

Artículo del Dr Francisco Acuña y colaboradores

Estudio de la muerte embrionaria en mamíferos a través de un modelo no convencional: *Lagostomus maximus*, vizcacha de llanura (Rodentia, Chinchillidae)

*Study of embryonic death in mammals through an unconventional model: *Lagostomus maximus*, plains viscacha (Rodentia, Chinchillidae)*

Acuña Francisco¹  Barbeito Claudio Gustavo¹  Miglino María Angélica²  Ranea Guadalupe¹ 
Nishida Fabián³  Portiansky Enrique Leo^{4,5}  Flamini Mirta Alicia¹ 

¹Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CCT - La Plata, Argentina.

²Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Pablo, Brasil.

³Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad de Arturo Jauretche, Argentina.

⁴Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CCT - La Plata.

⁵Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Argentina.

ID Autores:

Acuña Francisco: <https://orcid.org/0000-0001-9657-3978>

Barbeito Claudio Gustavo: <https://orcid.org/0000-0001-9459-138X>

Miglino María Angélica: <https://orcid.org/0000-0003-4979-115X>

Ranea Guadalupe: <https://orcid.org/0000-0002-8439-9340>

Nishida Fabián: <https://orcid.org/0000-0002-5295-5605>

Portiansky Enrique Leo: <https://orcid.org/0000-0002-2572-4668>

Flamini Mirta Alicia: <https://orcid.org/0000-0002-9420-9782>

Autor para correspondencia:

Correo electrónico: facuna@fcv.unlp.edu.ar (Acuña Francisco)

Resumen: *Lagostomus maximus* es un roedor histricomorfo con características reproductivas muy peculiares, entre ellas, la poliovulación de 200-800 ovocitos/estro y una tasa de resorción embrionaria del 80%, que involucra a las implantaciones craneales y medias. Habiendo realizado numerosos estudios estructurales sobre todos los órganos y en diferentes momentos de la vida reproductiva de las hembras, decidimos estudiar la muerte embrionaria que se observa en esta especie. Recientemente, los diferentes análisis realizados en fetos y hembras adultas demostraron la heterogeneidad de los cuernos uterinos en sentido craneocaudal. A partir de estos resultados se construyó la hipótesis de cómo la heterogeneidad estructural podría influir en la supervivencia diferencial de las implantaciones embrionarias, que finalmente origina la muerte de las implantaciones craneales y medias y permite la viabilidad de las caudales. Si bien la heterogeneidad uterina también se observa en otros mamíferos, en ninguna de estas especies estudiadas la masividad de las implantaciones afectadas es similar a lo observado en *Lagostomus maximus*. La caracterización de las implantaciones, en resorción y viables, y sus similitudes a las observadas en modelos experimentales, permiten considerar a la vizcacha como un modelo no convencional para el estudio de la muerte embrionaria y/o enfermedades asociadas con la preñez.

Palabras Clave: Heterogeneidad uterina, pérdida embrionaria, preñez, roedores

Abstract: *Lagostomus maximus* is a histricomorphic rodent with very peculiar reproductive characteristics, including polyovulation of 200-800 oocytes/estrus and an embryo resorption rate of 80%, which involves cranial and middle implantations. Having carried out numerous structural studies on all the organs and at different moments of the reproductive life of the females, we decided to study the embryonic death observed in this species. Recently, the different analyzes carried out in fetuses and adult females demonstrated the heterogeneity of the uterine horns in the craniocaudal direction. Based on these results, the hypothesis of how structural heterogeneity could influence the differential survival of embryonic implantations, which ultimately causes the death of cranial and middle and allows the viability of the caudal implantations was constructed. Although uterine heterogeneity is also observed in other mammals, in none of these species is the massiveness of the affected implants like that observed in *Lagostomus maximus*. The characterization of implantations, in resorption and viable, and their similarities to those observed in experimental models, allow us to consider viscacha as an unconventional model for the study of embryonic death and/or diseases associated with pregnancy.

Keywords: Uterine heterogeneity, embryo loss, pregnancy, rodents

La reproducción sexual en los mamíferos involucra a diferentes estrategias adaptativas que son el resultado del proceso evolutivo. Todas estas estrategias facilitan la continuidad de la vida, la preservación de la especie y la transmisión de variaciones de una generación a la siguiente (Hayssen & Orr, 2017; Flaws & Spencer, 2018). Las diferencias existentes entre las diferentes estrategias reproductivas constituyen la base para clasificar a los mamíferos en prototerios (monotremas), metaterios (marsupiales) y euterios (Figura 1).

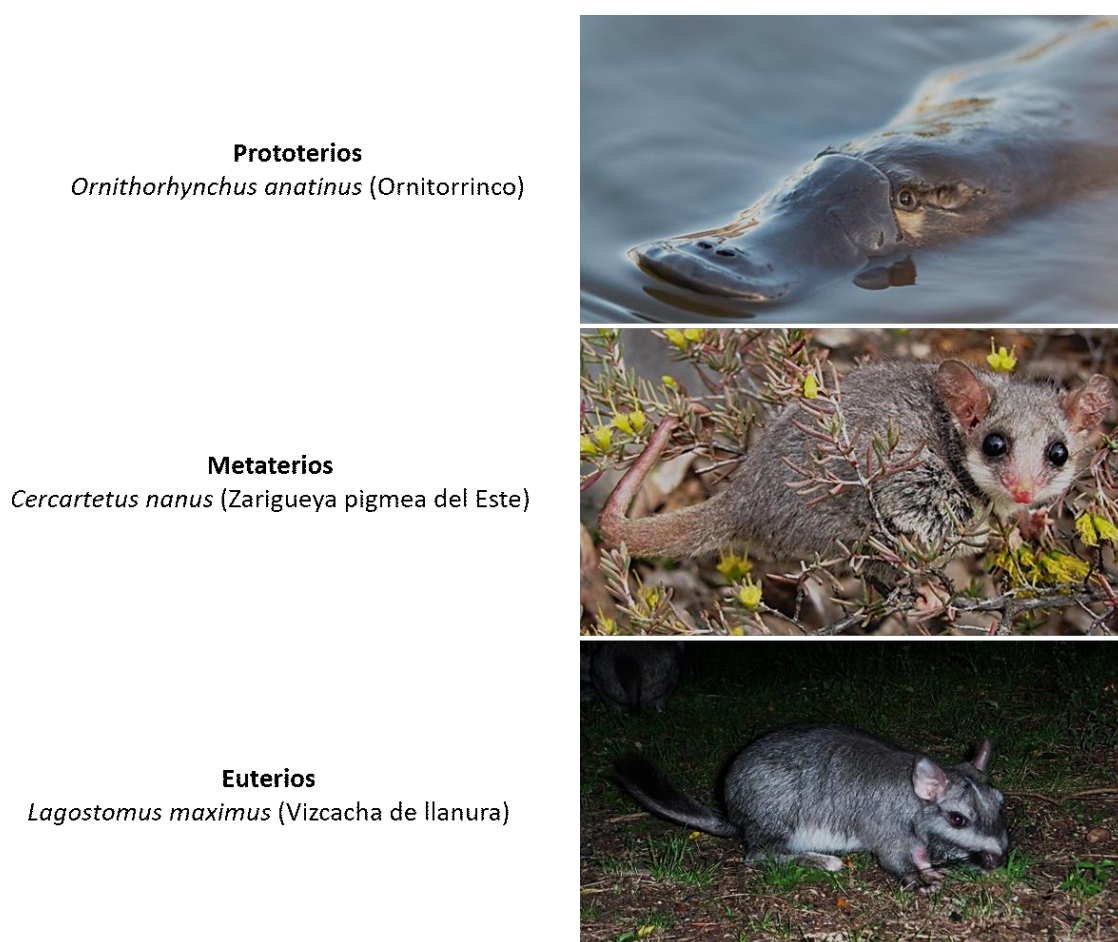


Figura 1. Los tres grupos de mamíferos, Prototerios, Metaterios y Euterios.

Imágenes extraídas y modificadas de: <https://www.iucnredlist.org/> y <http://naturalezayculturaargentina.blogspot.com/2011/04/la-vizcacha.html>

Esta clasificación se basa en las diferencias del desarrollo pre- y postnatal, la preñez, el parto, la lactancia y las características morfológicas y fisiológicas del sistema reproductor de la hembra (Renfree & Shaw, 2001; Murphy, 2012; Guernsey et al., 2017; Renfree & Fenelon, 2017; Frankenberg, 2018). Los monotremas tienen una gestación corta de 15 a 21 días después de la ovulación (Griffiths et al., 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 et al., 2006). La hembra ovipone en un lugar propicio e incuba a los huevos durante el último tercio del desarrollo embrionario (Ferner et al., 2017). Posteriormente, en la post-eclosión, las crías altriciales¹ continúan su desarrollo a expensas de los nutrientes que incorporan de la leche (Grant 1989; Griffith 1989; Mate et al., 2000; Ferner et al., 2017). Los marsupiales y euterios son vivíparos, y los embriones tienen un desarrollo intrauterino que depende de las placentas. Los marsupiales, al igual que los monotremas, tienen una descendencia con una altricialidad extrema (Ferner et al., 2017). La gestación en los marsupiales ocurre en el útero, pero el desarrollo de los neonatos se continúa en el interior del marsupio (Edwards & Deakin, 2012) y su nutrición se lleva a cabo mediante una lactación muy característica (Behringer et al., 2006). 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). Luego del tiempo de gestación especie-específico, nacen crías altriciales o precociales² (Ferner et al., 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 (Guernsey et al., 2017).

Tal como se mencionó anteriormente, la reproducción de los euterios involucra totalmente al sistema reproductor de la hembra, ya que es el sitio donde ocurren todos los eventos reproductivos. Si bien el útero está conformado por el útero propiamente dicho y el cuello uterino o cérvix, existen variaciones anatómicas entre las hembras de las diferentes especies. El útero en la mayoría de los mamíferos, incluyendo todas las especies domésticas (perra, gata, cerda, vaca, yegua, oveja, camélidos sudamericanos, coneja) está conformado por dos cuernos uterinos (Figura 2).

Aunque el útero es variable en sus características anatómicas, su estructura histológica es similar entre las hembras de los distintos mamíferos. El útero es un órgano tubular y está organizado en tunicas que, desde el interior al exterior, se denominan endometrio, miometrio y perimetrio (Figura 3).

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 et al., 2017).

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 período relativamente temprano (Ferner et al., 2017).

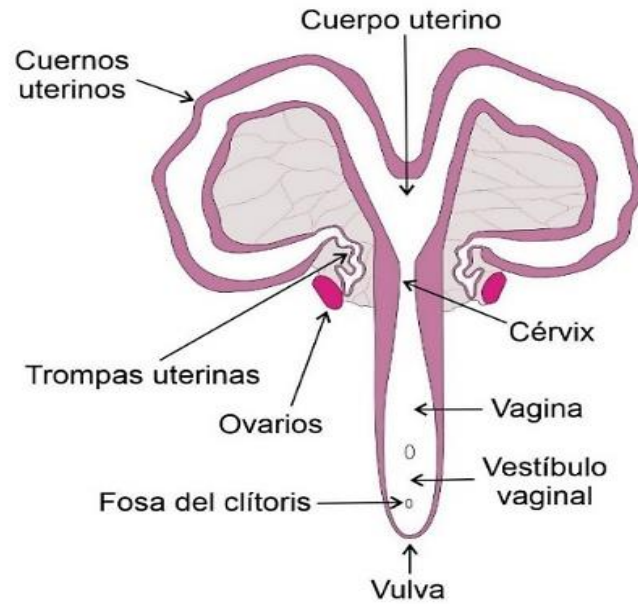


Figura 2. Sistema reproductor de la cerda.

Se observa al útero conformado por los cuernos uterinos y el cérvix. Extraído de Woudwyk et al., 2021.

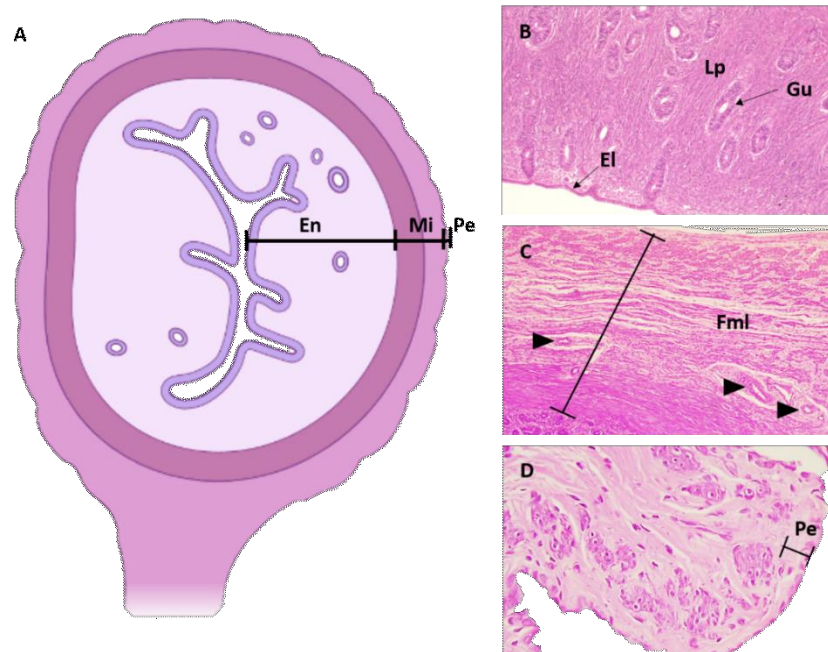


Figura 3

A. Organización histológica del útero en tres tunicas. Abreviaturas: **En:** endometrio; **Mi:** miometrio; **Pe:** perimetrio. B-D. Imágenes extraídas y modificadas de Woudwyk et al., 2021.

Algunos de los eventos funcionales que ocurren en sistema reproductor de la hembra son la fertilización, la implantación y el desarrollo del *conceptus*³ (Mullen & Behringer,

³ *Conceptus*: es el conjunto del embrión o feto y las membranas extraembrionarias (corion, alantoides, amnios y saco vitelino).

2014). La fertilización, que ocurre en la ampolla de las trompas uterinas, es la unión entre las gametas femenina (ovocito) y masculina (espermatozoide) a partir de la que se forma el primer estado embrionario, el cigoto. Esta célula, tras sucesivas mitosis en diferentes planos, da origen al blastocisto, quien ingresa a los cuernos uterinos. Posteriormente, ocurre la implantación. Este evento implica una interacción precisa y óptima entre el blastocisto y el endometrio (Figura 4). Para que el endometrio sea receptivo al blastocisto es necesario que se prepare. El acondicionamiento del útero se produce por inducción de las hormonas sexuales⁴.

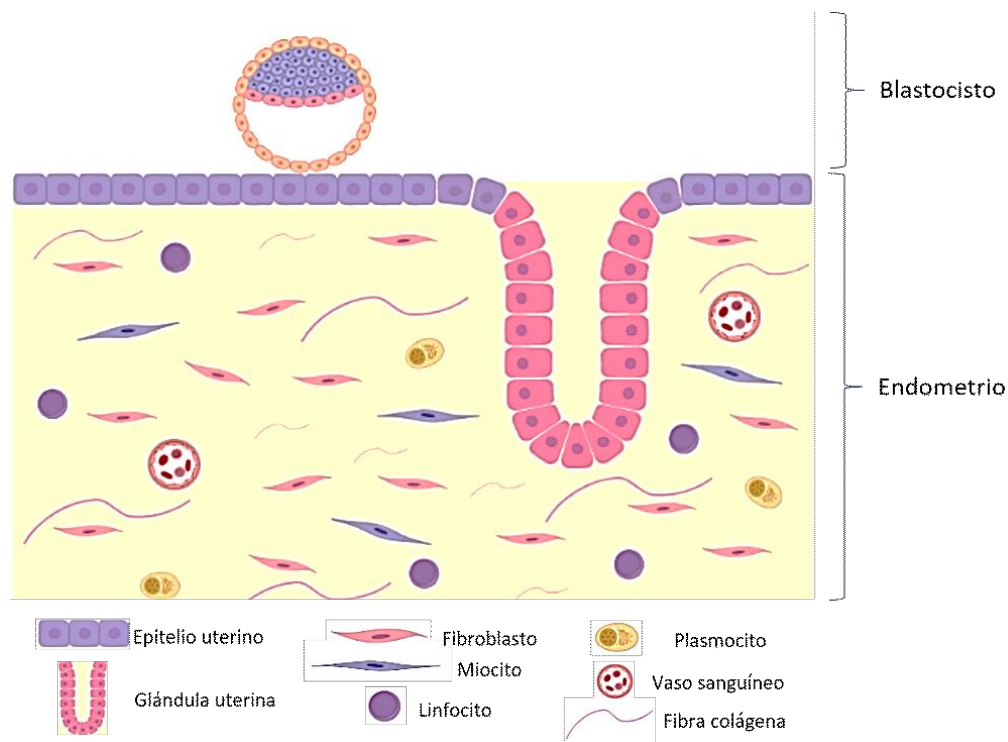


Figura 4. Implantación

Interacción entre el blastocisto y el epitelio uterino.

A partir de la implantación se dará lugar al desarrollo del conceptus, en un ambiente propicio, durante un tiempo que depende de cada especie.

Si bien la morfología uterina es similar entre los mamíferos, y ambos cuernos uterinos son muy semejantes, en algunas especies existen diferencias entre estos que pueden influir

⁴ Hormonas sexuales: las hormonas son moléculas que viajan a través de la sangre y que inducen cambios en las células que presenten receptores específicos para dichas moléculas. Las hormonas sexuales son producidas por las gónadas, en el caso de la hembra, los ovarios producen a los estrógenos y la progesterona.

en la implantación y el desarrollo del conceptus. A partir de estudios realizados en algunos euterios, tales como camélidos (*Vicugna pacos*), artiodáctilos (*Aepycerus melampus*), quirópteros (*Megaderma lyra*) e insectívoros (*Elephantulus myurus*), se demostró que ambos cuernos uterinos difieren entre sí, e incluso existen diferencias estructurales dentro de un mismo cuerno. Estas diferencias se deben a variaciones en el tamaño del órgano, su vascularización, el espesor de sus paredes, la expansión de las glándulas uterinas y la expresión de ARNs a nivel del endometrio. La posible justificación de estas variaciones estaría relacionada con una mayor frecuencia o exclusividad de implantación y desarrollo de los concepti en uno de los cuernos uterinos de algunas especies que, por lo general, gestan y paren 1 o 2 crías (Buechner, 1961; Mossman & Mossman, 1962; Tripp, 1971; Lee et al., 1977; Gopalakrishna & Khaparde, 1978; Loskutoff et al., 1990; Rasweiler, 1990, 1991; Mendoza et al., 2013; Hayssen & Orr, 2017; Jones et al., 2019; Barraza et al., 2020; Wilsher et al., 2020). En cambio, en el roedor histricomorfo *Lagostomus maximus* (vizcacha de llanura) (Figura 5A), sucede algo excepcional. Si bien en *L. maximus* el número de crías paridas es similar al de las especies anteriores, son múltiples los blastocistos (5/6 por cuernos uterino) que se implantan a partir de los 18 días post coito (dpc). Sin embargo, del total de estas implantaciones intersticiales⁵ y antimesometriales⁶, las localizadas en las regiones craneal y media del órgano mueren y se resorben entre los 26-70 dpc (Figura 5B). En cambio, las implantaciones caudales continúan su desarrollo y originan crías precociales luego de cinco meses de gestación. Otra característica reproductiva peculiar de esta especie es la poliovulación de unos 200-800/estro (Weir, 1971a, 1971b; Roberts & Weir, 1973). Esta tasa ovulatoria es, hasta el momento, la mayor entre los euterios, lo que genera un gran interés para su estudio. Algunos trabajos de nuestro grupo han incorporado información sobre la biología ovárica de la vizcacha (Acuña et al., 2018; Flamini et al., 2009, 2020).

5 Intersticial: tipo de implantación en la que el embrión se localiza en el espesor de la pared uterina, específicamente en el endometrio. Este tipo de implantación se produce en la gestación de humana y de algunos otros primates y roedores.

6 Antimesometrial: sitio puesto al mesometrio. El mesometrio es el pliegue del peritoneo que une al útero con la pared abdominal.



Figura 5

A. *Lagostomus maximus*, vizcacha de llanura. B. Gestación temprana. E1-E4: implantaciones en resorción; E5: implantación viable. Abreviaturas: Ova: ovario; Tu: trompa uterina.

Los resultados iniciales de los trabajos realizados por el grupo de la Dra. Weir durante la década de 1970 no mostraron la existencia de posibles causas endógenas (diferencias morfológicas, superfetación) y exógenas (agentes etiológicos) que pudieran ser responsables de esta muerte embrionaria temprana y fisiológica (Weir, 1971b; Roberts & Perry, 1974). Durante décadas, no se argumentaron potenciales razones para explicar la supervivencia de los conceptus en las diferentes regiones uterinas. Sin embargo, estudios recientes generados en nuestro laboratorio demuestran la existencia de diferencias regionales en los cuernos uterinos de *L. maximus*, que podrían explicar las resorciones de las implantaciones craneales y medias y el desarrollo de las caudales. Los primeros estudios anatómicos realizados en esta especie sobre los cuernos uterinos de fetos en desarrollo demostraban una mayor vascularización en las regiones caudales del órgano hacia los 50 días de gestación (Flamini et al., 2020). De la misma manera, el estudio morfométrico de los cuernos uterinos de hembras adultas no gestantes demostró que estas diferencias regionales en la vascularización se mantenían (Acuña et al., 2020). Estos resultados fueron corroborados mediante angiografía por otros autores (Giacchino et al., 2020). Sobre estas mismas hembras, un estudio ultrasonográfico realizado en nuestro laboratorio confirmó que el diámetro de la pared uterina es variable a lo largo del órgano, siendo este creciente en el sentido craneocaudal (Acuña et al., 2020). Este resultado fue corroborado por un estudio histométrico, que demostró la existencia de un incremento significativo en el espesor de la pared total del órgano, la del endometrio y la del miometrio, en sentido cráneo caudal.

Si bien luego de la formación de la placenta la vascularización uterina es fundamental para la nutrición embrionaria/fetal, durante el periodo peri-implantacional el embrión requiere de la nutrición histotrofa, basada en la incorporación de productos presentes en la secreción de las glándulas uterinas. Bajo esta premisa, analizamos el área relativa ocupada por las glándulas en el endometrio y demostramos que la heterogeneidad uterina también se evidencia en el área glandular, que es significativamente mayor en los extremos caudales del órgano (Acuña et al., 2020). Estos resultados nos han permitido generar la hipótesis que las variaciones uterinas, observadas en las hembras no preñadas y en algunos parámetros desde la vida prenatal, podrían contribuir diferencialmente a la supervivencia y el desarrollo de las implantaciones y, por lo tanto, ser el origen endógeno de la muerte embrionaria y fisiológica que se evidencia en esta especie.

Las características del desarrollo temprano de la vizcacha de llanura fueron descritas por Roberts y Weir (1973), y muchos de los términos embriológicos empleados en ese trabajo fueron actualizados por Leopardo y Vitullo (2017). Además, en este último trabajo se construyó una tabla para determinar el tiempo gestacional a partir de datos morfométricos de las implantaciones embrionaria y los fetos. Recientemente, Giacchino et al. (2020) también proponen la vascularización diferencial de los cuernos uterinos, y agregan, como características de la muerte embrionaria, la presencia de infiltrados linfocitarios, hemorragia y depósito de fibrina, pero sin aclarar el momento exacto del estado gestacional de las hembras, excepto que esas características corresponden a la gestación temprana⁷. Para poder establecer con mayor precisión estos cambios, realizamos un estudio histológico y morfométrico a los 26 dpc, momento gestacional en que se inicia la muerte embrionaria de *L. maximus* (Acuña et al., 2021). En cada uno de los cinco sitios de implantación (SI) analizados se observó que cada uno de ellos contenía un blastocisto alargado (Figura 6A), con un macizo celular interno (MCI) y tejidos extraembrionarios (TEx) (Figura 6B). Del MCI se originan las tres hojas embrionarias⁸, mientras que de los TEx derivan los anexos extraembrionarios⁹ (Figura 7).

⁷ Se considera gestación temprana hasta los 60 dpc (Flamini et al., 2011).

⁸ Las tres hojas o tejidos embrionarios son el endodermo, mesodermo y ectodermo. De cada uno de ellos derivarán los diferentes células, tejidos y órganos del animal.

⁹ Los anexos extraembrionarios son el corion, amnios, alantoides y saco vitelino. Algunas funciones de estos anexos son: contribuir con el desarrollo de la placenta, la eliminación de desechos, la protección, y la formación de vasos sanguíneos.

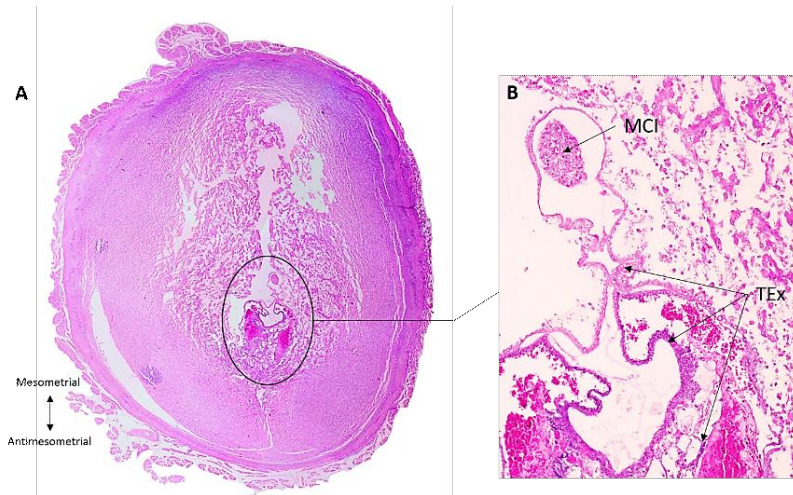


Figura 6

A. Implantación intersticial y antimesometrial de *Lagostomus maximus*. B. Detalle del blastocisto de la imagen A. Abreviaturas: MCI: macizo celular interno; TEx: tejidos extraembrionarios. Imágenes extraídas y modificadas de Acuña et al., 2021.

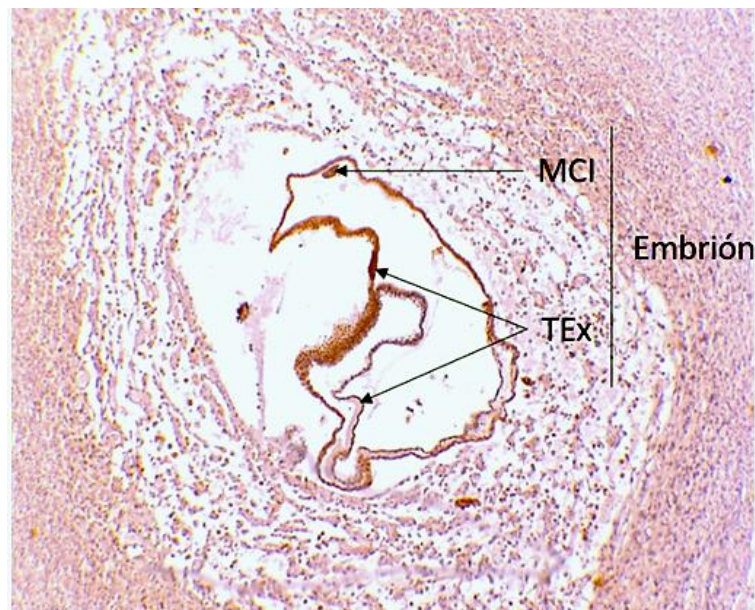


Figura 7. Embrión de vizcacha, 26 dpc.

Imunomarcaciones positivas (células marrones) en el MCI y los TEx. Se empleó al anticuerpo PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), específico para determinar células en proliferación. Imágenes extraídas y modificadas de Acuña et al., 2021.

Con relación a los Tex, el trofoblasto es quien invade la pared uterina, dando lugar al inicio de la placentación¹⁰. La placentación es un evento regulado, entre otros, por las células *natural killer* (NK). Las NK se pueden identificar mediante la lectina DBA y la

10 Placentación: formación de la placenta.

técnica histoquímica de PAS, en el endotelio de algunos vasos sanguíneos (Figura 8) (Acuña et al., 2021). Las NK se consideran esenciales durante la preñez de numerosos mamíferos, como el ser humano y algunos roedores (Sojka et al., 2019), ya que además de participar en la modulación de la invasión del trofoblasto, también tienen relevancia en la remodelación de la vasculatura (Gaynor & Colucci, 2017). Esto es más evidente en las placentas hemocoriales, en las que la sangre materna contacta directamente con el trofoblasto fetal. La vizcacha de llanura posee este tipo de placenta (Flamini et al., 2011).

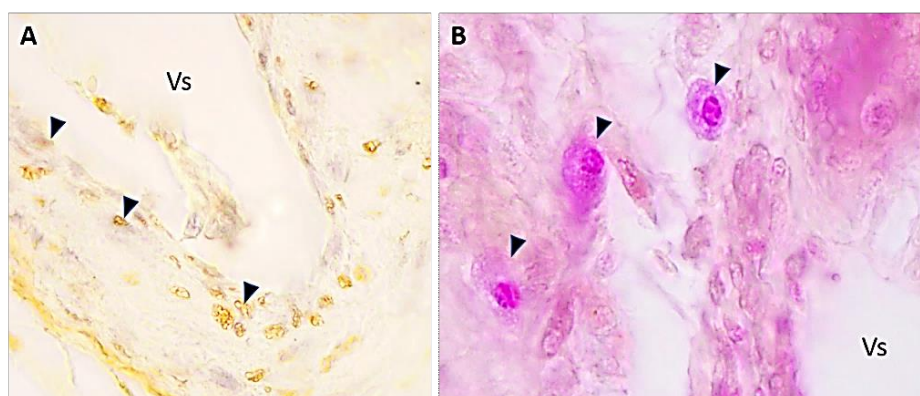


Figura 8

Células NK, positivas a la lectina DBA (A) y a la técnica histoquímica PAS (B). Abreviaturas: Vs: vaso sanguíneo. Imágenes extraídas y modificadas de Acuña et al., 2021.

Tal como se mencionó anteriormente, la reproducción implica la participación de las hormonas sexuales, siendo particularmente importante la progesterona. Esta hormona es esencial para la implantación y el mantenimiento de la preñez (Garzía et al., 2004). La expresión del receptor¹¹ de progesterona (RP) en los SI demuestra la sensibilidad de esta estructura hacia la hormona de la gestación. La expresión homogénea del RP durante la gestación temprana en todos los SI de *L. maximus* permite inferir que para el tiempo gestacional en el que se inicia la resorción de las implantaciones craneales y medias no existen diferencias regionales en la sensibilidad a la progesterona. Se necesitarán estudios de la expresión del RP en periodos gestacionales posteriores para dilucidar posibles variaciones, ya que la resorción en la vizcacha de llanura se extiende hasta los 70 dpc (Acuña et al., 2021).

En las hembras con preñeces de 26 días realizamos estudios morfológicos, histoquímicos y morfométricos. En estos estudios se midió el largo y el ancho de cada SI,

¹¹ Para que una molécula induzca un cambio morfológico y/o fisiológico en una célula es necesario que esté presente un receptor específico para esa molécula. En este caso, para que la progesterona induzca cambios es necesario que la célula presente al receptor de progesterona.

y se determinó que ambos parámetros se incrementan significativamente en el sentido craneocaudal de los cuernos uterinos. Es decir, los SI craneales y medios, eran más reducidos que los caudales, que son los que finalmente van a crecer y desarrollar. El estudio morfométrico también incluyó la cuantificación de las áreas glandular y vascular en cada SI. Los resultados demostraron que el patrón de incremento craneocaudal presente en las hembras sin gestación se repite en las hembras con gestación temprana. Estos resultados refuerzan la hipótesis propuesta en cuanto al rol de las glándulas uterinas y la vascularización en la gestación temprana. Ambos componentes uterinos participarían en las nutriciones histotrofa y hemotrofa de las implantaciones, favoreciendo mayormente a los SI caudales. Cabe mencionar que la nutrición histotrofa resulta relevante durante el inicio de la gestación de otras especies con placenta hemocorial, entre ellas, la humana (Burton et al., 2020). Además de las funciones nutricias, el histotrofo tiene un rol fundamental en la activación del blastocisto, la receptividad uterina, la decidualización, la supervivencia y el crecimiento del conceptus, tal como se observó en diferentes especies de animales de producción (Salamonsen et al., 2013; Bastos et al., 2019; Kelleher et al., 2019; Spencer et al., 2019). Asimismo, las variaciones en el área vascular implicarían un aporte diferencial de vasos sanguíneos a la placentación de cada SI. A los 26 dpc, no se encontraron cambios macroscópicos en las implantaciones craneales y medias, aunque si se encontraron cambios histológicos. En los SI a resorber se observaron necrosis, infiltrado inflamatorio, zonas hemorrágicas y depósito de fibrina (Acuña et al., 2021). En cambio, en un estudio realizado sobre gestaciones intermedias (50-90 días de gestación) se encontraron tanto cambios macroscópicos (en el color y en el tamaño), como microscópicos. Más aún, también se evidenció una deficiente vascularización (Flamini et al., 2020).

Las características microscópicas de la resorción fisiológica durante la gestación temprana e intermedia de *L. maximus* coinciden con las observadas en resorciones inducidas bajo ciertas condiciones experimentales (Sordelli et al., 2017), y también con las halladas en la muerte embrionaria espontánea de otras especies. Por otro lado, la tasa de resorción en la vizcacha de llanura (80%) supera ampliamente el porcentaje (8-30%) encontrado en los modelos clásicos de muerte embrionaria, roedores múridos como rata y ratón (Clark, 2008; Flores et al., 2014; Fonseca et al., 2014).

La heterogeneidad morfológica regional del útero de en *L. maximus* sería, hasta el momento, la única causa posible de la muerte embrionaria temprana y fisiológica. La masividad y previsibilidad de la resorción de los sitios de implantación y la similitud de

sus características morfológicas con las halladas en los modelos de muerte embrionaria tradicionales hacen de la especie un excelente modelo no convencional para el estudio de enfermedades relacionadas a la preñez.

Agradecimientos

Los esquemas presentados en las figuras 3 y 4 fueron realizados mediante el software libre BioRender (www.biorender.com). Las figuras 6-8 fueron modificadas con permiso de Journal of Morphology (License Number 5118191320244). Agradecemos a los técnicos de nuestros laboratorios Ht. Ruben Mario y Lic. Guadalupe Guidi por su asistencia, y al personal de la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS) del Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires por las capturas de los animales. Estos estudios fueron realizados con subsidios de la Universidad Nacional de La Plata (V270 y V273).

Referencias

- Acuña, F., Tano de la Hoz, M. F., Díaz, A. O., Portiansky, E. L., Barbeito, C. G., & Flamini, M. A. 2018. Histochemistry of the zona pellucida of the ovary of a species with natural polyovulation: *Lagostomus maximus* (Rodentia, Hystricomorpha, Chinchillidae). *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 207–215. <https://doi.org/10.1111/rda.13333>
- Acuña, F., Barbeito, C. G., Portiansky, E. L., Ranea, G., Nishida, F., Miglino, M. A., & Flamini, M. A. 2020. Early and natural embryonic death in *Lagostomus maximus*: Association with the uterine glands, vasculature, and musculature. *Journal of Morphology*, 281, 710–724. <https://doi.org/10.1002/jmor.21127>
- Acuña, F., Barbeito, C. G., Portiansky, E. L., Miglino, M. A., & Flamini, M. A. 2021. Prenatal development in *Lagostomus maximus* (Rodentia, Chinchillidae): A unique case among eutherian mammals of physiological embryonic death. *Journal of Morphology*, 282, 720–732. <https://doi.org/10.1002/jmor.21341>
- Bastos, H., Martinez, M. N., Camozzato, G. C., Estradé, M. J., Barros, E., Vital, C. E., Vidigal, P., Meikle, A., Jobim, M., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. 2019. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. *Theriogenology*, 125, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.002>
- Behringer, R. R., Eakin, G. S., & Renfree, M. B. 2006. Mammalian diversity: gametes, embryos and reproduction. *Reproduction, Fertility, and Development*, 18, 99–107. <https://doi.org/10.1071/rd05137>
- Buechner, H. Unilateral Implantation in the Uganda Kob. 1961. *Nature*, 190, 738–739. <https://doi.org/10.1038/190738a0>
- Burton, G. J., Cindrova-Davies, T., & Turco, M. Y. 2020. Review: Histotrophic nutrition and the placental-endometrial dialogue during human early pregnancy. *Placenta*, 102, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.02.008>
- Clark, D. A., Petitbarat, M., & Chaouat, G. 2008. How should data on murine spontaneous abortion rates be expressed and analyzed? *American Journal of Reproductive Immunology*, 60, 192–196. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00612.x>
- Edwards, M. J., & Deakin, J. E. 2012. The marsupial pouch: implications for reproductive success and mammalian evolution. *Australian Journal of Zoology*, 61, 41–47. <https://doi.org/10.1071/ZO12088>

- Ferner, K., Schultz, J. A., & Zeller, U. 2017. Comparative anatomy of neonates of the three major mammalian groups (monotremes, marsupials, placentals) and implications for the ancestral mammalian neonate morphotype. *Journal of Anatomy*, 231, 798–822.
<https://doi.org/10.1111/joa.12689>
- Flamini, M. A., Barbeito, C. G., Gimeno, E. J., & Portiansky, E. L. 2009. Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. *Acta Zoologica*, 90, 390-400.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2008.00386.x>
- Flamini, M. A., Portiansky, E. L., Favaron, P. O., Martins, D. S., Ambrósio, C. E., Mess, A. M., Miglino, M. A., & Barbeito, C. G. 2011. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) - a caviomorph rodent with natural polyovulation. *Placenta*, 32, 963–968.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.09.002>
- Flamini, M. A., Barreto, R., Matias, G., Birbrair, A., Harumi de Castro Sasahara, T., Barbeito, C. G., & Miglino, M. A. 2020. Key characteristics of the ovary and uterus for reproduction with particular reference to poly ovulation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*, Chinchillidae). *Theriogenology*, 142, 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.043>
- Flaws, J. A., & Spencer, T. E. 2018. Female reproduction, in: Skinner, M.K (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 1-2). Academic Press: Elsevier.
- Flores, L. E., Hildebrandt, T. B., Kühl, A. A., & Drews, B. 2014. Early detection and staging of spontaneous embryo resorption by ultrasound biomicroscopy in murine pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, (12): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-38>
- Fonseca, B. M., Almada, M., Costa, M. A., Teixeira, N. A., & Correia-da- Silva, G. 2014. Rat spontaneous foetal resorption: Altered α 2-macroglobulin levels and uNK cell number. *Histochemistry and Cell Biology*, 142, 693–701. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1252-8>
- Frankenberg, S. 2018. Pre-gastrula Development of Non-eutherian Mammals. *Current Topics in Developmental Biology*, 128, 237–266. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.013>
- Garzia, E., Borgato, S., Cozzi, V., Doi, P., Bulfamante, G., Persani, L., & Cetin, I. 2004. Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study. *Human Reproduction*, 19, 1911–1916. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh350>
- Gaynor, L. M., & Colucci, F. 2017. Uterine Natural Killer Cells: Functional Distinctions and Influence on Pregnancy in Humans and Mice. *Frontiers in Immunology*, 8, 467.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00467>
- Giacchino, M., Claver, J. A., Inserra, P. I., Lange, F. D., Gariboldi, M. C., Ferraris, S. R., & Vitullo, A. D. 2020. Nutritional deficiency and placenta calcification underlie constitutive, selective embryo loss in pregnant South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Theriogenology*, 155, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.003>
- Gopalakrishna, A., Khaparde, M.S. Early development, implantation and amniogenesis in the Indian vampire bat, *Megaderma lyra lyra* (Geoffroy). 1978. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Animal Sciences)* 87, 91–104. <https://doi.org/10.1007/BF03179267>
- Grant, T. R. 1989. Ornithorhynchidae, in; Walton, D. W., & Richardson, B. J. (Eds), *Fauna of Australia*, pp 436-450. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Griffiths, M. (1989). Tachyglossidae, in: Walton, D.W., & Richardson, B. J. (Eds), *Fauna of Australia* (pp. 407-435). Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Griffith, O. W., Chavan, A. R., Protopapas, S., Maziarz, J., Romero, R., & Wagner, G. P. 2017. Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E6566–E6575.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1701129114>
- Guernsey, M. W., Chuong, E. B., Cornelis, G., Renfree, M. B., & Baker, J. C. 2017. Molecular conservation of marsupial and eutherian placentation and lactation. *eLife*, 6, e27450.
<https://doi.org/10.7554/eLife.27450>
- Hayssen, V., & Orr, T. J. 2017. *Reproduction in mammals: The female perspective*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.

- Jones, C., Allen, W., & Wilsher, S. 2019. A preliminary study of the heterogeneity in endometrial morphology and glycosylation in the uterine horns of the non-pregnant impala (*Aepyceros melampus*). *Animal Reproduction Science*, 204, 66–75.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.006>
- Kelleher, A. M., DeMayo, F. J., & Spencer, T. E. 2019. Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. *Endocrine Reviews*, 40, 1424–1445.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00281>
- Lee, S.Y., Mossman, H.W., Mossman, A.S., Del Pino, G., 1977. Evidence of a specific nidation site in ruminants. *American Journal of Anatomy*, 150, 631–640.
- Leopardo, N. P., & Vitullo, A. D. 2017. Early embryonic development and spatiotemporal localization of mammalian primordial germ cell-associated proteins in the basal rodent *Lagostomus maximus*. *Scientific Reports*, 7, 594. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00723-6>
- Loskutoff, N. M., Raphael, B. L., Nemeč, L. A., Wolfe, B. A., Howard, J. G., & Kraemert, D. C. 1990. Reproductive anatomy, manipulation of ovarian activity and non-surgical embryo recovery in suni (*Neotragus moschatus zuluensis*). *Reproduction*, 88, 521–532.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0880521>
- Mate K.E., Harris M.S., & Rodger J.C. 2000. Fertilization in Monotreme, Marsupial and Eutherian Mammals, in: J.J. Tarín & A. Cano (Eds), *Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals* (pp 223-275). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58301-8_6
- Mendoza, G., Echevarría, L., Llerena, C., Castro, A., Domínguez, M., Gómez, S., Ghezzi, M., & Barbeito, C. G. 2013. Comparación morfológica entre el útero fetal y el útero adulto de la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*). *Salud Tecnología Veterinaria*, 1, 1–6.
<https://doi.org/10.20453/stv.2013.103>
- Mossman, A. S., & Mossman, H. W. 1962. Ovulation, Implantation, and Fetal Sex Ratio in Impala. *Science*, 137, 869–869. <https://doi.org/10.1126/science.137.3533.869>
- Mullen, R. D., & Behringer, R. R. 2014. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. *Sexual Development*, 8, 281–296. <https://doi.org/10.1159/000364935>
- Murphy B. D. 2012. Embryonic diapause: advances in understanding the enigma of seasonal delayed implantation. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 121–124.
<https://doi.org/10.1111/rda.12046>
- Rasweiler J. J. 1990. Implantation, development of the fetal membranes, and placentation in the captive black mastiff bat, *Molossus ater*. *The American Journal of Anatomy*, 187, 109–136.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001870202>
- Rasweiler J. J., 1991. Spontaneous decidual reactions and menstruation in the black mastiff bat, *Molossus ater*. *The American Journal of Anatomy*, 191, 1–22.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001910102>
- Renfree, M., & Shaw, G. 2001. Reproduction in Monotremes and Marsupials. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001856>
- Renfree, M. B., & Fenelon, J. C. 2017. The enigma of embryonic diapause. *Development*, 144, 3199–3210. <https://doi.org/10.1242/dev.148213>
- Roberts, C. M., & Weir, B. J. 1973. Implantation in the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33, 299–307. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0330299>
- Roberts, C., & Perry, J. S. 1974. Hystricomorph embryology. *Symposia of the Zoological Society of London*, 34, 333–360.
- Salamonsen, L. A., Edgell, T., Rombauts, L. J., Stephens, A. N., Robertson, D. M., Rainczuk, A., Nie, G., & Hannan, N. J. 2013. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertility and Sterility*, 99, 1086–1092.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.013>
- Sojka, D. K., Yang, L., & Yokoyama, W. M. 2019. Uterine natural killer cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00960>
- Spencer, T. E., Kelleher, A. M., & Bartol, F. F. 2019. Development and Function of Uterine Glands in Domestic Animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7, 125–147.
<https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115321>
- Sordelli, M. S., Beltrame, J. S., Zotta, E., Gomez, N., Dmytrenko, G., Sales, M. E., Blois, S. M., Davio, C., Martinez, S. P., Franchi, A. M., & Ribeiro, M. L. 2017. Endogenous lysophosphatidic acid participates

- in vascularisation and decidualisation at the maternal-fetal interface in the rat. *Reproduction, Fertility, and Development*, 29, 2112–2126. <https://doi.org/10.1071/RD16235>
- Tripp H. R. 1971. Reproduction in elephant-shrews (Macroelididae) with special reference to ovulation and implantation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 26, 149–159. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0260149>
 - Wagner, G. P. 2018. Comparative Placentation-Mammals. *Encyclopedia of Reproduction*, 455–461. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64668-8>
 - Weir, B. J. (1971a). The reproductive physiology of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 25, 355–363. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0250355>
 - Weir, B. J. 1971b. The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 25, 365–373. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0250365>
 - Wilsher, S., Greenwood, R. E. S., Mahon, G. D., & Allen, W. R. 2020. Placentation and hormonal maintenance of pregnancy in the impala (*Aepyceros melampus*). *Placenta* 95, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.04.009>
 - Woudwyk, M. A., Acuña, F., & Gómez Castro, G. 2021. Sistema reproductor de la hembra, in *Introducción a la Histología Veterinaria* (Eds. Barbeito, CG & Diessler, ME). EDULP. En edición