dev.* 2007; 19(2): 341–350.
246. Kaulenas A, Parkington HC, Coleman HA. Response of the rat myometrium to phenylephrine in early pregnancy and the effects of 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol.* 1991; 103(2): 1429–1434.
247. Kelleher AM, Milano-Foster J, Behura SK, Spencer TE. Uterine glands coordinate on-time embryo implantation and impact endometrial decidualization for pregnancy success. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 2435.
248. Kelleher AM, DeMayo FJ, Spencer TE. Uterine glands: Developmental biology and functional roles in pregnancy. *Endocr Rev.* 2019; 40(5): 1424–1445.
249. Khoza T, Hosie M. Clomiphene citrate modulates the expression of endometrial carbohydrates (especially N-acetyl-d-glucosamine and sialic acid) in pseudopregnant rats. *Theriogenology.* 2008; 70(4): 612–621.

250. Kin K, Maziarz J, Chavan AR, Kamat M, Vasudevan S, Birt A, et al. The transcriptomic evolution of mammalian pregnancy: Gene expression innovations in endometrial stromal fibroblasts. *Genome Biol Evol.* 2016; 8(8): 2459–2473.
251. Kim S-M, Kim J-S. A review of mechanisms of implantation. *Balsaengwa Saengsig.* 2017; 21(4): 351–359.
252. Kleiman DG. Patterns of behaviour in hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond.* 1974, 34: 171–208.
253. Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science.* 2003; 301(5631): 331–333.
254. Knapczyk K, Duda M, Durlej M, Galas J, Kozirowski M, Slomczynska M. Expression of estrogen receptor alpha (ERalpha) and estrogen receptor beta (ERbeta) in the ovarian follicles and corpora lutea of pregnant swine. *Domest Anim Endocrinol.* 2008; 35(2): 170–179.
255. Knapczyk-Stwora K, Durlej M, Duda M, Czernichowska-Ferreira K, Tabecka-Lonczynska A, Slomczynska M. Expression of oestrogen receptor α and oestrogen receptor β in the uterus of the pregnant swine: Oestrogen receptors in the pregnant porcine uterus. *Reprod Domest Anim.* 2011; 46(1): 1–7.
256. Knott JG, Paul S. Transcriptional regulators of the trophoblast lineage in mammals with hemochorial placentation. *J Reprod Fertil.* 2014; 148(6): R121-136.
257. Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(12): 969–980.
258. Kobayashi R, Terakawa J, Kato Y, Azimi S, Inoue N, Ohmori Y, et al. The contribution of leukemia inhibitory factor (LIF) for embryo implantation differs among strains of mice. *Immunobiology.* 2014; 219(7): 512–521.
259. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders: Tlrs and pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(6): 587–600.
260. Köning HE Liebich HG. Anatomía de los animales domésticos. Tomo 2, capítulo 11 Órganos genitales femeninos. 2da ed. 2011 Médica Panamericana
261. Krmptotic CM, Nishida F, Galliari FC, Pombo MT, Acuña F, Barbeito CG, et al. The dorsal integument of the southern long-nosed armadillo *Dasypus hybridus* (Cingulata, Xenarthra), and a possible neural crest origin of the osteoderms. Discussing evolutive consequences for amniota. *J Mamm Evol.* 2021.

262. Lai MD, Lee LR, Cheng KS, Wing LY. Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *J Endocrinol.* 2000; 166(1): 87–93.
263. Lappas M. NOD1 and NOD2 regulate proinflammatory and prolabor mediators in human fetal membranes and myometrium via nuclear factor-kappa B. *Biol Reprod.* 2013; 89(1): 14.
264. Lee SY, Mossman HW, Mossman AS, del Pino G. Evidence of a specific nidation site in ruminants. *Am J Anat.* 1977; 150(4): 631–639.
265. Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *J Reprod Fertil.* 2004; 128(6): 679–695.
266. Lee KY, Jeong J-W, Wang J, Ma L, Martin JF, Tsai SY, et al. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(15): 5468–5478.
267. Leemans B, Stout TAE, De Schauwer C, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, et al. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *J Reprod Fertil.* 2019; 157(5): R181–197.
268. Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *J Reprod Fertil.* 2001; 121(3): 339–346.
269. Leitner M, Aurich JE, Galabova G, Aurich C, Walter I. Lectin binding patterns in normal canine endometrium and in bitches with pyometra and cystic endometrial hyperplasia. *Histol Histopathol.* 2003; 18(3): 787–795.
270. Leonard S, Murrant C, Tayade C, van den Heuvel M, Watering R, Croy BA. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification -- facts and hypotheses -- a review. *Placenta.* 2006; 27 Suppl A: S40–46.
271. Leopardo NP, Vitullo AD. Early embryonic development and spatiotemporal localization of mammalian primordial germ cell-associated proteins in the basal rodent *Lagostomus maximus*. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 594.
272. Leopardo NP, Velazquez ME, Cortasa S, González CR, Vitullo AD. A dual death/survival role of autophagy in the adult ovary of *Lagostomus maximus* (Mammalia- Rodentia). *PLoS One.* 2020; 15(5): e0232819.
273. Lev R, Spicer SS. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low ph. *J Histochem Cytochem.* 1964; 12(4): 309.
274. Levine JE, Hadley ME. Pituitary hormones. In Hadley, ME, Levine JE (Eds.), *Endocrinology*. New York, NY: Benjamin Cummings; 2007. p. 93.

275. Li Q, Roa A, Clarke IJ, Smith JT. Seasonal variation in the gonadotropin-releasing hormone response to kisspeptin in sheep: possible kisspeptin regulation of the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology*. 2012; 96(3): 212–21.
276. Li S, Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol*. 2017; 232(1): R1–26
277. Linton NF, Wessels JM, Cnossen SA, van den Heuvel MJ, Croy BA, Tayade C. Angiogenic DC-SIGN(+) cells are present at the attachment sites of epitheliochorial placentae. *Immunol Cell Biol*. 2010; 88(1): 63–71.
278. Llanos AC, Crespo JA. Ecología de la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus* Blainv.) en el nordeste de la Provincia de Entre Ríos. *Rev Invest Ag*. 1952; 6, 289–378.
279. Lopez Merlo M, Faya M, Priotto M, Barbeito C, Gobello C. Development and proliferation of feline endometrial glands from fetal life to ovarian cyclicity. *Theriogenology*. 2017; 99: 119–23.
280. Loskutoff NM, Raphael BL, Nemeč LA, Wolfe BA, Howard JG, Kraemer DC. Reproductive anatomy, manipulation of ovarian activity and non-surgical embryo recovery in suni (*Neotragus moschatus zuluensis*). *J Reprod Fertil*. 1990; 88(2): 521–32.
281. Losordo DW, Isner JM. Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(1): 6–12.
282. Luckett WP, Hartenberger JL. Monophyly or polyphyly of the order Rodentia: Possible conflict between morphological and molecular interpretations. *J Mamm Evol*. 1993; 1(2): 127–147.
283. Lynch VJ, Roth JJ, Takahashi K, Dunn CW, Nonaka DF, Stopper GF, et al. Adaptive evolution of HoxA-11 and HoxA-13 at the origin of the uterus in mammals. *Proc Biol Sci*. 2004; 271(1554): 2201–2207.
284. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser BCJM. Conception to ongoing pregnancy: the «black box» of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*. 2002; 8(4): 333–343.
285. Madeja ZE, Sosnowski J, Hryniewicz K, Warzych E, Pawlak P, Rozwadowska N, et al. Changes in sub-cellular localisation of trophoblast and inner cell mass specific transcription factors during bovine preimplantation development. *BMC Dev Biol*. 2013; 13: 32.
286. Marcela SG, Cristina RMM, Angel PGM, Manuel AM, Sofia D-C, Patricia DLR-S, et al. Chronological and morphological study of heart development in the rat. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012; 295(8): 1267–1290.
287. Marikawa Y, Alarcón VB. Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev*. 2009; 76(11): 1019–1032.

288. Martin RD. Evolution of placentation in primates: Implications of mammalian phylogeny. *Evol Biol.* 2008; 35(2): 125–145.
289. Massé J, Watrin T, Laurent A, Deschamps S, Guerrier D, Pellerin I. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. *Int J Dev Biol.* 2009; 53(2-3): 411–424.
290. Mate KE, Harris MS, Rodger JC. Fertilization in Monotreme, Marsupial and Eutherian Mammals. In Tarín JJ, Cano A (Eds.), *Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals*. Springer: Berlin; 2000. pp. 223-275.
291. MacLaughlin DT, Teixeira J, Donahoe PK. Perspective: reproductive tract development--new discoveries and future directions. *Endocrinology.* 2001; 142(6): 2167–2172.
292. Major AT, Estermann MA, Roly ZY, Smith CA. An evo-devo perspective of the female reproductive tract. *Biol Reprod.* 2021; ioa166, Advance online publication.
293. Maybin JA, Critchley HOD. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Hum Reprod Update.* 2015; 21(6): 748–761.
294. Mayor P, López-Béjar M, Jori F, Rutllant J, López-Plana C, López-Gatius F. Anatomicohistological characteristics of the genital tubular organs of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. *Anat Histol Embryol.* 2002; 31(6): 355–361.
295. Mayor P, López-Béjar M, Jori F, Fenech M, López-Gatius F. Reproductive functional anatomy and oestrous cycle pattern of the female brush-tailed porcupine (*Atherurus africanus*, Gray 1842) from Gabon. *Anim Reprod Sci.* 2003; 77(3-4): 247–259.
296. Mayor P, Bodmer RE, Lopez-Bejar M. Functional anatomy of the female genital organs of the wild black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) female in the Peruvian Amazon. *Anim Reprod Sci.* 2011; 123(3-4): 249–257.
297. McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT. *Veterinary embryology*. 1st Ed. Blackwell Publishing: Oxford; 2006.
298. McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT. *Veterinary embryology*. 2nd Ed. Blackwell Publishing: Oxford; 2017.
299. McGowen MR, Erez O, Romero R, Wildman DE. The evolution of embryo implantation. *Int J Dev Biol.* 2014; 58(2-4): 155–161.
300. McLaren A, Michie D. Superregnancy in the mouse. *J Exp Biol.* 1959; 36(2): 281–284.
301. McManus JFA. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 1948; 23(3): 99–108.

302. McNatty KP, Smith P, Moore LG, Reader K, Lun S, Hanrahan JP, et al. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 234(1-2): 57–66.
303. Meeusen E, Fox A, Brandon M, Lee CS. Activation of uterine intraepithelial gamma delta T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. *Eur J Immunol*. 1993; 23(5): 1112–1127.
304. Meeusen EN, Bischof RJ, Lee CS. Comparative T-cell responses during pregnancy in large animals and humans. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 46(2): 169–179.
305. Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*. 1994; 120(10): 2749–2771.
306. Mendelson CR, Gao L, Montalbano AP. Multifactorial regulation of myometrial contractility during pregnancy and parturition. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 714.
307. Mendoza G, Echevarría L, Llerena C, Castro A, Domínguez M, Gómez S, et al. Comparación morfológica entre el útero fetal y el útero adulto de la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*). *Salud Tecnol Vet*. 2014; 1(1): 1.
308. Meyer AE, Pfeiffer CA, Brooks KE, Spate LD, Benne JA, Cecil R, et al. New perspective on conceptus estrogens in maternal recognition and pregnancy establishment in the pig[†]. *Biol Reprod*. 2019; 101(1), 148–161.
309. Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martín JC, Remohí J, et al. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod*. 2001; 64(2): 590–601.
310. Mess A. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in rodentia with special reference to hystricognath species. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2003; 299(1): 78–98.
311. Mess A. The subplacenta in *Octodon degus* and *Petromus typicus*--two hystricognath rodents without significant placental lobulation. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2007; 308(2): 172–188.
312. Mess A, Carter AM. Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007; 148(4): 769–779.
313. Miglino MA, Carter AM, dos Santos Ferraz RH, Fernandes Machado MR. Placentation in the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), Agouti (*Dasyprocta aguti*) and paca (*Agouti paca*). *Placenta*. 2002; 23(5): 416–428.
314. Miglino MA, Carter AM, Ambrosio CE, Bonatelli M, De Oliveira MF, Dos Santos Ferraz RH, et al. Vascular organization of the hystricomorph placenta: a comparative study in the agouti, capybara, guinea pig, paca and rock cavy. *Placenta*. 2004; 25(5): 438–448.

315. Miglino MA, de Sá Schiavo Matias G, Rigoglio NN, Borghesi J, de Castro Sasahara TH, del Portal MJ, et al. The comparative aspects of hystricomorph subplacenta: potential endocrine organ. *BMC Zool.* 2021; 6(1): 16. –
316. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17(8): 469–682.
317. Moreno I, Franasiak JM. Endometrial microbiota—new player in town. *Fertil Steril.* 2017; 108(1): 32–39.
318. Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B. Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum Reprod.* 2010; 25(5): 1127–1136.
319. Moser G, Orendi K, Gauster M, Siwetz M, Helige C, Huppertz B. The art of identification of extravillous trophoblast. *Placenta.* 2011; 32(2): 197–199.
320. Moser G, Weiss G, Gauster M, Sundl M, Huppertz B. Evidence from the very beginning: endoglandular trophoblasts penetrate and replace uterine glands in situ and in vitro. *Hum Reprod.* 2015; 30(12): 2747–2757.
321. Moser G, Huppertz B. Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking. *Placenta.* 2017; 56: 19–26.
322. Moser G, Weiss G, Sundl M, Gauster M, Siwetz M, Lang-Olip I, et al. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: evidence for the invasion of uterine veins. *Histochem Cell Biol.* 2017; 147(3): 353–366.
323. Mossman HW. The comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contrib Embryol.* 1937, 26: 129.
324. Mossman AS, Mossman HW. Ovulation, implantation, and fetal sex ratio in impala. *Science.* 1962; 137(3533): 869.
325. Mossman HW. Classics revisited: Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta.* 1991 ;12(1): 1–5.
326. Mouguelar H, Díaz T, Borghi D, Quinteros R, Bonino F, Apichela SA, et al. Morphometric study of the mare oviductal mucosa at different reproductive stages: Morphometric study of the mare oviductal mucosa. *Anat Rec (Hoboken).* 2015; 298(11): 1950–1959.
327. Mueller A, Siemer J, Schreiner S, Koesztner H, Hoffmann I, Binder H, et al. Role of estrogen and progesterone in the regulation of uterine peristalsis: results from perfused non-pregnant swine uteri. *Hum Reprod.* 2006; 21(7): 1863–1868.

328. Mullen RD, Behringer RR. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sex Dev.* 2014; 8(5): 281–296.
329. Murphy CR. Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Res.* 2004; 14(4): 259–267.
330. Murphy BD. Embryonic diapause: advances in understanding the enigma of seasonal delayed implantation. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47 Suppl 6: 121–124.
331. Musser GG, Carleton MD. Superfamily Muroidea in Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. In Wilson DE, Reeder DM (Eds.), *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore, MD: Johns Hopkins Univ. Press; 2005. pp. 984-1531.
332. Nadeau-Vallée M, Obari D, Palacios J, Brien M-È, Duval C, Chemtob S, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *J Reprod Fertil.* 2016; 152(6): R277–292.
333. Nakashima A, Shima T, Tsuda S, Aoki A, Kawaguchi M, Yoneda S, et al. Disruption of placental homeostasis leads to preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(9): 3298.
334. Navarro VM, Kaiser UB. Metabolic influences on neuroendocrine regulation of reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013; 20(4): 335–341.
335. Neitzke U, Harder T, Schellong K, Melchior K, Ziska T, Rodekamp E, et al. Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal of the experimental evidence. *Placenta.* 2008; 29(3): 246–254.
336. Newson RM. Reproduction in the Ferral coypu (*Myocastor coypu*). *Symp Zool Soc Lond.* 1966; 15, 323–334.
337. Niklaus AL, Murphy CR, Lopata A. Ultrastructural studies of glycan changes in the apical surface of the uterine epithelium during pre-ovulatory and and pre-implantation stages in the marmoset monkey. *Anat Rec.* 1999; 255(3):241-51.
338. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, et al. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev.* 2008; 125(3-4): 270–283.
339. Nishioka N, Inoue K-I, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, et al. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev Cell.* 2009; 16(3): 398–410.
340. Oback B, McLean Z. Inner Cell Mass Development. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 332–340.

341. Okabe M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*. 2013; 140(22): 4471–4479.
342. Oliveira MF, Carter AM, Bonatelli M, Ambrosio CE, Miglino MA. Placentation in the rock cavy, *Kerodon rupestris* (Wied). *Placenta*. 2006; 27(1): 87–97.
343. Oliveira MF, Mess A, Ambrósio CE, Dantas CAG, Favaron PO, Miglino MA. Chorioallantoic placentation in *Galea spixii* (Rodentia, Caviomorpha, Caviidae). *Reprod Biol Endocrinol*. 2008; 6(1): 39.
344. Oliveira LJ, Hansen PJ. Phenotypic characterization of macrophages in the endometrium of the pregnant cow: Endometrial macrophages in the cow. *Am J Reprod Immunol*. 2009; 62(6): 418–426.
345. Oliveira LJ, Mansourri-Attia N, Fahey AG, Browne J, Forde N, Roche JF, et al. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. *PLoS One*. 2013; 8(10): e75571.
346. Oliveira VC, Mançanares CAF, Oliveira LJ, Gonçalves NJN, Miglino MA, Perecin F, et al. Characterization of putative haematopoietic cells from bovine yolk sac. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(4): 1132–1140.
347. Öner H, Öner J, Demir R. Distributions of PCNA and Cas-3 in rat uterus during early pregnancy. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010; 48(1): 71–77.
348. Ortega-Pacheco A, Rodriguez-Buenfil JC, Segura-Correa JC, Montes de Oca-González AR, Jiménez-Coello M. Prevalence of fetal resorption in stray dogs in Yucatan, Mexico. *J Small Anim Pract*. 2006; 47(5): 266–269.
349. Ortega-Pacheco A, Segura-Correa JC, Jimenez-Coello M, Linde Forsberg C. Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology*. 2007; 67(2): 382–390.
350. Padmanabhan V, Puttabyatappa M, Cardoso RC. Hypothalamus–Pituitary–Ovary Axis. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 121–129.
351. Paccola CC, Resende GC, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revised: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod*. 2013; 10(4): 677–683.
352. Parent A-S, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon J-P. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev*. 2003; 24(5): 668–693.

353. Parast MM, Yu H, Ciric A, Salata MW, Davis V, Milstone DS. PPARgamma regulates trophoblast proliferation and promotes labyrinthine trilineage differentiation. *PLoS One*. 2009; 4(11): e8055.
354. Pavličev M, Wagner GP, Chavan AR, Owens K, Maziarz J, Dunn-Fletcher C, et al. Single-cell transcriptomics of the human placenta: inferring the cell communication network of the maternal-fetal interface. *Genome Res*. 2017; 27(3): 349–361.
355. Paulson EE, Comizzoli P. Endometrial receptivity and embryo implantation in carnivores-commonalities and differences with other mammalian species. *Biol Reprod*. 2021; 104(4): 771–783.
356. Pawlina W. *Ross-Histología. Texto y atlas. Correlación con biología celular y molecular*. 7th Ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2015.
357. Pearson OP. Reproduction of a South American rodent, the mountain viscacha. *Am J Anat*. 1949; 84(1): 143–173.
358. Pfeffer PL. Building principles for constructing a mammalian blastocyst embryo. *Biology (Basel)*. 2018; 7(3): 41.
359. Pieri N, Souza AF, Casals JB, Roballo K, Ambrósio CE, Martins DS. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. *Reprod Domest Anim*. 2015; 50(4): 625–631.
360. Portiansky EL. *Análisis multidimensional de imágenes digitales*. 1st Ed. UNLP; 2013.
361. Posfai E, Petropoulos S, de Barros FRO, Schell JP, Jurisica I, Sandberg R, et al. Position- and Hippo signaling-dependent plasticity during lineage segregation in the early mouse embryo. *Elife*. 2017; 6: e22906.
362. Proietto S, Cortasa SA, Corso MC, Insera PIF, Charif SE, Schmidt AR, et al. Prolactin Is a Strong Candidate for the Regulation of Luteal Steroidogenesis in Vizcachas (*Lagostomus maximus*). *Int J Endocrinol*. 2018; 2018: 1–14.
363. Proietto S, Yankelevich L, Villarreal FM, Insera PIF, Charif SE, Schmidt AR, et al. Pituitary estrogen receptor alpha is involved in luteinizing hormone pulsatility at mid-gestation in the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Gen Comp Endocrinol*. 2019; 273: 40–51.
364. Psychoyos A. Endocrine control of egg-implantation. In Greep O, Astwood EB (Eds.), *Handbook of Physiology, Endocrinology*. American Physiological Society: Washington DC; 1973. pp. 187-215.
365. Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*. 2009; 15(2): 229–236.

366. Raheem KA. Cytokines, growth factors and macromolecules as mediators of implantation in mammalian species. *Int J Vet Sci Med.* 2018; 6(Suppl): S6–14.
367. Ralston A, Rossant J. *Cdx2* acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoblast fate in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 2008; 313(2): 614–629.
368. Rasia LL, Candela AM, Cañón C. Comprehensive total evidence phylogeny of chinchillids (Rodentia, Caviomorpha): Cheek teeth anatomy and evolution. *J Anat.* 2021; 239(2): 405–423.
369. Rasweiler JJ 4th. Implantation, development of the fetal membranes, and placentation in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *Am J Anat.* 1990; 187(2): 109–136.
370. Rasweiler JJ 4th. Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*. *Am J Anat.* 1991; 191(1): 1–22.
371. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004; 114(6): 744–754.
372. Reima I, Lehtonen E, Virtanen I, Fléchon J-E. The cytoskeleton and associated proteins during cleavage, compaction and blastocyst differentiation in the pig. *Differentiation.* 1993; 54(1): 35–45.
373. Renfree M, Shaw G. Reproduction in Monotremes and Marsupials. *Encyclopedia of Life Sciences.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2001. pp. 1-5.
374. Renfree MB, Fenelon JC. The enigma of embryonic diapause. *Development.* 2017; 144(18): 3199–3210.
375. Rexroad CE Jr, Guthrie HD. Alpha-adrenergic receptors in myometrium of pregnant and nonpregnant pigs until day 19 postestrus. *Biol Reprod.* 1983; 29(3): 615–619.
376. Risk M, Gibori G. Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. In Horseman ND (Ed.), *Prolactin.* Kluwer Academic, New York, USA; 2001. pp. 265–295.
377. Roberts CM, Weir BJ. Implantation in the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *J Reprod Fertil.* 1973; 33(2): 299–307.
378. Roberts CM. The embryology of certain hystricomorph rodents. Ph.D. Thesis, University of London. 1973.
379. Roberts CM, Perry JS. Hystricomorph embryology. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 1974, 34: 333–360.
380. Roberts RM, Green JA, Schulz LC. The evolution of the placenta. *J Reprod Fertil.* 2016; 152(5): R179–189.

381. Rodger FE, Fraser HM, Duncan WC, Illingworth PJ. Immunolocalization of bcl-2 in the human corpus luteum. *Hum Reprod.* 1995; 10(6): 1566–1570.
382. Rodrigues RF, Carter AM, Ambrosio CE, dos Santos TC, Miglino MA. The subplacenta of the red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* L). *Reprod Biol Endocrinol.* 2006; 4(1): 31.
383. Roly ZY, Backhouse B, Cutting A, Tan TY, Sinclair AH, Ayers KL, et al. The cell biology and molecular genetics of Müllerian duct development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2018; 7(3): e310.
384. Rood JP, Weir BJ. Reproduction in female wild guinea-pigs. *J Reprod Fertil.* 1970; 23(3): 393–409.
385. Rose B, Firth M, Morris B, Nicholson C, Verheyen K, Wathes DC, et al. Incidence and risk factors associated with early pregnancy loss in thoroughbreds. *Equine Vet J.* 2014; 46: 16–16.
386. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB, et al. Increased bax and interleukin-1beta-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biol Reprod.* 1997; 56(1): 186–193.
387. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 2017; 18(1): 529.
388. Salamonsen LA, Edgell T, Rombauts LJF, Stephens AN, Robertson DM, Rainczuk A, et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril.* 2013; 99(4): 1086–1092.
389. Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM. Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat.* 1979; 156(1): 15–35.
390. Sansom GS, Hill JP. Observations on the structure and mode of implantation of the blastocyst of *Cavia*. *Trans Zool Soc Lond.* 2010; 21(3): 295–354.
391. Santelices Iglesias OA. Caracterización de sarcomas felinos en sitios de inoculación vacunal en la República Argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 2019.
392. Sato T, Fukazawa Y, Kojima H, Enari M, Iguchi T, Ohta Y. Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anat Rec.* 1997; 248(1): 76–83.
393. Saunders PTK. Does estrogen receptor beta play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16(5): 222–227.
394. Schimming BC, Cesario MD, Matheus SMM. Morphology of the vaginal complex in the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): Gross anatomy and light microscopy. *Anat Histol Embryol.* 2018; 47(6): 566–572.

395. Schroeder K, Drews B, Roellig K, Menzies BR, Goeritz F, Hildebrandt TB. In vivo tissue sampling of embryonic resorption sites using ultrasound guided biopsy. *Theriogenology*. 2011; 76(4): 778–784.
396. Schroeder K, Drews B, Roellig K, Goeritz F, Hildebrandt TB. Embryonic resorption in context to intragestational corpus luteum regression: a longitudinal ultrasonographic study in the European brown hare (*Lepus europaeus* PALLAS, 1778). *Theriogenology*. 2013; 80(5): 479–486.
397. Segerson EC, Beetham PK. Immunosuppressive macromolecules of endometrial and conceptus origins in livestock species. *J Reprod Immunol*. 2000; 48(1): 27–46.
398. Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol*. 2016; 75(3): 341–350.
399. Shehata R. Female prostate in the house rat *Rattus rattus*. *Acta Anat (Basel)*. 1972; 83(3): 426–434.
400. Shehata R. Female prostate in *Arvicanthis niloticus* and *Meriones libycus*. *Acta Anat (Basel)*. 1975; 92(4): 513–523.
401. Shehata R. Female prostate and urethral glands in the home rat, *Rattus norvegicus*. *Acta Anat (Basel)*. 1980; 107(3): 286–288.
402. Simmen RC, Simmen FA. Regulation of uterine and conceptus secretory activity in the pig. *J Reprod Fertil Suppl*. 1990; 40: 279–292.
403. Słomczyńska M, Woźniak J. Differential distribution of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the porcine ovary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001; 109(4): 238–244.
404. Smith KK. Evolution of the placenta in therian mammals. In Dial KP, Shubin N, Brainerd EL (Eds.), *Great transformations in Vertebrate evolution*. Publisher: University of Chicago Press; 2014. pp. 205–225.
405. Soares MJ. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 2(1): 51.
406. Soares MJ, Varberg KM. Trophoblast. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 417–423.
407. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine natural killer cells. *Front Immunol*. 2019; 10: 960.
408. Sousa FCA, Alves FR, Fortes EAM, Ferraz MS, Machado Júnior AAN, de Menezes DJA, et al. Pregnancy in Hystricomorpha: gestational age and embryonic-fetal development of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831) estimated by ultrasonography. *Theriogenology*. 2012; 78(6): 1278–1285.

409. Sordelli MS, Beltrame JS, Zotta E, Gomez N, Dmytrenko G, Sales ME, et al. Endogenous lysophosphatidic acid participates in vascularisation and decidualisation at the maternal–fetal interface in the rat. *Reprod Fertil Dev.* 2017; 29(11): 2112.
410. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *J Reprod Fertil.* 2004a; 128(6): 657–668.
411. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod.* 2004b; 71(1): 2–10.
412. Spencer TE, Hayashi K, Hu J, Carpenter KD. Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol.* 2005; 68: 85–122.
413. Spencer TE. Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2014; 32(5): 346–357.
414. Spencer TE, Hansen TR. Implantation and establishment of pregnancy in ruminants. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2015; 216: 105–135.
415. Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci.* 2016; 99(7): 5941–5950.
416. Spencer TE, Kelleher AM, Bartol FF. Development and function of uterine glands in domestic animals. *Annu Rev Anim Biosci.* 2019; 7(1): 125–147.
417. Spiekman SNF, Werneburg I. Patterns in the bony skull development of marsupials: high variation in onset of ossification and conserved regions of bone contact. *Sci Rep.* 2017; 7: 43197.
418. Stadtmayer DJ, Wagner GP. The primacy of maternal innovations to the evolution of embryo implantation. *Integr Comp Biol.* 2020; 60(3): 742–752.
419. Stannard HJ, Miller RD, Old JM. Marsupial and monotreme milk—a review of its nutrient and immune properties. *PeerJ.* 2020; 8(e9335): e9335.
420. Steinhauser CB, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA. Expression of progesterone receptor in the porcine uterus and placenta throughout gestation: correlation with expression of uteroferrin and osteopontin. *Domest Anim Endocrinol.* 2017; 58: 19–29.
421. Stenhouse C, Hogg CO, Ashworth CJ. Associations between fetal size, sex and both proliferation and apoptosis at the porcine foeto-maternal interface. *Placenta.* 2018; 70: 15–24.
422. Stenhouse C, Hogg CO, Ashworth CJ. Association of foetal size and sex with porcine foeto-maternal interface integrin expression. *J Reprod Fertil.* 2019a; 157(4): 317–328.
423. Stenhouse C, Hogg CO, Ashworth CJ. Novel relationships between porcine fetal size, sex, and endometrial angiogenesis. *Biol Reprod.* 2019b; 101(1): 112–125.

424. Steppan S, Adkins R, Anderson J. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst Biol.* 2004; 53(4): 533–553.
425. Stewart MD, Johnson GA, Gray CA, Burghardt RC, Schuler LA, Joyce MM, et al. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod.* 2000; 62(6): 1779–1789.
426. Strahl H. Eine Placenta mit einem Mesoplacentarium. *Anatomischer Anzeiger.* 1905; 26, 524–528.
427. Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44(3): 50–58.
428. Sugiura T, Akiyoshi S, Inoue F, Yanagawa Y, Moriyoshi M, Tajima M, et al. Relationship between bovine endometrial thickness and plasma progesterone and estradiol concentrations in natural and induced estrus. *J Reprod Dev.* 2018; 64(2): 135–143.
429. Sukjumlong S, Persson E, Kaeoket K, Dalin A-M. Immunohistochemical studies on oestrogen receptor alpha (ERalpha) and the proliferative marker Ki-67 in the sow uterus at oestrus and early pregnancy: ERα and ki-67 in the inseminated sow uterus. *Reprod Domest Anim.* 2004; 39(5): 361–369.
430. Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8th ed. Londres, Inglaterra: Elsevier Health Sciences; 2018.
431. Taggart DA, Breed WG, Temple-Smith PD, Purvis A, Shimmin G. Reproduction, mating strategies and sperm competition in marsupials and monotremes. In, *Sperm Competition and Sexual Selection.* Elsevier; 1998. pp. 623–66.
432. Takebayashi-Suzuki K, Suzuki A. Intracellular communication among morphogen signaling pathways during vertebrate body plan formation. *Genes (Basel).* 2020; 11(3): 341.
433. Tano De La Hoz MF, Flamini MA, Díaz AO. Comparative analysis of the morphology, ultrastructure, and glycosylation pattern of the jejunum and ileum of the wild rodent *Lagostomus maximus*: Jejunum and ileum of *Lagostomus maximus*. *Anat Rec (Hoboken).* 2016; 299(5): 630–642.
434. Tano de la Hoz MF, Flamini MA, Zanuzzi CN, Díaz AO. The colonic groove of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*): Histochemical evidence of an abrupt change in the glycosylation pattern of goblet cells. *J Morphol.* 2017; 278(12): 1606–1618.
435. Tano de la Hoz MF, Flamini MA, Portiansky EL, Díaz AO. Analysis of glycoconjugates and morphological characterization of the descending colon and rectum of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Zoology (Jena).* 2019; 135(125691): 125691.

436. Tardif S, Wilson MD, Wagner R, Hunt P, Gertsenstein M, Nagy A, et al. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. *J Biol Chem*. 2010; 285(32): 24863–24870.
437. Tayade C, Black GP, Fang Y, Croy BA. Differential gene expression in endometrium, endometrial lymphocytes, and trophoblasts during successful and abortive embryo implantation. *J Immunol*. 2006; 176(1): 148–156.
438. Tayade C, Fang Y, Hilchie D, Croy BA. Lymphocyte contributions to altered endometrial angiogenesis during early and midgestation fetal loss. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(4): 877–886.
439. Taylor CT, Biljan MM, Kingsland CR, Johnson PM. Inhibition of human spermatozoa-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum Reprod*. 1994; 9(5): 907–911.
440. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod*. 1997; 57(6): 1338–1345.
441. Tekin S, Hansen PJ. Natural killer-like cells in the sheep: functional characterization and regulation by pregnancy-associated proteins. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227(9): 803–811.
442. Temple-Smith P, Grant T. Uncertain breeding: a short history of reproduction in monotremes. *Reprod Fertil Dev*. 2001; 13(7-8): 487497.
443. Teixeira J, Rueda BR, Pru JK. Uterine Stem Cells. In *StemBook*. Cambridge, MA: Harvard Stem Cell Institute; 2008.
444. Theiler K. The house mouse. *Atlas of embryonic development*. 1989. Springer-Verlag: New York Inc.
445. Tibbitts FD, Hillemann HH. The development and histology of the chinchilla placenta. *J Morphol*. 1959; 105(2): 317–365.
446. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*. 1995; 136(1): 232–241.
447. Torry RJ, Rongish BJ. Angiogenesis in the uterus: potential regulation and relation to tumor angiogenesis. *Am J Reprod Immunol*. 1992; 27(3-4): 171–179.
448. Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, et al. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet*. 2007; 24(7): 303–315.

449. Totton SC, Wandeler AI, Gartley CJ, Kachhawaha S, Suman M, Ribble CS, et al. Assessing reproductive patterns and disorders in free-ranging dogs in Jodhpur, India to optimize a population control program. *Theriogenology*. 2010; 74(7): 1115–1120.
450. Tripp HR. Reproduction in elephant-shrews (Macroelididae) with special reference to ovulation and implantation. *J Reprod Fertil*. 1971; 26(2): 149–159.
451. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*. 1997; 57(3): 487–494.
452. Tyndale-Biscoe CH, Renfree M. *Reproductive Physiology of Marsupials*. Cambridge: Cambridge University Press; 1987.
453. Uhlendorf B, Kaufmann P. Die Entwicklung des Plazentastieles beim Meerschweinchen. *Anat Histol Embryol*. 1979; 8(3): 233–247.
454. Van Der Horst CJ, Gillman J. The number of eggs and surviving embryos in *Elephantulus*. *Anat Rec*. 1941; 80(4): 443–452.
455. Van Dyke JU, Brandley MC, Thompson MB. The evolution of viviparity: molecular and genomic data from squamate reptiles advance understanding of live birth in amniotes. *J Reprod Fertil*. 2014; 147(1): R15–26.
456. Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim Reprod Sci*. 2000; 60-61: 131–143.
457. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2017; 27(1): 3–49.
458. Vasudevan S, Kamat MM, Walusimbi SS, Pate JL, Ott TL. Effects of early pregnancy on uterine lymphocytes and endometrial expression of immune-regulatory molecules in dairy heifers. *Biol Reprod*. 2017; 97(1): 104–118.
459. Veniaminova NA, Vasetskii NS, Lavrechenko LA, Popov SV, Kramerov DA. Phylogeny of the order Rodentia inferred from structural analysis of short retrotransposon B1. *Genetika*. 2007; 43(7): 916–929.
460. Veterinary Key. Nervous system. <https://veteriankey.com/nervous-system-2/>
461. Villarreal D, Clark KL, Branch LC, Hierro JL, Machicote M. Alteration of ecosystem structure by a burrowing herbivore, the plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *J Mammal*. 2008; 89(3): 700–711.
462. Vucetich MG, Arnal M, Deschamps CM, Pérez ME, Vieytes EC. A brief history of caviomorph rodents as told by the fossil record. In Vassallo AI, Antenucci CD (Eds.), *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution*. SAREM Series A, Buenos Aires; 2015. pp. 11–16

463. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res.* 2007; 68(3): 113–23.
464. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(3): 185–199.
465. Wagner GP. Comparative Placentation-Mammals. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 455-461.
466. Weir BJ. The care and management of laboratory hystricomorph rodents. *Lab Anim.* 1967; 1(2): 95–104.
467. Weir BJ. The reproductive physiology of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *J Reprod Fertil.* 1971a; 25(3): 355–363.
468. Weir BJ. The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *J Reprod Fertil.* 1971b; 25(3): 365–373.
469. Weir BJ. Some observations on reproduction in the female agouti, *Dasyprocta aguti*. *J Reprod Fertil.* 1971c; 24(2): 203–211.
470. Weir BJ. Some observations on reproduction in the female green acouchi, *Myoprocta pratti*. *J Reprod Fertil.* 1971d; 24(2): 193–201.
471. Weir BJ. Reproductive characteristics of hystricomorph rodents, In Rowlands IW, Weir BJ (Eds.), *The biology of hystricomorph rodents*. New York: Academic Press; 1974. pp. 265–301
472. Weir BJ, Rowlands I. Functional anatomy of the hystricomorph ovary. *Symp Zool Soc Lond* 1974; 34, 303–332.
473. Werneburg I, Spiekman SNF. Mammalian embryology and organogenesis. In Zachos F, Asher R (Eds.), *Mammalian Evolution, Diversity and Systematics*. Berlin: Walter de Gruyter; 2018. pp. 59-116.
474. Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 357(1-2): 108–118.
475. Wick R, Kress A. Ultrastructural changes in the cervical epithelium during the estrous cycle of the marsupial *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). *Cells Tissues Organs.* 2002; 171(2-3): 162-176.
476. Wigglesworth JS. Experimental growth retardation in the foetal rat. *J Pathol Bacteriol.* 1964; 88(1): 1–13.

477. Wildman DE, Chen C, Erez O, Grossman LI, Goodman M, Romero R. Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(9): 3203–3208.
478. William VH, Johnston S. Mammalian reproduction overview. In Skinner MK (Ed.), *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press: Elsevier; 2018. pp. 486-494.
479. Wilsher S, Greenwood RES, Mahon GD, Allen WR. Placentation and hormonal maintenance of pregnancy in the impala (*Aepyceros melampus*). *Placenta*. 2020; 95: 91–105.
480. Wilson DE, Reeder DM. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore, MD, Johns Hopkins University Press; 2005.
481. Wimsatt WA. Some comparative aspects of implantation. *Biol Reprod*. 1975; 12(1): 1–40.
482. Wooding P, Burton G. *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution*. 8th ed. Berlin, Germany: Springer; 2008.
483. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. Regulation of placental development and its impact on fetal growth—new insights from mouse models. *Front Endocrinol*. 2018; 9: 570.
484. Woudwyk MA, Zanuzzi CN, Nishida F, Gimeno EJ, Soto P, Monteavaro CE, et al. Apoptosis and cell proliferation in the mouse model of embryonic death induced by *Tritrichomonas foetus* infection. *Exp Parasitol*. 2015; 156: 32–36.
485. Woudwyk M, Acuña F, Gomez Castro G. Sistema reproductor de la hembra. In Barbeito CG, Diessler ME (Eds.), *Introducción a la histología veterinaria*. EDULP, UNLP; 2021.
486. Wright EC, Miles JR, Lents CA, Rempel LA. Uterine and placenta characteristics during early vascular development in the pig from day 22 to 42 of gestation. *Anim Reprod Sci*. 2016; 164: 14–22.
487. Xu JS, Lee YL, Lee KF, Kwok KL, Lee WM, Luk JM, et al. Embryotrophic factor-3 from human oviductal cells enhances proliferation, suppresses apoptosis and stimulates the expression of the beta1 subunit of sodium-potassium ATPase in mouse embryos. *Hum Reprod*. 2004; 19(12), 2919–2926.
488. Yin Y, Ma L. Development of the mammalian female reproductive tract. *J Biochem*. 2005; 137(6): 677–683.
489. Yin Z, Li Y, He W, Li D, Li H, Yang Y, et al. Progesterone inhibits contraction and increases TREK-1 potassium channel expression in late pregnant rat uterus. *Oncotarget*. 2018; 9(1): 651–661.
490. Zara JL. Breeding and husbandry of AL- capybara *Hydrochoerus hydrochaeris* at Evansville Zoo. *Int Zoo Yearb*. 1973; 13(1): 137–139.

491. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(5): 939–980.
492. Zhang Y-Y, Chen H, Sun C, Wang H-Z, Liu M-L, Li Y-Y, et al. Expression and functional characterization of NOD2 in decidual stromal cells isolated during the first trimester of pregnancy. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99612.
493. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* 2018; 28(1): 9–21.
494. Zhang W-Q, Zhao M, Huang M-Y, Liu J-L. Comparative transcriptomic analysis of embryo implantation in mice and rats. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 50(2): 668–678.
495. Zhang Y, Qian J, Zaltzhendler O, Bshara M, Jaffa AJ, Grisaru D, et al. Analysis of in vivo uterine peristalsis in the non-pregnant female mouse. *Interface Focus.* 2019; 9(4): 20180082.
496. Zhao X, Jiang Y, Ping Y, Guo H, He M, Feng X. Associations between tumor necrosis factor- α and interleukin-6 polymorphisms and unexplained recurrent spontaneous abortion risk: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98(46): e17919.
497. Zhu J-Y, Pang Z-J, Yu Y-H. Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol.* 2012; 5(3-4): e137-43.