

**ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO DEL TRACTO
REPRODUCTOR DE CACHORRAS DE LOBO FINO
(*Arctocephalus australis*)**



Dra. Helena Katz González

Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
URUGUAY



TESIS DE MAESTRÍA

PEDECIBA

Área: Biología

Subarea: Ciencias Fisiológicas

ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO DEL TRACTO REPRODUCTOR DE CACHORRAS DE LOBO FINO SUDAMERICANO (*Arctocephalus australis*).

Dra. Helena Katz González

Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

DIRECTOR: Dr. Alejandro Bielli

CO-DIRECTORA: Dra. Rebeca Chávez

TRIBUNAL:

Presidente: Dra. Ana Silva

Vocales: Dra. Anabel Fernández, Dra. Natalia Uriarte.



A través de la vida debemos enfrentarnos a decisiones angustiosas, a elecciones morales. Algunas son a gran escala, muchas son menos importantes. Pero nosotros nos definimos por las elecciones tomadas. De hecho somos la suma total de nuestras decisiones. Los hechos se desarrollan impredeciblemente, injustamente. La felicidad no parece estar incluida en el diseño de la creación; somos nosotros con nuestra capacidad para amar los que damos un sentido al universo indiferente. Y aún así, la mayoría de los seres humanos parece tener la habilidad de seguir intentándolo e inclusive encontrar la alegría en las cosas sencillas como en la familia, en el trabajo, y con la esperanza de que las futuras generaciones puedan comprender más”.

P. Levy



ÍNDICE

Agradecimientos.....	4
Presentación de resultados preliminares en eventos de divulgación científica.....	5
Resumen.....	6
Listado de abreviaturas	7
1.- INTRODUCCIÓN.....	9
1.1- La reproducción en pinnípedos.....	10
Anatomía del tracto reproductor femenino y ovarios.....	10
Histofisiología ovárica.....	10
Estacionalidad, ciclos reproductivos y diapausa.....	12
Pubertad.....	14
1.2.- Modelo de estudio: el lobo fino sudamericano (<i>Arctocephalus australis</i>)	15
Características generales de la especie.....	16
Biología reproductiva de hembras de <i>A. australis</i>	18
2.- HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	21
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1.- Obtención de muestras.....	23
3.2.- Procesamiento de muestras.....	24
3.3.- Descripción histológica y análisis morfométrico.....	25
3.4.- Análisis estadístico.....	27
4.- RESULTADOS	
CAPÍTULO 1: Características generales de los animales estudiados.....	28
CAPÍTULO 2: Características histológicas y topografía de los ovarios de cachorras de <i>A. australis</i>.....	32
Análisis de la estructura y distribución de la población folicular por métodos morfométricos.....	45
CAPÍTULO 3: Características histológicas del tracto reproductor	
La tuba uterina.....	51
El útero.....	58
La vagina, el vestíbulo y el atrio.....	77
5.- CONCLUSIONES GENERALES.....	96
6.- PERSPECTIVAS EN EL ESTUDIO REPRODUCTIVO DE LOS PINNÍPEDOS.....	98
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	99
8.- ANEXOS.....	109
9.- INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	112



AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, quienes han sabido comprender y tolerar mis viajes y trabajos tan excéntricos. A mis amigas “brujas”: Mariana, Marisa, Diana, Lourdes, Graciela, eternas compañeras de todos estos años. A mis fieles amigos y otros compañeros de aventuras en Polonio e Isla de Lobos: los Oscars, Miguel, Gustavo, Francisco.

A Grace!!!, con quien nos hemos apoyando tanto en estos agitados años de trabajo en Facultad. A los compañeros de veterinaria Curupaity, tan tolerantes y generosos con las licencias, la centrífuga y otros materiales necesarios en las actividades de la isla. A los compañeros de Facultad de Ciencias (UdelaR), por los maravillosos viajes a Isla de Lobos, la colecta de materiales y el aprendizaje de otras formas de encarar la ciencia: Valen, Rosina, Fede. A Raquel Correa (Estadística, Facultad de Veterinaria), por su ayuda en los cálculos estadísticos. A los pobladores de Cabo Polonio (Rocha), quienes supieron identificar a la veterinaria de mameluco azul colectando bichos de la playa. A los funcionarios de la DINARA-MGAP: Msc. E. Páez, Lic. A. Ponce de León, C. Barreiro, en particular a los loberos, M. Casella, F. Machado y M. Pereira, por apoyo institucional y de campo en las actividades en Cabo Polonio e Isla de Lobos. A los compañeros de Histología, Faculta de Veterinaria (actuales y pasados que siguen apoyando): Mónica, Tere, Gabriel, Juan, Deborah, por su buena voluntad y disposición a cubrirme en los horarios de trabajo cuando tenía salidas, exámenes y otras pruebas de la vida. A Graciela Bocage (PEDECIBA-UdelaR), por la paciencia y enorme ayuda en solucionar muchos de los problemas surgidos en el correr de estos años. A los colaboradores de la publicación del ovario de las cachoras, en particular a William por su enorme paciencia y capacidad de encontrar publicaciones inencontrables. A quienes tradujeron del ruso (Marta Saxlund) y al inglés (Elizabeth Pechiar). Lic. Ma. Florencia Grandi (Laboratorio de Mamíferos Marinos, Centro Nacional Patagónico, Argentina) por gentileza en el envío de parte de la tesis de Corcuera. A los laboratorios que me recibieron para mis pasantías en Argentina (Dr. Hugo Ortega, Universidad del Litoral) y Uruguay (Dra. Ana Meikle, UdelaR); a PEDECIBA Y CSIC quienes financiaron las pasantías en dichos lugares. Al laboratorio de Patología, Facultad de Veterinaria, que me permitió el uso de equipamiento cuando en Histología no funcionaba nada. Dr. Danilo Fila quien apoyó la presentación del proyecto a la CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica, UdelaR) y así financiar parte del trabajo de tesis. Dr. Aldo Calliari (F. Veterinaria e IIBCE), quien realizó los western para poder terminar el trabajo iniciado en Argentina. Bach. Ma Laura Bertalmio quien ayudó a completar las planillas para los análisis estadísticos. A David Janigger (MARMAM) y otros numerosos investigadores quienes gentilmente enviaron innumerables citas bibliográficas que enriquecieron este trabajo. Al Dr. Olle Johansson (Departamento de Neurociencias, Karolinska Institute, Suecia) por su ayuda y tiempo en los diagnósticos histológicos del tracto reproductor y las ideas aportadas sobre los anexos encontrados en las lobas. A los integrantes del tribunal, quienes estuvieron dispuestos a realizar una lectura y críticas constructivas de este trabajo. A mi tutor y cotutora, en particular a Rebe, quien ha sabido entender que además del trabajo existe una vida para ser vivida.



PRESENTACIÓN DE RESULTADOS PRELIMINARES EN EVENTOS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA:

- Katz H, Pérez W, Bielli A, Chavez R. 2009-a. Histomorphology of prepuberal ovaries in the South American fur seal (*Arctocephalus australis* Zimmerman, 1783). *Folia Morphologica*. Vol. 68:277-286.
- Katz H, Salvetti N, Pedrana G, Ortega H. Análisis inmunohistoquímico de ovarios de lobo fino (*A. australis*, Zimmerman 1783). Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. 19 y 20 de noviembre de 2009. Montevideo. Uruguay.
- Katz H. Histología del tracto reproductor de cachorras de lobo fino sudamericano (*A. australis*, Zimmerman 1783). 13^a Reunión de Trabajo (RT) y 7^o Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos (SOLAMAC). 13 al 17 de octubre de 2008. Montevideo, Uruguay.
- Katz H. Aplicaciones de técnicas de RIA en animales silvestres. Curso: Herramientas moleculares para el diagnóstico. Coordinadora: Dra. Graciela Pedrana. Área de Histología y Embriología. Facultad de Veterinaria. Montevideo. 22 al 25 de junio de 2010.



RESUMEN

Los mamíferos marinos constituyen interesantes modelos de estudio para el análisis de adaptaciones a condiciones de vida extrema. El lobo fino sudamericano (*A. australis*) es un pinnípedo ampliamente distribuido por Sudamérica, siendo las colonias uruguayas las más numerosas. Sin embargo, son escasos los estudios macro y microanatómicos realizados que aporten al conocimiento de la biología reproductiva de esta especie así como su posible adaptación al buceo. El **objetivo** de este trabajo fue realizar el estudio histológico de los ovarios y tracto reproductor de cachorras de lobo fino (*A. australis*) así como las características morfométricas de los folículos ováricos. Las muestras fueron obtenidas de animales varados en la costa atlántica uruguaya. De los ejemplares necropsiados se registraron características morfológicas generales. Los ovarios y diferentes sectores del tracto reproductor fueron seccionados y procesados por técnicas histológicas estándar. **Resultados:** **1.-** El peso promedio de los ovarios fue de $0,377 \pm 0,02$ g/ovario observándose un aumento gradual del peso a medida que las cachorras iban creciendo. **2.-** Los ovarios de *A. australis* prepuberales presentaron características histomorfológicas similares a las de otros pinnípedos, en particular por la presencia del sistema de criptas subcapsulares. Sin embargo, la presencia de abundantes células intersticiales en etapas tempranas de la vida de estos animales es una diferencia relevante y aparentemente característica de *A. australis*. **3.-** Se evidenció un incremento gradual en el diámetro de los ovocitos, los núcleos y los folículos entre el folículo tipo 1 a tipo 5, existiendo un amplio rango de variación en el diámetro folicular de los folículos tipo 4 y 5. El espesor de la granulosa presentó un incremento entre los folículos tipo 3 y 4, mientras que entre los tipo 4 y 5 se observó una reducción. La teca, en los folículos tipo 3-4, estaba formada por 1-2 capas de células, mientras que en los de tipo 5 se observó un incremento del espesor. Los folículos tipo 1 y 2 se ubicaron en zonas superficiales de la corteza ovárica. El resto de los folículos presentaron una localización más profunda pero a su vez mucho más aleatoria. **4.-** La tuba uterina de cachorras de *A. australis* era similar a la de otros mamíferos. El epitelio de revestimiento presentaba células epiteliales cúbicas y cilíndricas. Se observaron cortes de nervios en el mesosálpinx y en la serosa debajo de la muscular. **5.-** el útero era de tipo bipartito; en los cuernos, la mucosa estaba revestida por un epitelio simple cúbico ó cilíndrico, con glándulas tubulares simples y el miometrio presentaba un importante desarrollo del estrato vascular. La porción de transición presentaba un epitelio cilíndrico a pseudoestratificado cilíndrico, las glándulas endometriales eran escasas y el miometrio estaba muy desarrollado con numerosos vasos sanguíneos y fibras nerviosas. En el cuerpo uterino, el epitelio era de tipo biestratificado, las glándulas endometriales eran escasas y sólo se encontraban en las zonas más craneales. El cérvix presentaba un epitelio estratificado cilíndrico, con un corion muy vascularizado y aglandular; la capa muscular era particularmente gruesa. **6.-** desde la porción de transición del útero hasta las zonas craneales de la vagina se encontraron fibras y ganglios nerviosos pertenecientes al Plexo de Frankenhauser. **7.-** la mucosa vaginal se observó revestida por epitelio estratificado cuyo espesor iba aumentando en sentido craneo-caudal. La muscular estaba formada por fibras lisas y estriadas. **8.-** en el vestíbulo, el epitelio de revestimiento era estratificado plano, pigmentado, queratinizado en las zonas más distales. Se identificaron estructuras anexas en el espesor del corion: las glándulas vestibulares mayores (o de Bartholin) y el lóbulo adiposo. En el límite con el atrio se encontraba el clítoris asociado a las glándulas vestibulares menores. **9.-** el atrio o cloaca presentó un epitelio estratificado plano queratinizado pigmentado, con unidades apoliposeáceas. **Conclusiones:** se realizó una descripción histológica detallada de los ovarios y tracto reproductor de las cachorras de lobo fino sudamericano (*A. australis*). Se describe por primera vez aspectos morfométricos de los folículos ováricos, así como los anexos glandulares y el lóbulo adiposo en la pared del vestíbulo. Los resultados obtenidos constituyen una base para poder evaluar cambios que ocurren en hembras adultas y los posibles mecanismos que intervienen y regulan el ciclo reproductivo de esta especie.



LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO Y LAS FIGURAS

A	A: adventicia AA: arterias AT: atresia temprana AAv: atresia avanzada al: alvéolos
C	ca: capilares CA: Cápsula del ovario CC: condición corporal Ci: células intersticiales CS: criptas subcapsulares cmv: complejo masivo vascular Ce: cérvix C: cuerpo uterino c: cápsula
E	ev: estrato vascular ee: epitelio endometrial EEM: error estándar de la media eep: epitelio estratificado plano Et: epitelio de transición er: epitelio de revestimiento
F	F: fimbrias fc: fibras colágenas fp: folículos pilosos FM: fibras musculares FME: fibras musculares estriadas FML: fibras musculares lisas FV: fórnix vaginal
G	g: ganglio nervioso ge: glándula endometrial gs: glándulas sebáceas gsu: glándulas sudoríparas GB: glándulas de Bartholin
H	H-E: hematoxilina y eosina
L	LA: lóbulo adiposo LC: longitud corporal LV: luz vaginal
M	M: muscular mu: mucosa mi: muscular interna me: muscular externa
N	N o n: nervio o fibra nerviosa
P	PAS-H: ácido peryódico de Schiff-hematoxilina PC: pared del cérvix PV: pared vaginal PFH: plexo de Frankenhauser
S	s: serosa



-
- T TCD: tejido conjuntivo denso
 TCL: tejido conjuntivo laxo
- U U: uretra
- V V: vagina proximal
 VV o V: venas
 VC: vasos del corion



1.- INTRODUCCIÓN

Es característica de los mamíferos euterios y los marsupiales, entre otras particularidades, el desarrollo de la progenie en el útero (gestación), y luego del nacimiento, la lactación hasta cierto grado de independencia de la cría. Los diferentes taxones han desarrollado ciclos reproductivos muy variados como forma de adaptación a su ambiente, los que surgen como resultado de fuerzas evolutivas y adaptativas a las condiciones más favorables para la supervivencia de las crías y perpetuación de la especie (Marshall's, 1984; Berta y Sumich, 1999).

Entre las características generales que definen los patrones y estrategias reproductivas de cada especie, en particular sobre las hembras, se destacan, la edad en que ocurre la pubertad, la extensión de los ciclos ovulatorios, el tipo de ovulación (espontánea o inducida o en diapausa), la manifestación de celo (conducta de estro) luego del parto o en otra fase del ciclo reproductivo, la extensión de la preñez y la ocurrencia de pseudopreñez y diapausa de la gestación, la ocurrencia de ciclos reproductivos estacionales o continuos. El estudio de la endocrinología reproductiva comenzó a ser estudiado en detalle por anatomistas a principios del siglo XX, a partir de investigaciones sobre las funciones de la hipófisis y las gónadas, hasta llegar a determinar el control neural que gobierna el sistema endócrino y gonadal. Desde entonces, los enfoques y métodos de estudio se han ampliado y perfeccionado hasta el nivel molecular (Bronson, 1989).

Por otro lado, en especies silvestres, la explotación indiscriminada de numerosas especies para obtención de determinados productos de consumo (carne, cueros, grasa, etc.) llegó a diezmar poblaciones enteras e incluso su extinción en la naturaleza. El conocimiento de la dinámica de las poblaciones, la productividad de un sistema y la capacidad extractiva (máxima) son enfoques algo más recientes en cuanto al uso sostenible de recursos naturales. Este punto de vista utilitario también se ha enriquecido por enfoques modernos en cuanto a la importancia en la conservación de los recursos nativos, la protección de los sistemas ecológicos y el mantenimiento de la diversidad biológica.

Más allá de los avances obtenidos hasta el momento, aún quedan numerosos vacíos de información básica, en particular sobre aquellas especies que carecen de valor comercial o no son prioritarias en la economía de un país. A pesar de estas dificultades, los estudios en ecología lentamente se han integrado a la biología de poblaciones, etología y fisiología, generando información mucho más enriquecedora. De la misma manera, las tradicionales anatomía macroscópica y microscópica se han asociado a otros métodos y áreas de estudio realizando valiosos aportes sobre mecanismos adaptativos o evolutivos de las especies en su ambiente, o de determinados sistemas biológicos que puedan funcionar como modelos de estudio para otras disciplinas.

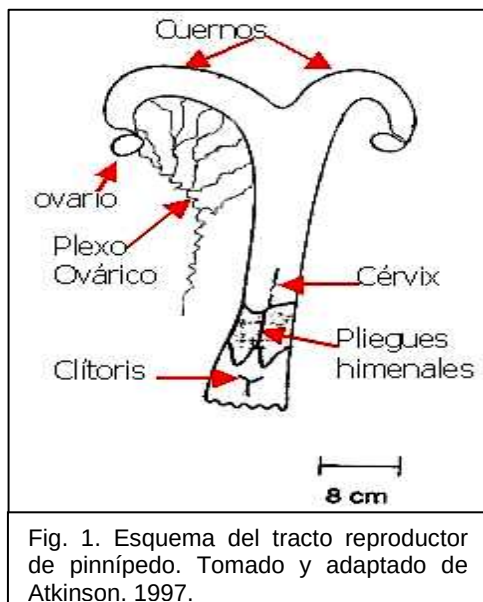


1.1- LA REPRODUCCIÓN EN PINNÍPEDOS

Anatomía del tracto reproductor femenino

El aparato genital femenino agrupa una serie de órganos que permiten la elaboración de gametos, hormonas, y en los mamíferos euterios alberga al feto en un segmento diferenciado que es el útero. Básicamente, el aparato genital de la hembra se compone de las siguientes porciones: 1) porción glandular endócrina y fuente de gametos, constituida por los ovarios, ubicados en la cavidad abdominal, 2) porción tubular, constituida por las vías genitales propiamente dichas y 3) el seno urogenital.

Atkinson (1997) describió el tracto reproductor femenino de los pinnípedos como una estructura similar al de los mamíferos terrestres, con la particularidad de un sistema de cierre localizado a 4-6 cm. de la entrada de la vagina llamado “pliegue himenal” (Fig. 1). Dicho pliegue está formado por tejido conjuntivo y células musculares. Tedman (1991) describe al pliegue himenal como pliegues de la mucosa vaginal que se extienden hacia la parte proximal del vestíbulo pero no le adjudica ninguna función específica, aunque se presume que evita la entrada de agua durante el buceo o permite bloqueo genital durante la cópula (Atkinson, 1997). A su vez, en especies acuáticas, la vulva se encuentra reducida y el vestíbulo se abre hacia un atrio o cloaca donde también desemboca el ano (Tedman, 1991).



Desde el punto de vista histológico, en hembras adultas, la mucosa uterina está formada por una lámina de células epiteliales apoyada sobre un estroma de tejido conjuntivo donde se localizan las glándulas endometriales (Buño y col., 1950; Boshier, 1981; Ouellette y Ronald, 1985; Atkinson y col., 1994.). En hembras recién nacidas y prepuberales, dichas glándulas están poco desarrolladas, son levemente enrolladas y la mayor parte de su luz está ocluida constituyendo cordones glandulares (Tedman, 1991). En hembras adultas (león marino de Australia, *Neophoca cinerea*), el cuerno preñado presenta un epitelio pseudoestratificado y las glándulas endometriales enrolladas se extienden hasta la profundidad del endometrio mientras



que el cuerno no preñado presenta el mismo epitelio pero menor desarrollo glandular (Tedman, 1991).

Con respecto a las trompas o tubas uterinas, la mucosa presenta numerosos pliegues revestidos por un epitelio alto sin cilias (Buño, 1950). Las descripciones realizadas por Tedman (1991) para hembras adultas lo señalan como similar al de otras especies domésticas, donde la estructura histológica de la tuba uterina varía de acuerdo a la etapa reproductiva y a las funciones que cumplen los diferentes sectores del órgano (Barone, 1990; Murray, 1995; Knobil, 1999).

Los ovarios generalmente son de forma ovoidea o redondeada y están rodeados por la bursa ovárica limitada por el mesosálpinx que los envuelve totalmente (Tedman, 1991; Atkinson, 1997). En general la ovulación ocurre en forma alternada en años consecutivos, excepto en la foca de Ross (*Ommatophoca rossii*), foca anillada y en la foca monje de Hawaii. En otáridos, el ovario del cuerno uterino no gestado es el que experimenta el crecimiento, desarrollo folicular y ovulación luego del parto; el cuerpo lúteo degenera rápidamente y se transforma en cuerpo albicans que permanece visible en la superficie ovárica durante la lactación en la mayoría de las especies (Atkinson, 1997).

Histofisiología ovárica

Desde el punto de vista histomorfológico, los ovarios de pinnípedos, proboscidios y algunos carnívoros presentan criptas subcapsulares (Zukerman, 1962) que son invaginaciones del epitelio superficial dentro de la túnica albugínea y corteza ovárica. Han sido descritas en varias especies de pinnípedos desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (fetos de 16cm. en foca de Weddel (*Leptonychotes weddellii*), Harrison, 1950), en fócidos recién nacidos (Harrison y Harrison, 1949; Amoroso y col, 1951) y en hembras sexualmente maduras (*L. weddellii*, Harrison y Harrison, 1949; *Otaria flavescens*, Buño y col, 1950). Mulling y col. (1998) describieron tres tipos de criptas subcapsulares en foca común (*Phoca vitulina vitulina*) de acuerdo a su localización y extensión.

En relación a las células intersticiales ováricas (*endocrinocytus interstitialis*), en algunos pinnípedos el número de células varía de acuerdo a la edad ó estatus/estación reproductiva (Harrison, 1950; Boshier, 1981; Corcuera, 1989; Skinner y Westlin-Van Aarde, 1989; Tedman, 1991; Mulling y col, 1998); en foca común (*P. vitulina*) la mayor proliferación celular ocurre durante el verano (estación reproductiva), coincidente con niveles muy altos de estrógenos en suero sanguíneo (17β estradiol, 350 pmol/l, Boyd, 1983). Sin embargo, el significado funcional de estas células es aún desconocido. Aparentemente, en foca común, la función principal de las criptas es



la formación de cordones celulares durante el primer año de edad; posteriormente estos cordones son activados y se diferencian en células intersticiales luego de la pubertad (Mülling y col, 1998). Por otra parte, en diferentes especies mamíferas las células de la teca interna se hipertrofian y transforman en células intersticiales, a veces formando una glándula alrededor del folículo (taltuza, *Orthogeomys* spp.), grandes islotes de células (musaraña, Fam. Soricidae) o constituyendo el tejido ovárico remanente luego de la atresia de los folículos y cuerpo lúteo (coneja, Fam. Leporidae). En aquellas especies donde la presencia de estas células es una característica del ovario, presentan diferentes orígenes: en la etapa fetal y postnatal se pueden originar a partir de células tipo mesenquimales; en hembras sexualmente maduras o adultas son originadas por hipertrofia de células tecales de folículos atrésicos grandes o por células estromales interfoliculares (Guraya y Greenwald, 1964; Guraya y Uppal, 1978; Mota y Hafez, 1980; Eckery y col, 2002). En hembras adultas, sus características ultraestructurales, histoquímicas y bioquímicas son típicas de células productoras de esteroides, aparentemente para la síntesis de progesterona y andrógenos (Mota y Hafez, 1980). Tanto las descripciones histomorfológicas como la determinación de las funciones de estos componentes del ovario en pinnípedos sudamericanos aún no se han realizado con precisión.

Con respecto a la dinámica de las hormonas sexuales en pinnípedos, sólo se cuenta con escasas referencias que relacionan la estructura ovárica y algunas hormonas sexuales en hembras adultas (Craig, 1964; Daniel, 1981; Atkinson y col., 1997). En focas comunes prepuberales (*Phoca vitulina vitulina*) se encontró que la concentración de esteroides sexuales es muy baja o indetectable (Noonan, 1989; Pietraszek, 1992 y Gardiner, 1996, citados por Atkinson, 1997), mientras que en hembras adultas, durante la estación reproductiva, alcanzan niveles muy altos (Boyd, 1983). Estos hallazgos son compatibles con los datos obtenidos por Browne y col. (2006) quienes mediante inmunohistoquímica identificaron la expresión de enzimas esteroideogénicas en ovario asociadas a la síntesis de andrógenos, cuya concentración en suero se encuentra en altas concentraciones durante la diapausa.

Hasta el momento no se ha descrito la dinámica de hormonas sexuales ni en cachorros ni en adultos de otáridos sudamericanos.

Estacionalidad, ciclos reproductivos y diapausa

Los pinnípedos presentan una estación reproductiva muy marcada en el verano tanto boreal como austral. De acuerdo a los diferentes géneros del Orden Pinnipedia, la actividad reproductiva se extiende por un periodo de 2-3 meses. Los fócidos y otáridos presentan un estro postparto, donde simultáneamente ocurre una rápida



regresión del cuerpo lúteo de gestación en un ovario junto con un rápido crecimiento folicular en el ovario contralateral hasta la ovulación y formación de un nuevo cuerpo lúteo (Berta y Sumich, 1999).

La gestación en los pinnípedos se extiende entre 9 a 12 meses incluyendo un período de 3 a 5 meses de diapausa embrionaria, permaneciendo el cigoto en estado de blastocisto (Boshier, 1981). Esta característica, además del Orden Carnívora (incluye a las Familias Mustelidae, Ursidae, Otariidae, Phocidae), también está presente en otros mamíferos (Marsupialia, Rodentia, Artiodactyla, Chiroptera, Edentata, Insectivora). Poco se sabe sobre los mecanismos fisiológicos y metabólicos que promueven la detención del desarrollo embrionario. De los factores ambientales que influyen la diapausa se mencionan al fotoperíodo y la nutrición, y entre los fisiológicos la lactación. Si bien los mecanismos fisiológicos varían en cada grupo biológico o taxón, el resultado ecológico es la sincronización de la actividad reproductiva: existe un prolongamiento del período de gestación activo que “coordina” la actividad de cópulas y partos en los momentos óptimos del año para la especie, ya sea para la supervivencia de la cría o la disponibilidad de alimento para la madre (Renfree y Shaw, 2000; Lindenfors y col, 2003). En los pinnípedos estudiados, el cese de la diapausa e implantación embrionaria ocurre cuando el fotoperíodo es decreciente (Marshall's, 1984).

En general, las hembras pinnípedas son monotocas. Raramente paren mellizos o trillizos (sólo documentado en foca gris en cautividad) (Berta y Sumich, 1999). El ciclo estral o de cría es anual, presentando un estro y siguiente ovulación una a dos semanas postparto. La ovulación es espontánea; en *C. ursinus* el celo ocurre aproximadamente de 3 a 5 días postparto si se asume que la cópula y la ovulación ocurren casi simultáneamente (Craig, 1964). Excepciones a estos ciclos tan sincronizados lo constituyen: **1)** la morsa (*Odobenus rosmarus*) que es poliéstrica, y que presenta actividad estral a los 4 y 10 meses postparto (Trillmich, 1996); **2)** el león marino de Australia (*Neophoca cinerea*) posee ciclos reproductivos de 18 meses (Gales y col. 1997); **3)** la foca monje de Hawái (*Monachus schauinslandi*) en cautividad es poliéstrica (Berta y Sumich, 1999). Aparentemente la foca grise (*Halichoerus grypus*) también presenta actividad poliéstrica (Berta y Sumich, 1999).

Las fallas reproductivas en mamíferos marinos son difíciles de diagnosticar. En el lobo fino de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*) se pudo determinar que las fallas en las etapas media y avanzada de gestación activa, parecen ser las más importantes en determinar el éxito reproductivo de la especie debido a la mayor demanda energética que tiene que enfrentar la madre entre el crecimiento fetal y la lactación (McKenzie y col, 2005).



En pinnípedos sudamericanos son escasos los trabajos sobre estacionalidad y ciclos reproductivos y hasta el momento no se han llegado a determinar las posibles causas del decrecimiento poblacional en diferentes colonias de *A. australis* y de *O. flavescens*.

Pubertad

La **pubertad** se define como el período en el que existe una maduración de varios procesos morfológicos, fisiológicos y comportamentales que permiten la cópula, fertilización, implantación y gestación, es decir, donde se establece el primer período fértil o primera implantación embrionaria (Marshall's, 1984; Atkinson, 1997). En la mayoría de los mamíferos, los fenómenos presentes en el ciclo estral se producen una vez alcanzada la pubertad, aunque previamente desde el nacimiento ocurren ciclos de desarrollo folicular ovárico independientemente del efecto de las hormonas gonadotrópicas (Evans, 2003). El inicio o programación ("timing") de la pubertad es una función de cambios del sistema neural que controla la secreción de GnRH, reflejando la integración de múltiples claves internas y externas que actúan bajo determinados procesos genéticos. En particular, el sistema de secreción de la GnRH integra información sobre combustibles metabólicos, almacenes de energía y desarrollo somático, así como información sobre el fotoperíodo y el ambiente social (Ebling, 2005).

Las diferentes especies de pinnípedos alcanzan la madurez sexual en momentos o etapas variables. Generalmente, las hembras maduran antes que los machos. En el lobo marino sudafricano (*Arctocephalus pusillus pusillus*) y la foca cangrejera (*Lobodon carcinophagus*) este evento ocurre al final del segundo año de vida, mientras que las focas comunes (*Phoca vitulina*) alcanzan la madurez entre los 5 y 6 años de vida (Marshall's, 1984). Por otro lado, en lobas marinas del norte (*C. ursinus*) se ha registrado que el primer ciclo reproductivo puede ocurrir en un rango entre los 2 a 6 años debido a influencias ambientales e individuales (Craig, 1964).



1.2.- MODELO DE ESTUDIO: el lobo fino sudamericano (*Arctocephalus australis*).

La actividad científica en mamíferos marinos ha surgido como disciplina en sí misma en los años 60'-70' (Berta & Sumich, 1999). El objetivo de los primeros estudios fue obtener información precisa de la biología de estos animales. En la década del 50 surgieron investigaciones enfocadas en ecología de poblaciones, lo que promovió el estudio en la anatomía y fisiología de los mamíferos marinos (Buño y col, 1950; Amoroso y col. 1951; Berta & Sumich, 1999) a partir de muestras de animales varados como de animales sacrificados con fines científicos. A su vez, el estudio del éxito reproductivo es un tema aún más reciente (Boyd, 1983; Hobson & Boyd, 1984).

De las 33 especies de pinnípedos descritos, la mayoría de las poblaciones sufrieron reducciones drásticas por la caza indiscriminada con fines comerciales realizadas hasta principios del siglo XX (Berta & Sumich, 1999; Gerber y Hilborn, 2001). Luego del establecimiento de normas de manejo sustentable, la mayoría de las especies se recuperaron numéricamente pero otras han seguido declinando debido a una baja tasa de nacimientos (Browne y col. 2006). Se especula que las posibles causas pueden incluir la contaminación ambiental por bioacumulación de tóxicos o xenobióticos en la cadena alimentaria que interfieren con la dinámica de hormonas esteroideas y tiroideas (Vos y col., 2000; Browne y col., 2006; Schnitzler y col, 2008), estrés nutricional por disminución en la abundancia de presas y competencia con la pesca comercial (Trites y col., 2003), factores climáticos (Gerber y Hilborn, 2001), enfermedades infecciosas o parasitarias (Olsen & Lyons, 1962; Barret y col., 1995), enmalles, caza ilegal, derrames de químicos, y otras (Gerber y Hilborn, 2001).

Es particularmente llamativo que varias de las poblaciones de pinnípedos han registrado lo que se denomina "eventos catastróficos" debido a una reducción rápida de la disponibilidad de alimento por efectos naturales: el fenómeno de "el Niño" está asociado a cambios drásticos en el ecosistema marino con la consecuente reducción en la productividad en la columna de agua (Gerber y Hilborn, 2001); en estas condiciones, las hembras deben realizar viajes de alimentación más prolongados (sobreactividad física) y en menor frecuencia llevando a una mayor mortalidad de cachorros (hasta el 100% en algunas poblaciones) y juveniles así como una mayor mortalidad de hembras, reducción en la tasa de preñez y nacimiento, retraso en la pubertad y en las fechas de parto (Trillmich y Lindberg, 1985; Soto y col., 2004).



Características generales de *A. australis*

Arctocephalus australis (Zimmermann, 1783), comúnmente llamado “lobo fino” o “de dos pelos”, es un pinnípedo (Mammalia, fam Otariidae) autóctono del continente sudamericano (Fig.2).

Se distribuye desde el sur de Brasil y Perú en dirección austral en diferentes colonias localizadas en Uruguay, Argentina y Chile (Fig. 3). Nuestro país alberga la mayor colonia reproductiva de esta especie ubicada en diferentes islas e islotes de los departamentos de Maldonado (Isla de Lobos) y Rocha (conjunto de islotes perteneciente al grupo de Isla de Torres frente a Cabo Polonio: Rasa, Encantada y el Islote; islote frente a Barra de Valizas: en Isla del Marco) (Fig. 4 a y b) estimándose una población total de 300.000 individuos (Páez, 2000). Comparten la mayoría de los asentamientos con leones marinos, *Otaria flavescens* (= *O. byronia*), existiendo diversas interacciones sociales entre ambas especies (rapto de hembras y cachorros, Páez y otros, com. pers; H. Katz, obs pers.).



Fig. 2. Cachorro de *A. australis*. Isla de Lobos, Uruguay.

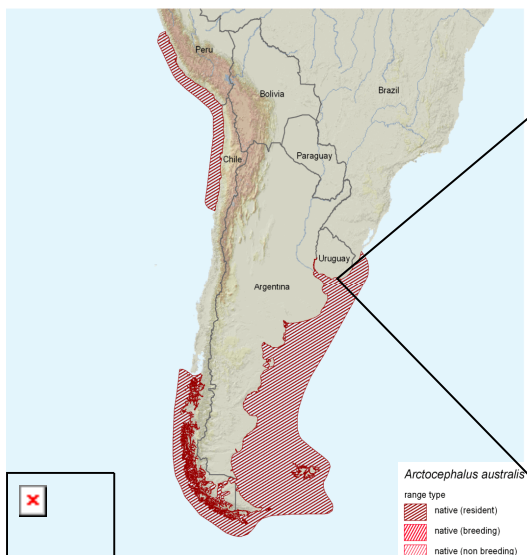


Fig. 3. Mapa de distribución del lobo fino sudamericano de *A. australis*. Tomado y adaptado de www.ucin-redlist.org.

Fig. 4a. Islas de Cabo Polonio, Rocha. Uruguay. (Msc. Valentina Franco).



Fig. 4b. Isla de Lobos, Maldonado. Uruguay. (Msc. Micaela Trimble).



En Uruguay hasta el año 1991, la explotación de esta especie se basaba en la comercialización de cueros, testículos y aceite. Actualmente la industria lobera representa un importante atractivo turístico y un rubro de exportación no tradicional con destino a acuarios y zoológicos (Ponce de León, 2003). Si bien durante el período de faena se realizaron algunos estudios de morfometría externa, tasa de crecimiento y preñez (Lima y Páez, 1995), casi no se llevaron a cabo trabajos macro o microanatómicos (Corcuera, 1989) o histofisiológicos sobre las adaptaciones anatómica y funcional del aparato reproductor al ambiente marino.

Desde el punto de vista demográfico, la población de *A. australis* en Uruguay (Océano Atlántico sur-occidental) presenta una tasa de crecimiento anual del 3,3% (Franco Trecu, 2010); sin embargo, en las costas del Pacífico en Perú esta especie sufrió una reducción del 72% (aproximadamente 25.000 en 1997 a 6.000 en 1998, Instituto del Mar del Perú, I.MAR.PE.), luego que el fenómeno de “El Niño” causó una baja disponibilidad de alimento; la recuperación de la población peruana es difícil de evaluar y la especie está incluida dentro de la Convención CITES de especies protegidas así como amparada en la legislación peruana para su protección (De Oliveira y col., 2006). Un caso similar ocurre en nuestro país con *O. flavescens*: mientras en la mayor parte de las colonias reproductivas del continente la población mantiene un crecimiento estable, en Uruguay la población de leones marinos está experimentando una reducción del 1,7-2% anual (población aproximada en 2005: 12.000 individuos; Páez, 2006) y la/s causa/s no está/n determinada/s.

Como otras especies de otáridos, los *A. australis* son carnívoros estrictos, alimentándose de especies pelágicas (Vaz-Ferreira, 1976a; Naya y col, 2002) y de zonas costeras (Franco Trecu, 2010). Los hábitos alimentarios de los mamíferos marinos están en estrecha asociación con su capacidad de nado y buceo, en particular la resistencia a la apnea, a la hipoxia y las presiones que son ejercidas por la columna de agua durante la inmersión a grandes profundidades (Reidemberg, 2007). Los registros de buceo obtenido por diferentes investigadores muestran que las hembras en el periodo de lactación realizan buceos de hasta 186m ($23,5 \pm 19,5$ m) de profundidad y un tiempo promedio de $1,2 \pm 0,8$ min (máx. 5,3min) (York y col., 1998; Riet y col., 2010); en conjunto estos datos sugieren que las hembras de *A. australis* realizan buceos tanto bentónicos y epi-pelágicos como estrategia adaptativa a la búsqueda de alimento, demostrando a su vez la enorme resistencia al ejercicio en profundidad, la apnea y la capacidad de nado por las distancias recorridas: se encontraron en el sur de Brasil (30-31° latitud sur), carcadas de hembras preñadas (6 a 8 meses de gestación, a partir de setiembre), que habrían estado realizando la etapa



pelágica de forrajeo, con viajes más largos y prolongados en busca de alimento (de Oliveira y col, 2006).

Con respecto a las características físicas, las hembras adultas pesan entre 45-57 Kg. y miden de 110-147 cm. de largo (Vaz Ferreira, 1982a). Es una especie longeva, pudiendo alcanzar los 25-30 años (Lima y Páez, 1997). Existe un marcado dimorfismo sexual que se manifiesta a partir de la pubertad, caracterizado no solamente por las diferencias en el largo y peso corporal sino también por el mayor desarrollo de masa muscular, depósito de grasa y pelo más largo en la región del cuello y pecho en los machos (Vaz Ferreira, 1982a). Los cachorros nacen con un peso de 3,3-5,4 Kg. y una longitud de 56-62 cm.; aproximadamente a los 10 meses de edad, los machos pesan 20,2-24,1 Kg. y miden 89-95 cm. de longitud, mientras que las hembras pesan 16,3-21,8 Kg. y miden 86-93 cm. (Vaz Ferreira y Ponce de León, 1987). Desde el punto de vista externo cachorros machos y hembras son difíciles de discriminar, por lo que el sexado se realiza mediante examinación del atrio o cloaca o la presencia de orificio prepucial.

Biología reproductiva de hembras de *A. australis*.

De acuerdo a Vaz Ferreira y Ponce de León (1987) la pubertad en *A. australis* (primer celo "fértil") ocurre entre los 3 a 5 años de edad (datos obtenidos a partir de hembras marcadas y largo total mayor a 1,19 mts.) cuando alcanzan el 80% de su longitud de adulto e ingresan al stock reproductivo (Lima y Páez, 1995); sin embargo, algunas hembras pueden presentar su primer celo a los 2 años de edad (largo total 1,06 - 1,18 mts; Vaz Ferreira y Ponce de León, 1987; Corcuera, 1989).

Las hembras son monoéstricas anuales, con marcada estacionalidad reproductiva (partos y cópulas) que se extiende desde fines de noviembre a fines de diciembre (Ponce de León, 1983) registrándose algunos de estos eventos hasta principios de enero (V. Franco, com. pers 2009 y anteriores; H. Katz obs.pers. 2010). Paren un cachorro por estación y manifiestan el celo entre los 5 y 8 días luego del parto (Ponce de León, 1983). Franco Trecu (2005) en la temporada 2004-2005 observó el pico de nacimientos el 15 de diciembre, con un período de sincronización (primer y última observación de partos) de 35 días.

Los trabajos realizados en nuestro país (Vaz Ferreira y Ponce de León, 1987) sugieren que las hembras de *A. australis* presentan diapausa y el comienzo de la implantación uterina aparentemente ocurre entre marzo-abril (fotoperíodo decreciente) (Vaz Ferreira, 1979). Estos eventos sólo se han evidenciado por ausencia de embrión o feto en útero luego de la estación reproductiva, en presencia de cuerpo lúteo (Páez, com. pers.) pero no a través de un diagnóstico específico (recuperación uterina del



blastocisto, análisis de dinámica hormonal o factores de gestación, ecografía, etc.). El tiempo total de gestación es aproximadamente de 11 a 12 meses (9 meses de implantación uterina), coincidente con el cuidado y amamantamiento de la cría nacida en la temporada anterior.

La lactación en *A. australis*, se extiende de 8 a 12 meses; durante los primeros 7 meses la lactación es exclusiva, pero a partir del octavo mes (agosto, Ponce de León, 1983b) comenzaría la etapa de destete evidenciado por la presencia de cuerpos extraños en el estómago indicativos del probable comienzo de la búsqueda de presas (arena, piedras, conchas de pequeños moluscos; Ponce de León, 1983b; algas, crustáceos y nylon, H. Katz, obs. pers.), quizás cuando las madres realizan viajes de alimentación mas largos, ocurriendo en octubre el destete masivo de cachorros (Ponce de León, 1984). Este comportamiento es coincidente con las etapas finales de gestación (segundo y tercer tercio de gestación) cuando ocurre el mayor crecimiento fetal (McKenzie, 2005). En las figuras 5 y 6 se representa esquemáticamente el ciclo reproductivo de *A. australis*.

Por otro lado, en algunos ejemplares, la lactación puede prolongarse aún más en el tiempo, donde la madre amamanta a los cachorros nacidos en 2 temporadas reproductivas sucesivas (Vaz Ferreira y Ponce de León, 1987; H. Katz, obs. pers. 2009) con una importante inversión energética por parte de la hembra. Los datos aportados por Lima y Páez (1995) indican que hembras en lactación y preñez simultánea influyen negativamente el crecimiento fetal (comparado con hembras no lactantes). Quizás la implantación sea más temprana para hembras no lactantes, permitiendo un mayor crecimiento del feto. De aquí que la *diferencias en la “extensión” de la diapausa sea un mecanismo adaptativo* donde las etapas más intensas y energéticamente más demandantes de la lactación (primeros meses) estarían separadas de la gestación activa.

En relación a los ovarios de *Arctocephalus* spp. (*A. pusillus*, Rand, 1954; *A. australis*, Corcuera, 1989) existen escasos estudios descriptivos sobre la histología ovárica en ejemplares adultos y menos aún en animales prepuberales; tampoco se describen los posibles cambios que experimenta el ovario previo a la madurez sexual. El trabajo realizado por Corcuera (1989) incluye la histología de 2 hembras juveniles y 3 adultas, describiendo algunos cambios morfométricos en diferentes etapas del ciclo reproductivo; sin embargo, en su muestreo, la mayor parte de los ovarios sólo fueron analizados macroscópicamente. Es probable que ocurran modificaciones morfofuncionales importantes de este órgano durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo, asociado al control de los diferentes eventos que ocurren en el tracto reproductor en dicho ciclo tal como se ha descrito en otras especies.



Fig. 5. Ciclo reproductivo de *A. australis* con la probable duración de las diferentes etapas de diapausa, implantación embrionaria y gestación activa, así como de la lactación y destete de las crías. Tomado y adaptado del ciclo de *A. forsteri* por McKenzie y col, 2005.

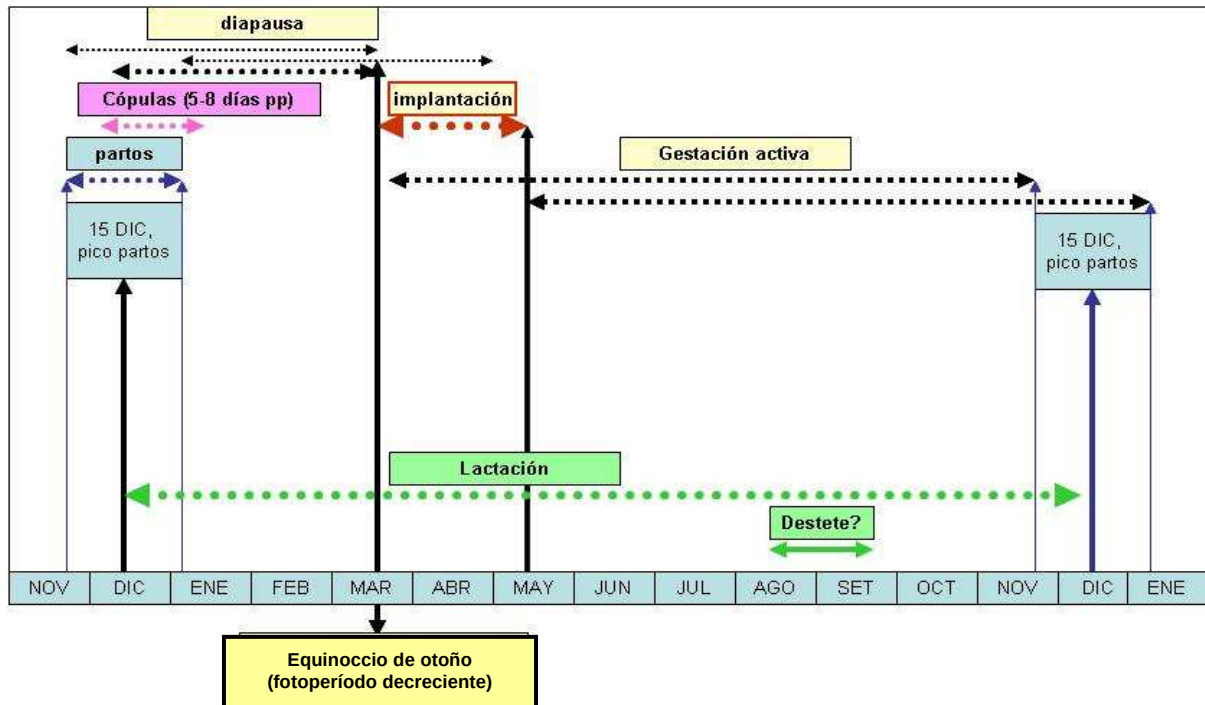


Fig. 6. Esquema simplificado del ciclo reproductivo de *A. australis*. Si bien existen datos sobre los períodos entre parto y la cópula, aún no se ha registrado en forma precisa el período de diapausa e implantación embrionaria en *A. australis* en Uruguay.





2.- HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

A pesar que nuestro país cuenta con una de las mayores colonias reproductivas de lobo fino sudamericano (*A. australis*), existen importantes vacíos de información sobre aspectos biológicos básicos, y en particular, de la estructura microanatómica de los ovarios y del tracto reproductor.

De esta situación surge la necesidad de obtener parámetros normales característicos de la especie que sirvan como referencia para evaluar posibles interacciones negativas que afecten la fertilidad, tasas de nacimiento y dinámica poblacional.

2.1.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las características histológicas del tracto reproductor de las cachorras de *A. australis* son similares a las de otros pinnípedos o carnívoros domésticos.

Existen diferencias histomorfológicas importantes en cachorras de diferente rango de edad.

2.2.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Realizar la descripción histomorfológica de los ovarios y el tracto reproductor femenino de cachorras de lobo fino, *Arctocephalus australis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

En cachorras de *Arctocephalus australis*:

- 2.1.- Describir las características histológicas de los ovarios.
2. 2.- Analizar la estructura y distribución de la población folicular ovárica por métodos morfométricos.
- 2.3.-. Describir las características histológicas de la tuba uterina, útero, cérvix, vagina, vestíbulo y atrio.
- 2.4.- Comparar los hallazgos histológicos obtenidos en esta especie con aquellos ya obtenidos en otras especies de pinnípedos.
- 2.5.- Describir las características corporales generales de las cachorras de *A. australis*.



3.- ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Para el presente trabajo de investigación, la estrategia se basó en la colecta de ejemplares varados en las playas, muertos por causas naturales y está sustentado por las siguientes razones:

1.- amplia disponibilidad de animales varados; dada la cercanía de las colonias reproductivas a las playas continentales, la presencia de animales varados es un hecho bastante frecuente. Por otro lado, los cachorros son los que se obtienen con mayor disponibilidad comparado con los ejemplares adultos (en el período 2001-2010 de salidas a Cabo Polonio e Isla de Lobos se necropsiaron 52 cachorras y sólo 4 adultas).

2.- material de calidad aceptable para realizar diagnósticos histológicos; la cercanía de las colonias a la costa o el trabajo en la propia Isla de Lobos, permitió obtener animales con escasas horas post-mortem (en *rigor mortis*). De aquí que el material obtenido para estudios histológicos fue de calidad aceptable.

3.- aprovechamiento integral de los animales varados; además de los análisis histológicos se realizaron estudios de parasitología, bacteriología y anatomía (Morgades y col, 2006; Castro Ramos y col, 2006; Pérez y col. 2008). El uso de cadáveres permite obtener material para investigación sin necesidad de realizar eutanasias con fines científicos.

4.- costo relativamente bajo de trabajo y materiales de laboratorio; el trabajo de campo para la obtención de muestras y su posterior procesamiento en el laboratorio se realizó con escasa financiación y no requirió grandes inversiones iniciales para la realización del trabajo.

En suma, la obtención de información anatómica e histológica básica a partir de las muestras obtenidas en las condiciones mencionadas, permitirá encarar futuros trabajos con ejemplares vivos, cachorros o adultos, mediante otras metodologías y que puedan aportar sobre la biología reproductiva de estos pinnípedos.



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se trabajó con muestras obtenidas a partir de cadáveres encontrados en Cabo Polonio (34°24'01'' Sur, 53°46'06'' Oeste, Rocha) (Fig. 6), Isla de Lobos (35°01'38'' Sur, 54°52'55'' Oeste, Maldonado) y ejemplares cedidos por centros de rehabilitación (ONG PRO.FAU.MA y SO.CO.BIO.MA). Para la colecta de materiales se contó con permiso otorgado por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos-Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DINARA-MGAP) (N° 584/2006).

La mayor parte de los animales fueron colectados en las playas de Cabo Polonio (Fig. 6) e Isla de Lobos. Durante las salidas de campo, se realizaron caminatas por las playas en busca de animales varados.

Las necropsias se realizaron por métodos convencionales (Dierauf, 1990). Se seleccionaron ejemplares frescos (n= 23) que fueron clasificados por su grado de descomposición en una escala subjetiva de 1 (fresco) a 4 (avanzado) (ver anexo 1).

De cada ejemplar se registraron medidas del longitud corporal (LC; desde la punta de la nariz a la punta de la cola en línea recta) y perímetro torácico (cm. $\pm$ 1cm). La edad de los animales fue estimada de acuerdo a sus características morfométricas (Vaz Ferreira y Ponce de León, 1987) y a la fecha de muestreo para agrupar a los animales en diferentes categorías o rangos: **1)** cachorro o lactante; **2)** cachorro destetado; **3)** juvenil. No se incluyeron ejemplares adultos. Se estimó la condición corporal midiendo el espesor de la grasa subcutánea a nivel del apófisis xifoides y clasificando a los ejemplares de acuerdo a una escala arbitraria (cm. $\pm$ 0,1cm) (Tabla 1). Luego de las necropsias se procedía al entierro de las carcasas.

TABLA 1. Clasificación de la condición corporal (CC) en cachorras de <i>A. australis</i>.		
Condición corporal	Descripción subjetiva	Espesor de la grasa subcutánea (rango en cm)
CC 1	Emaciado/Mala CC	0 a 0,5
CC 2	Magro/Regular CC	0,6 a 1,5
CC 3	Buena CC	1,6 a 3,0

Los órganos del tracto reproductor (ovarios, útero, cérvix, vagina, vestíbulo, atrio) se extrajeron *in toto* junto con la vejiga urinaria luego de realizar un corte en la sínfisis pubiana (Fig. 7). Posteriormente fueron fijados por inmersión en formol al 10% (Fig. 8). Para facilitar la fijación se realizaron pequeñas incisiones en el cérvix, cuerpo

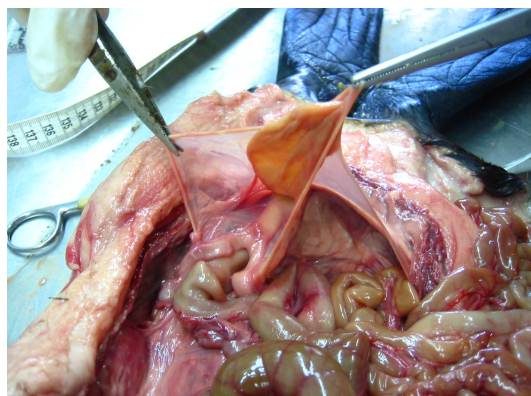


Fig. 7. Diseccción de tracto reproductor de cachorra de *A. australis*.



Fig. 8. Fijación del tracto reproductor por inmersión.

y cuernos del útero; los ovarios fueron separados del mesosálpinx y cortados por su eje mayor.

3.2) PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

De acuerdo al grado de descomposición, las muestras fueron utilizadas para morfometría externa (peso y talla) y/o estudios histológicos.

El peso de los ovarios (N° hembras= 17) fue tomado postfijación, disecándolos completamente de la mayor parte del tejido conjuntivo asociado al hilio del órgano. Se utilizó una balanza electrónica de precisión ($\pm 0,0001$ g) luego de haberlos secado del líquido de fijación donde estaban inmersos.

En los ovarios se evaluó la presencia o ausencia de cuerpo lúteo y folículos antrales para complementar la estimación de edad de los animales (pre o postpuberales).

El sector canalicular del tracto reproductor, desde los cuernos uterinos hasta el vestíbulo o atrio/cloaca, fue seccionado transversalmente y procesado en sus diferentes regiones. Los cuernos uterinos fueron divididos y analizados en cuatro sectores que se describen de la siguiente manera: los brazos fueron cortados en tres partes denominadas: proximal, medio y distal, y el sector unificado caudal fue denominado “de transición”. El cuerpo uterino fue cortado en una o dos partes: la mitad proximal incluyó el velo del útero, mientras que la distal correspondió a la cavidad común y/o a la porción uterina del cérvix. El cérvix fue seccionado en una o dos secciones que incluyeron el canal cervical o la porción vaginal del cérvix. El sector canalicular desde la vagina al atrio fue dividido en cinco a siete secciones que tomaron en forma aproximada cada uno de los diferentes sectores del tracto (vagina, vestíbulo, atrio/cloaca).

Las muestras de ejemplares frescos (grado 1-2; n= 12) conservadas en formol (10%), fueron posteriormente procesadas mediante técnicas histológicas estándar



(Luna, 1992). Se realizó el siguiente procedimiento: lavado en agua corriente, deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol (70-96-100°), diafanización en cloroformo, pasajes por parafina e inclusión, corte (micrótomo rotacional Reichert Jung, Germany) a 5-7µm, coloración con hematoxilina-eosina (H-E), Van Giesson y ácido peryódico de Schiff-hematoxilina (PAS-H); éstas dos últimas técnicas se utilizaron para evidenciar estructuras, componentes o contenidos de naturaleza glucoproteicas (PAS positivas) y características del estroma. Para los estudios de morfometría se realizaron de 50 a 100 cortes seriados por ovario.

Para la descripción microanatómica se utilizó la Nómina Histológica Veterinaria (1992).

3.3) DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Las láminas de los diferentes órganos reproductores fueron evaluadas en relación a la calidad de fijación y grado de autólisis, y fueron utilizadas para la descripción general del órgano y morfometría.

Histología cuantitativa.

Para el análisis cuantitativo se seleccionaron los preparados que tuvieran las siguientes características: 1) menor grado de autólisis, 2) presentaran las características morfológicas normales, 3) procedieran de hembras de aproximadamente la misma edad (de acuerdo a la fecha de obtención de la muestra y características morfométricas). Se procesaron los ovarios de 12 hembras pero sólo 8 ovarios fueron aptos para el estudio morfométrico (4 descartados por autólisis). Se procesaron ambos ovarios de cada hembra, obteniéndose al menos 50 cortes de cada ovario.

Las muestras fueron analizadas y fotografiadas en el laboratorio de análisis de imágenes del Área de Histología y Embriología de la Facultad de Veterinaria. Se utilizó: microscopio óptico (BX50, Olympus, Tokyo, Japón) conectado a una cámara digital y a una computadora personal conteniendo el software para captura y análisis de imágenes (Image Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA; Infinity, INFINITY Software v4.6). Se tomaron fotomicrografías de los folículos con características normales (sanos) de las diferentes categorías donde era observable claramente el núcleo y el nucléolo (para evitar fotografiar dos veces el mismo folículo en los cortes de la serie).

Para el análisis morfométrico se utilizó el programa ImageJ (acceso libre). Las mediciones se realizaron en al menos 30 folículos tipo 1 de cada ovario por animal y en todos los folículos sanos observables en el resto de las categorías foliculares



restantes (tipo 2 a 5, debido a su escaso número en los ovarios y cortes estudiados), y en todos los casos donde se observó el núcleo y el nucleolo. La calibración de la herramienta de medida lineal o regla del programa fue realizada mediante una regla graduada (1000µm en subdivisiones de 10 µm) y grilla graduada (Olympus, 10µx100x100), fotografiadas a los mismos aumentos que las fotografías de los cortes histológicos (4x, 10x, 40x).

Se registraron las siguientes variables de acuerdo a la clasificación histológica propuesta por Grimes y col. (1987) y Lundy y col. (1999) (Anexos 2 y 3):

- 1.- Diámetro folicular
- 2.- Espesor de la granulosa.
- 3.- Espesor de la teca.
- 4.- Diámetro del ovocito.
- 5.- Diámetro del núcleo del ovocito.
- 6.- Clasificación de folículos preantrales y antrales con normal desarrollo o diferente grado de atresia.
- 7.- Profundidad media de ubicación de los diferentes tipos foliculares.

Para el cálculo del diámetro promedio de las diferentes variables planteadas, se tomaron el diámetro mayor y el menor en sentido perpendicular y se realizó el cálculo de la media por cada ovocito/núcleo/folículo de cada ovario analizado (ver análisis estadístico).

Para el espesor de la granulosa como para el de la teca se tomaron medidas de cada una de las capas celulares en 6-8 puntos diferentes alrededor de todo el perímetro de cada folículo cuya citoarquitectura estuviera bien preservada.

Sólo se tomaron medidas del espesor de la teca de aquellas células que estuvieran bien diferenciadas morfológicamente (núcleo más heterocromático) y en estrecho contacto con las células de la granulosa, es decir, no desprendidas por retracción ni artefacto de técnica.

Los núcleos analizados fueron aquellos que presentaban un aspecto normal, con perfil redondeado o elíptico y nucleolo evidente, evitando así medir el mismo folículo dos veces.



3.4) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Características físicas de las cachorras

Para cada rango de edad de las cachorras se calculó la media ($\pm$ EEM) de la longitud corporal y los datos fueron analizados por ANOVA mediante el programa Instat y Past (acceso libre) (significativo $p < 0,05$). La condición corporal por rango de edades fue analizada mediante Test de Fisher en una tabla de 2×2 ; los datos fueron agrupados entre animales de entre 0 a 6 meses y 7 a 18 meses, por buena CC (CC 2 y CC 3 agrupadas) y mala CC (CC1).

Morfometría ovárica

Los datos de las diferentes variables morfométricas de los folículos tipo 1 a tipo 5, fueron analizadas por histología cuantitativa. De cada tipo folicular se calculó el diámetro promedio (tomando el diámetro mayor y el menor en sentido transversal) de cada folículo, ovocito y núcleo del ovocito de todos los tipos de folículo, tomando al ovario como unidad experimental. De los folículos tipo 3, 4 y 5 se calculó el espesor de la capa de células granulosas y de la teca. A su vez se calculó la profundidad media de los diferentes tipos foliculares en el espesor de la corteza ovárica. Las diferentes variables fueron analizadas mediante ANOVA y Test de t expresados como media $\pm$ EEM (error estándar de la media) mediante el programa Instat. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

Todos los animales utilizados para morfometría ovárica pertenecieron a rangos de edad no muy amplios (3 meses $n = 2$, 9 meses $n = 5$, 13 meses $n = 1$) y presentaron características histológicas similares; por otro lado no se tomaron rangos de edad extremos.



CAPÍTULO 1

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS

Los datos presentados en este capítulo permiten valorar las características generales de la población de hembras estudiadas. Esto permitió evaluar si diferencias de edad o en la condición corporal (CC) podrían estar asociadas a diferencias en las características macroscópicas e histológicas de las gónadas los animales.

La edad de las hembras muestreadas de *A. australis* se encontraron en un rango entre 1 a 18 meses de acuerdo a las estimaciones realizadas a través del largo total, fecha de colecta y fecha estimada de nacimiento. Se consideró el 15 de diciembre como fecha de nacimiento por el pico de partos estimado por Franco Trecu (2005), siguiendo la clasificación de CC descrita en materiales y métodos (tabla 1).

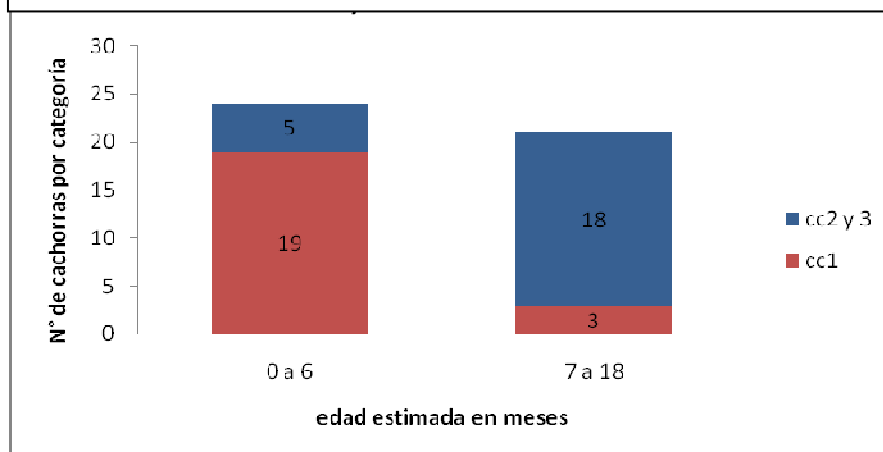
Se observó un incremento gradual de la longitud corporal (LC) desde los 0-1 hasta los 18 meses de edad, presentando diferencias estadísticamente significativas en el incremento de la LC a partir de los 3-4 hasta los 18 meses (Tabla 2) ($p < 0,001$; $F=52,42$).

Tabla 2. Longitud corporal (en cm) en hembras de <i>A. australis</i> desde 0-1 hasta los 18 meses de edad. Datos expresados como media $\pm$ EEM.							
Edad en meses	0 a 1	1 a 2	3 a 4	5 a 6	7 a 8	9 a 10	11 a 18
n (hembras)	10	11	4	3	7	13	4
Longitud corporal	60,7 $\pm$ 0,84 *	62,6 $\pm$ 1,1	74,8 $\pm$ 3,5 *	80,7 $\pm$ 3,8 *	81,6 $\pm$ 3,5 *	84,1 $\pm$ 2,9 *	83,5 $\pm$ 5 *
Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (Test de t, $p < 0,01$).							

El análisis de CC por rango de edad agrupados indicó que entre 0 a 6 meses el 76,9% de los ejemplares de presentaron una mala CC (CC1) mientras que ejemplares de entre 7 a 18 meses edad el 85,7% de ellos presentaron una CC regular a buena (CC2 y CC3) con diferencias estadísticamente significativas (test exacto de Fisher: $p < 0,0001$; $or= 20,0$) (Fig. 9).



Fig. 9. N° de hembras y condición corporal para cada rango de edad en cachorras de *A. australis*.



La mayoría de los animales de los que se obtuvieron muestras para los estudios histológicos correspondieron a ejemplares destetados y presentaron una buena CC de acuerdo al espesor de la grasa subcutánea (CC3, media = $25,5 \pm 1,2$ mm) (Fig. 9, Tabla 3).

Tabla 3. Número de cachorras de *A. australis* por categoría

Rango de edad (meses)	Categoría	N
1-8	lactante	32
9	destetado	12
11 a 18	juvenil	3
total		47

El peso promedio de los ovarios fue de $0,377 \pm 0,02$ g/ovario (rango de 0,18 a 0,60 g/ovario). Se evidenció un aumento gradual del peso de los ovarios a medida que progresaba la edad de las cachorras. Si bien el número de muestras de la categoría destetados no fue representativa del rango de edad correspondiente ($n= 4$), se observó una reducción en el peso ovárico en la categoría de 8 a 11 meses (Tabla 4).

Tabla 4. Peso promedio de los ovarios por rango de edad de cachorras de *A. australis*. Datos expresados como n, media $\pm$ EEM

Categoría o edad estimada	n (hembras)	Peso promedio de ambos ovarios (gr.)
Recién nacidas	3	$0,329 \pm 0,02$
2 meses	4	$0,363 \pm 0,06$
6 meses	3	$0,458 \pm 0,12$
8 a 11 meses	4	$0,262 \pm 0,04$
18 meses	1	$0,474 \pm 0,04$
Total		$0,377 \pm 0,02$



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En relación a las características generales de los cachorros, este es el primer trabajo que asocia la CC (mediante el espesor de grasa subcutánea) y la edad estimada de los ejemplares en *A. australis*.

En las poblaciones de Isla de Lobos (Franco, 2010) y de Isla Guafo (Chile, Molina 2006), las tasas de mortalidad más alta se registraron durante los primeros tres meses de edad. En Isla de Lobos, durante el período diciembre-febrero, las cachorras presentaron una mortalidad significativamente menor que los machos y la probabilidad de muerte estaba asociada a la duración del período perinatal. A medida que aumenta la extensión del viaje de las madres, aumenta la mortalidad de los cachorros, siendo las crías hembra menos tolerantes a viajes más largos (Franco, 2010).

En cachorros de diferentes especies de pinnípedos se han registrado altas tasas de mortalidad por inanición (mala CC) en los primeros tres meses de edad (*A. forsteri*, Mattlin, 1978; *Callorhinus ursinus*, Calambokidis y Gentry, 1985; *A. australis* en Isla Guafo, Chile, Molina, 2006). Los datos de CC en cachorras de *A. australis* de 1 a 7 meses de edad reportados en este trabajo, coinciden con lo reportado por Franco V (2010) en Isla de Lobos y por otros autores en otras especies de otáridos. Este hecho está vinculado a los hábitos alimenticios de los otáridos ya que la hembra alterna viajes de alimentación con las estadías en tierra con su cría durante las cuales realiza el amamantamiento (*income breeding*) (Boyd 2000); la duración de los viajes puede extenderse más de lo que podrían resistir los cachorros a un ayuno prolongado, provocando la muerte de los mismos. Ya a partir de los 8 meses de edad, al comenzar el destete (Ponce de León, 1983b), los cachorros comienzan a realizar búsquedas de alimento, evidenciado por el contenido estomacal de ejemplares necropsiados (obs.pers) y la población de parásitos gastrointestinales (Morgades y col. 2006), indicando también una ingesta adicional complementaria a la leche materna.

Por otro lado, las causa de muerte en cachorras de *A. australis* de 9 meses de edad (con buena CC) era debida a traumatismos graves y no por inanición que pudiera estar asociada con el período de destete (obs. pers.). La grasa corporal refleja la disponibilidad de combustible metabólico que es el elemento clave en la función reproductiva (Ebling, 2005) por lo que las características morfológicas ováricas en las hembras muestreadas en este período deberían ser normales. Sin embargo, el peso de los ovarios mostró una reducción en el período de 8 a 11 meses pero no contamos con datos suficientes que puedan explicar dicha reducción.

Si se toma en cuenta la evolución del peso de todas las categorías, es evidente el incremento en el peso de los ovarios a medida que ocurre el crecimiento del animal.



En cachorras de loba marina sudafricana (*A. pusillus*) ocurre un aumento gradual del peso gonadal en los primeros meses de vida (al nacimiento: $\approx$ 2g. peso de ambos ovarios; al año: $\approx$ 5 g. ambos ovarios). El incremento de peso ovárico es pronunciado en la estación reproductiva, cuando las hembras ingresan a su “segundo año” (diciembre) debido básicamente al desarrollo folicular más que al crecimiento del tejido intersticial (Rand, 1954). Hallazgos similares fueron registrados en ovarios de cachorras de león marino australiano (*N. cinerea*) de hasta 7 meses de edad (Tedman, 1991). Las diferencias de peso ovárico entre cachorras de la misma edad de *A. pusillus* y *A. australis* son muy importantes (más del doble) teniendo en cuenta que son especies con características físicas similares, aunque el número de muestras con el que se trabajó en ambas investigaciones no fue suficiente como para establecer análisis estadísticos apropiados. En lobas marinas de Nueva Zelanda (*A. forsterii*) también se registraron aumentos del peso ovárico en diferentes etapas de la vida reproductiva del animal (hembras sexualmente inmaduras: 1-3 g/ovario (media = 1.27gr); nulíparas (n= 2)= 2 g/ovario; hembras sexualmente maduras: rango de 2 a 9 g, media = 3.85, Dickie y Dawson, 2003). Por otro lado, en elefantes marinos del sur (*Mirounga leonina*) que presentan un tamaño corporal mucho mayor, también ocurren incrementos graduales en el peso ovárico desde la etapa de recién nacidas (4-5 g.) hasta el año de edad (6-6,5 g.) (Bonner, 1955).

Sin embargo, en los trabajos consultados no se menciona con precisión la metodología de colecta, conservación o su procesamiento que pudiera estar generando variaciones importantes (ej. inclusión del mesosálpinx junto con el ovario); en el caso de *M. leonina* el trabajo está basado en muestras de ejemplares únicos por cada categoría, y constituyen los registros morfológicos del desarrollo ovárico más concretos de una especie de mamífero marino cuyas características anatómicas se sabe relativamente poco.

En suma, los hallazgos de CC y probable causa de muerte en los primeros meses de vida en cachorras de *A. australis* son similares a las de otras especies de pinnípedos; se reporta por primera vez la muerte en cachorros en el período de destete hasta ahora no registrada en la especie. Por otro lado, el peso de los ovarios es menor al reportado en cachorras de *A. forsterii* y *A. pusillus* aunque es necesario aumentar el número de muestras para establecer los posibles incrementos graduales en el peso de las gónadas de *A. australis* de acuerdo a la edad, longitud corporal y CC.



CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y TOPOGRAFÍA DE LOS OVARIOS DE CACHORRAS DE *A. australis*.

Apariencia macroscópica.

Los ovarios presentaron forma ovoidea y de superficie lisa; en algunos casos, por transparencia se podía evidenciar la presencia de pequeños folículos antrales que no sobresalían hacia el exterior. El mesosálpinx envolvía completamente al ovario quedando entre ambos la cavidad correspondiente a la bursa ovárica. Una pequeña abertura, el espacio periovárico, conectaba la bursa ovárica con la cavidad peritoneal cerca del cuerno uterino.

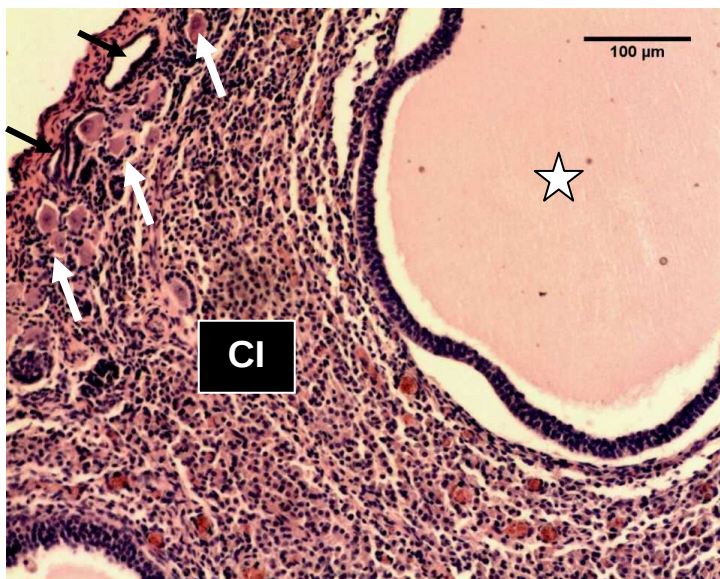
A simple vista, los ovarios carecían de cuerpo lúteo, cuerpos albicans o folículos antrales que protruyeran hacia la superficie (Fig. 10).



Fig. 10. Aspecto macroscópico del ovario de cachorras de *A. australis*.

Aspecto microscópico

Topográficamente, los ovarios presentaban una corteza externa (*zona parenchymatosa*) (Fig. 11) y una médula interna (*zona vasculosa*) (Fig. 12). La corteza estaba formada por un estroma de tejido conjuntivo continuo con la túnica albugínea que rodeaba al ovario, donde se alojaban los folículos en diverso grado de desarrollo, abundantes células intersticiales (*endocrinocytus interstitialis*) y vasos sanguíneos. La túnica albugínea estaba tapizada por el epitelio superficial, cuyas invaginaciones



formaban un sistema de criptas subcapsulares. La médula ovárica contenía grandes vasos sanguíneos y nervios.

Fig. 11. Corteza externa del ovario de cachorra de *A. australis*. Se observa un folículo antral tipo 5 (estrella blanca) rodeado por abundantes células intersticiales (CI); debajo de la cápsula se ubican los folículos primordiales (flechas blancas) asociados a las criptas subcapsulares (flechas negras). HE. 200x

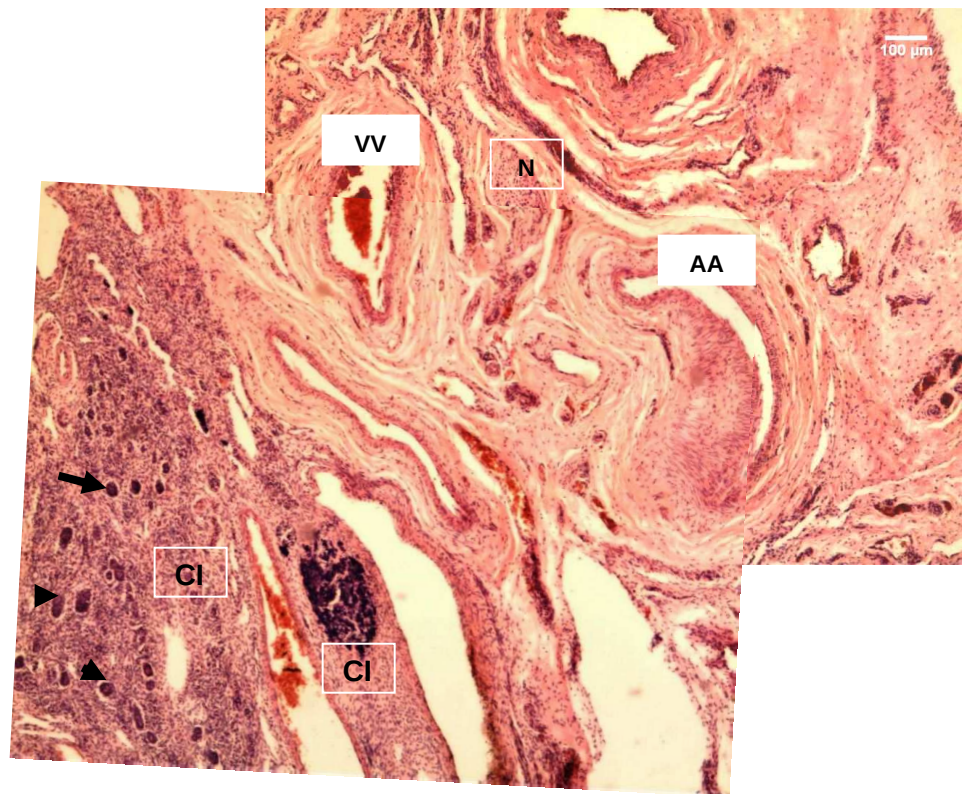


Fig. 12. Mosaico de la zona córtico-medular y médula ovárica. En la corteza profunda se observan pequeños grupos de células intersticiales (flechas negras) rodeados de células intersticiales dispersas (CI). En el estroma medular se observa un grupo compacto de CI, numerosos cortes de vasos sanguíneos (arterias: AA; venas: VV) de gran calibre y nervios (N). HE. 40x.

Las características particulares de cada región y tejido se describen como sigue:

Estroma ovárico

El estroma ovárico estaba organizado en una túnica albugínea y una red interna de septos que se extendían desde la corteza a la médula. Dichas estructuras estaban formadas por tejido conjuntivo denso (TCD) (principalmente fibras colágenas); los tabiques y septos por donde transcurrían los vasos sanguíneos se extendían y ramificaban desde la médula

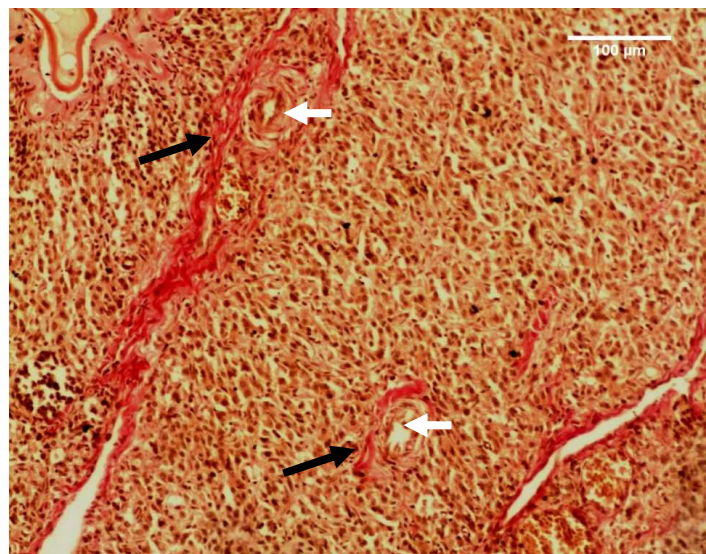


Fig. 13. Corteza ovárica. Se observan las bandas de tejido conjuntivo del estroma ovárico (flechas negras) donde transcurren los vasos sanguíneos (flechas blancas). Entre los delgados tabique se ubican las CI. Van Giesson. 40x.



hacia las zonas más superficiales de la corteza (Fig. 13). Las fibras colágenas en la albugínea estaban orientadas paralelas a la superficie y rodeaban a las criptas subcapsulares (Fig. 14a). En algunos casos, las fibras colágenas rodeaban a folículos primordiales, pequeños vasos sanguíneos y grupos de células intersticiales. La albugínea formaba una banda delgada en la mayor parte del ovario engrosándose en la región del hilio para continuarse con el mesovario (Fig. 14b).

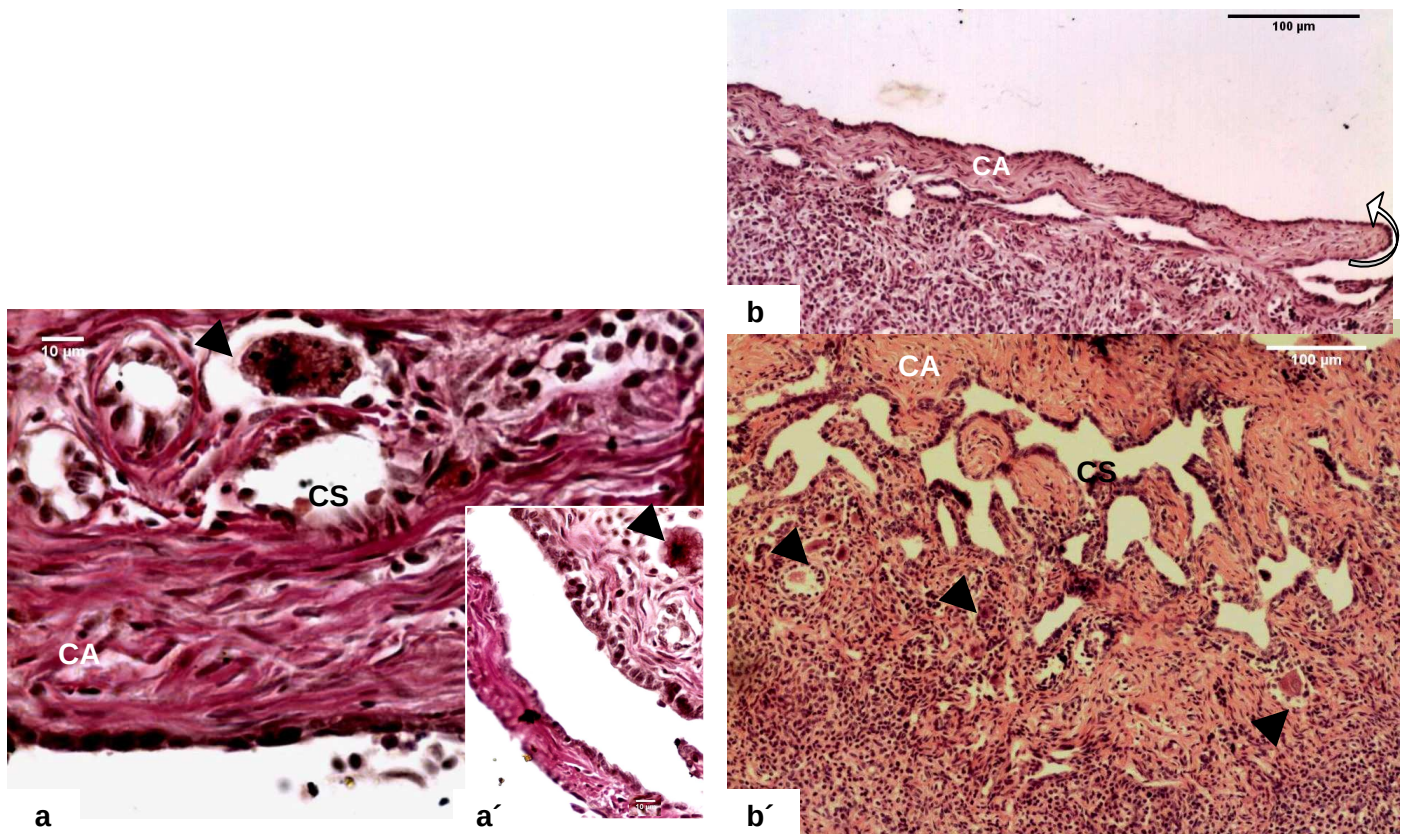


Fig. 14. Cápsula del ovario (CA): epitelio simple apoyado en la albugínea cuyas fibras corren paralelas a la superficie y rodean a las criptas subcapsulares (CS). Las CS pueden ser simples (a, a', b) o muy ramificadas (b') asociadas a folículos primordiales (flechas negras). En a', las caras de la CS presentan epitelio de diferente altura. Flecha blanca: abertura superficial de una cripta. a y a': Van Giesson. 400x; b y b': HE. 40x.

Médula, vasos sanguíneos y nervios

La médula ovárica constituía una pequeña parte del volumen ovárico, con grandes venas, arterias y fibras nerviosas (Fig. 12). De aquí, los vasos sanguíneos daban origen a ramas más pequeñas que llegaban hasta la superficie cortical por debajo de la albugínea. Dichos vasos transcurrían a través de los septos de tejido conjuntivo (Fig. 13). En algunos animales se encontraron células intersticiales organizadas en pequeños grupos limitados por finas bandas de tejido conjuntivo (Fig. 12).



Corteza ovárica

Epitelio superficial del ovario.

El epitelio superficial o “germinal” estaba formado por una capa simple de células epiteliales cuya altura variaba de plana a columnar. Las células epiteliales gradualmente disminuían su altura en la zona de invaginación hacia la albugínea para constituir las criptas subcapsulares. El epitelio superficial junto con la túnica albugínea constituía la típica cápsula del órgano (Fig. 14).

Criptas subcapsulares

Las criptas subcapsulares eran invaginaciones del epitelio superficial dentro de la albugínea y se distribuían en forma paralela a la cápsula. Estaban formadas por una red de cisternas y túbulos interconectados que se abrían mediante numerosas aberturas hacia la superficie del ovario. Su pared estaba limitada por células epiteliales de diferente altura: cilíndricas, cúbicas o planas. Generalmente las células planas se ubicaban en la región más superficial ó en la entrada de la cripta pero este patrón no era constante. Las regiones medias y profundas de la cripta estaban delineadas por células cúbicas y cilíndricas en forma alternada. Cerca del hilio, las criptas se profundizaban en la corteza ovárica, las porciones terminales presentaban una pequeña luz central quedando rodeadas por delgadas bandas de fibroblastos del estroma cortical (Fig. 11 y 14); en ningún caso se observaron folículos dentro de las criptas.

Folículos ováricos

Los folículos ováricos presentaron diverso grado de desarrollo y se localizaron a diferente profundidad en la corteza (Fig. 12). De acuerdo a las características morfológicas descritas por Grimes y col. (1987) y Lundy y col. (1999), los folículos fueron clasificados como sigue:

F. primordiales o tipo 1: eran aquellos ovocitos rodeados por una lámina simple de células foliculares planas (Fig. 15 y 16). Generalmente estaban distribuidos en monocapa, aislados o en algunos casos organizados en grupos de cantidad variable (4 a 30 folículos) (Fig. 16); la mayoría estaban asociados a criptas subcapsulares. No se observaron folículos dentro de las criptas pero eventualmente algunos estaban rodeados por bandas de tejido conjuntivo derivadas de la albugínea.

F. primarios o tipo 2 (unilaminar): los ovocitos estaban rodeados por una capa de células foliculares o granulosa de tipo cúbico, externamente limitados por fibroblastos y fibras de tejido conjuntivo. Su distribución se limitaba a la corteza superficial pero en algunos casos se extendían hasta la zona cortical media (Fig. 17).

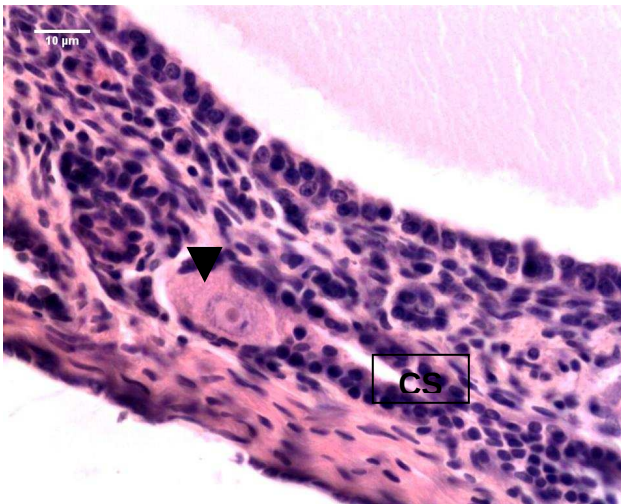


Fig. 15. Folículo Tipo 1 o primordial (flecha negra) debajo de la albugínea y en estrecho contacto con una CS. HE. 400x.

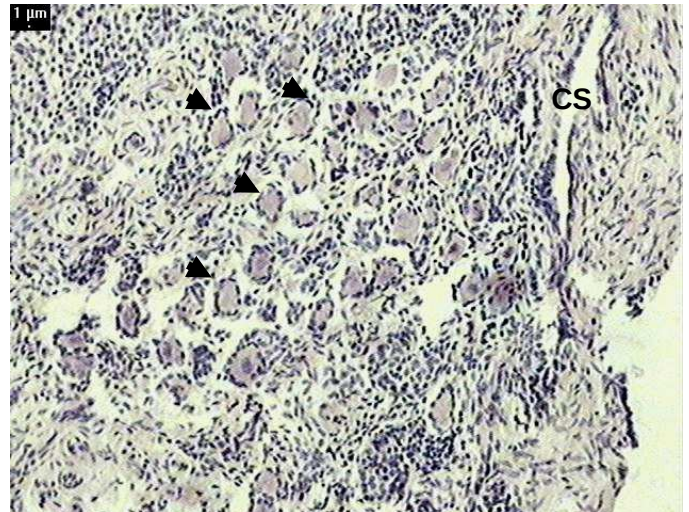


Fig. 16. Grupo de folículos Tipo 1 (flechas negras) ubicados en el espesor de la corteza ovárica a diferentes profundidades. CS: cripta subcapsular. HE. 40x.

Al igual que los primordiales, algunos folículos primarios se encontraban rodeados por gruesas bandas de tejido conjuntivo derivadas de la albugínea.

En los folículos tipo 1 y 2 la forma o perfil de los ovocitos y folículos variaba de redondeado a elíptico; a su vez, las membranas tecales aún no estaban diferenciadas del estroma circundante (Fig. 15 y 17).

F. preantrales pequeños o tipo 3 (primario multilaminar). Los ovocitos se encontraban rodeados por dos o más láminas de células granulosas cúbicas. En algunos casos ya era evidente la formación de la membrana pellucida (Fig. 18)

F. preantrales grandes o tipo 4 (secundario). Los ovocitos se encontraban rodeados por cuatro o más láminas de células granulosas y una membrana pellucida evidente; eventualmente presentaban espacios antrales emergentes irregulares con líquido o licor folicular. (Fig.19).

En los folículos tipo 3 y 4, las membranas tecales eran delgadas y constituidas por una o dos bandas de células planas.

F. antrales pequeños y grandes o tipo 5 (terciarios). Presentaban una capa granulosa formada por tres a cuatro estratos celulares completos y una cavidad antral bien definida; en algunos casos, la granulosa se iba angostando hacia uno de los lados llegando a estar limitada por una capa simple de células epiteliales. Los ovocitos eran grandes y estaban rodeados por una membrana pellucida eosinófila o PAS + y externamente la corona radiada. Las membranas tecales estaban constituidas por pocas capas de células (de 2 a 5) que se diferenciaban levemente de los fibroblastos por presentar un núcleo más redondeado y heterocromático. En los folículos más grandes, en muy pocos casos era posible diferenciar una teca externa e interna, donde las células tecales internas presentaron núcleo oval y citoplasma pálido, y la teca



externa presentaba una red capilar evidente. Estos folículos se localizaron a diferentes profundidades de la corteza (Fig. 21). La mayoría eran monoovulares, pero algunos presentaron dos ovocitos (Fig. 20).

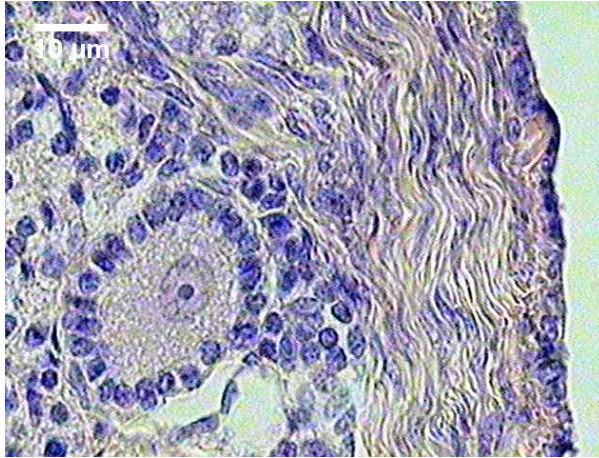


Fig. 17. Folículo Tipo 2 o primario unilaminar rodeado por una capa simple de células foliculares cúbicas. HE. 400x.

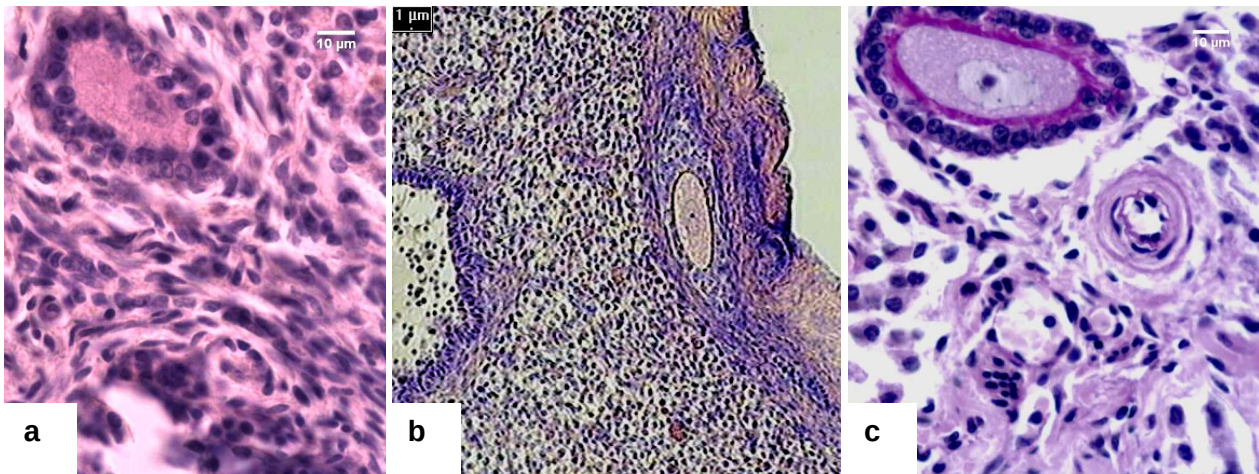


Fig. 18. Folículos tipo 3 o preantrales con diferentes aspecto y ubicación en la corteza. **a:** ovocito rodeado por dos capas de células de la granulosa. HE- 400x; **b:** folículo rodeado por bandas de tejido conjuntivo derivado de la albugínea. HE- 200x; **c:** ovocito envuelto por la zona pellucida PAS+. PAS-H- 400x.

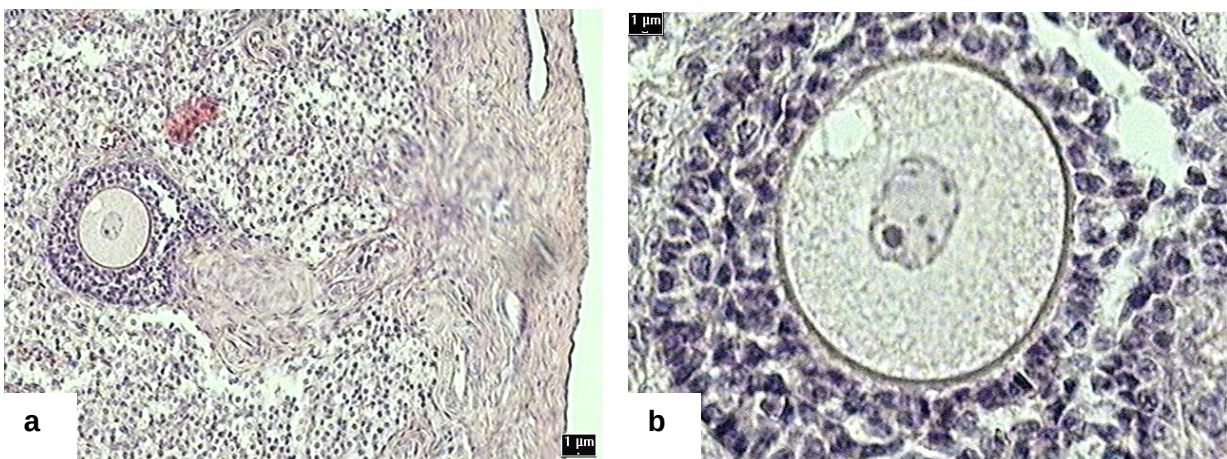


Fig. 19. Folículo tipo 4 o preantral. **a:** ovocito grande rodeado por varias capas de células de la granulosa y externamente una delgada capa de células tecales. 200x. **b:** se observa con más detalle la zona pellucida evidente y el inicio de la formación de la cavidad folicular. 400x. HE.

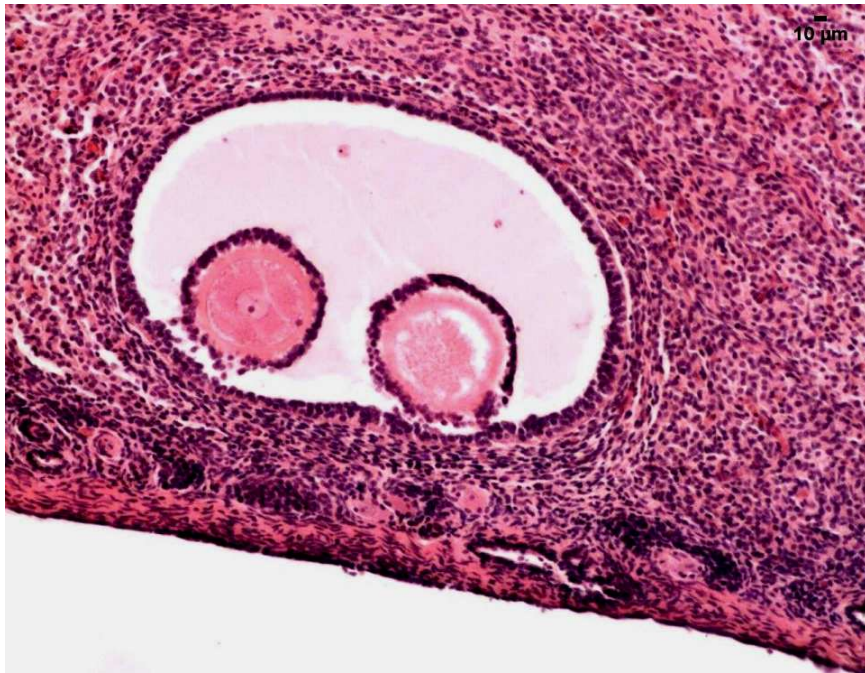


Fig. 20. Folículo tipo 5 con 2 ovocitos ubicado en la corteza superficial. Los ovocitos presentan una membrana pelúcida bien definida y están envueltos por la corona radiada. La capa granulosa está formada por varios estratos celulares que se van reduciendo hacia una de las caras del folículo. H-E. 200x.

En todos los tipos foliculares, la forma o perfil de los ovocitos y folículos variaba de redondeados a elípticos.

F. atrésicos: eran abundantes en la corteza superficial encontrándose diverso grado de atresia en los diferentes tipos de folículos observados, siendo mucho más evidente en los folículos antrales o tipo 5 (Fig. 22).

F. antrales en atresia temprana: presentaron desprendimiento de las células de la granulosa hacia la cavidad antral y numerosos cuerpos picnóticos. En la mayoría de los casos, el núcleo del ovocito presentaba cambios degenerativos o estaba ausente mientras que la membrana pellucida permanecía bien definida, al menos sin cambios morfológicos evidentes (Fig. 23).

F. antrales en atresia avanzada: los ovocitos estaban completamente degenerados o ya habían desaparecido, quedando solamente remanentes de la membrana pellucida como estructuras eosinófilas irregulares de tamaño variable. Las células de la granulosa degeneradas invadían completamente la cavidad antral; dichas células presentaban dos aspectos diferentes: **1)** pequeñas y con núcleo picnótico, **2)** células grandes redondeadas, con núcleo eucromático oval o redondeado y nucléolo evidente, de citoplasma pálido similar a las células intersticiales (Fig. 23). Las células tecaes formaban una lámina externa de aspecto fibroblástico, que acompañaba los cambios de forma del folículo atrésico en una estructura irregular, ramificada u ovalada. Los macrófagos también eran evidentes en el estroma de alrededor de este tipo de folículo (Fig. 24). En algunos casos, las fibras tecaes de folículos atrésicos superficiales, se continuaban con las de la túnica albugínea.

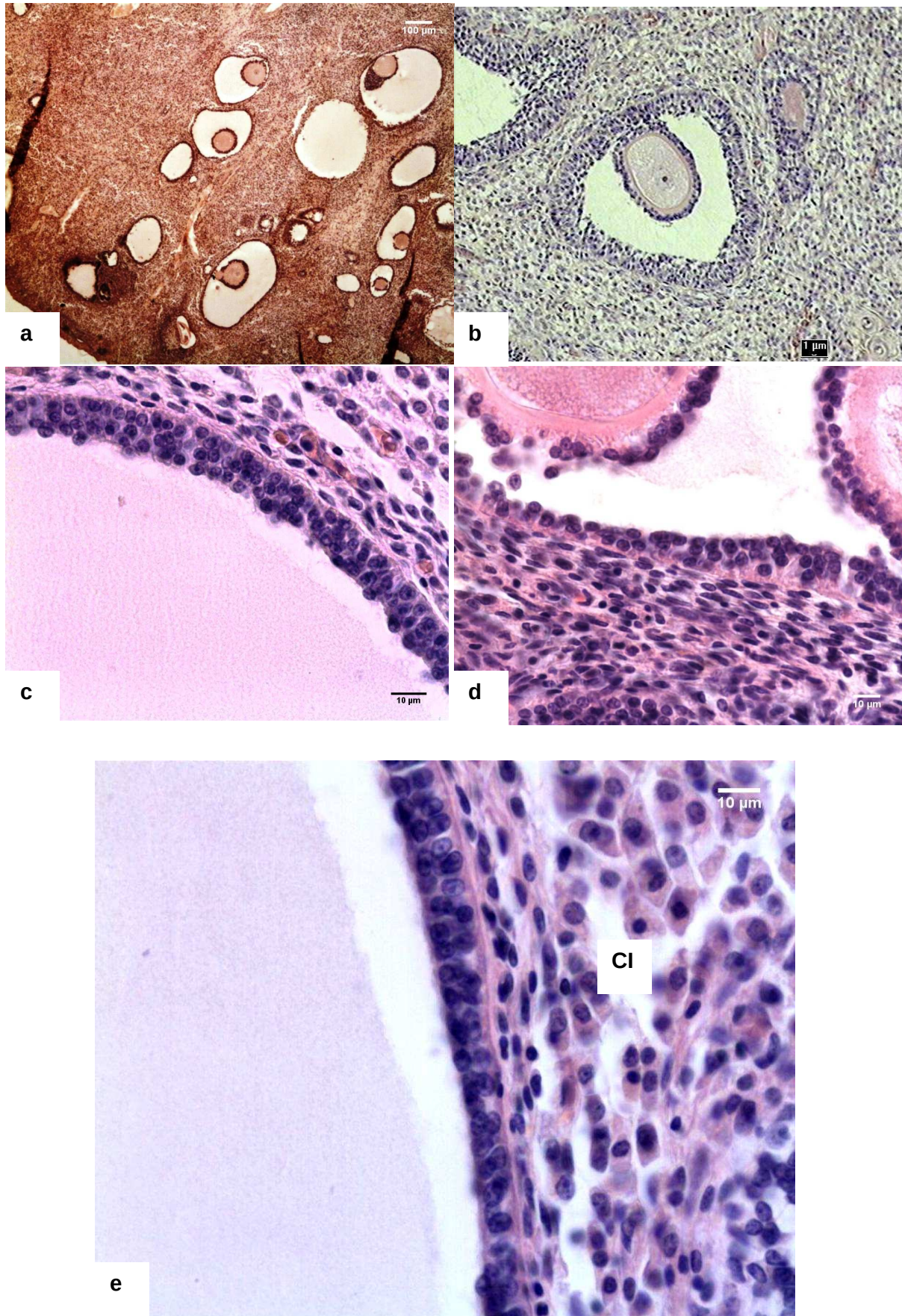


Fig. 21. Folículos tipo 5 o antrales. **a:** distribución variable de folículos en la corteza. Van Gieson. 40x; **b, c y d:** espesor variable de la granulosa (barra roja). Capas tecales poco diferenciadas del estroma intersticial (barra roja) donde se observan numerosas células intersticiales (CI) con abundante citoplasma eosinófilo. **e:** detalle de la granulosa de espesor variable y capas tecales poco diferenciadas; en la periferia, CI grandes de citoplasma eosinófilo y aspecto espumoso. HE. 400x.

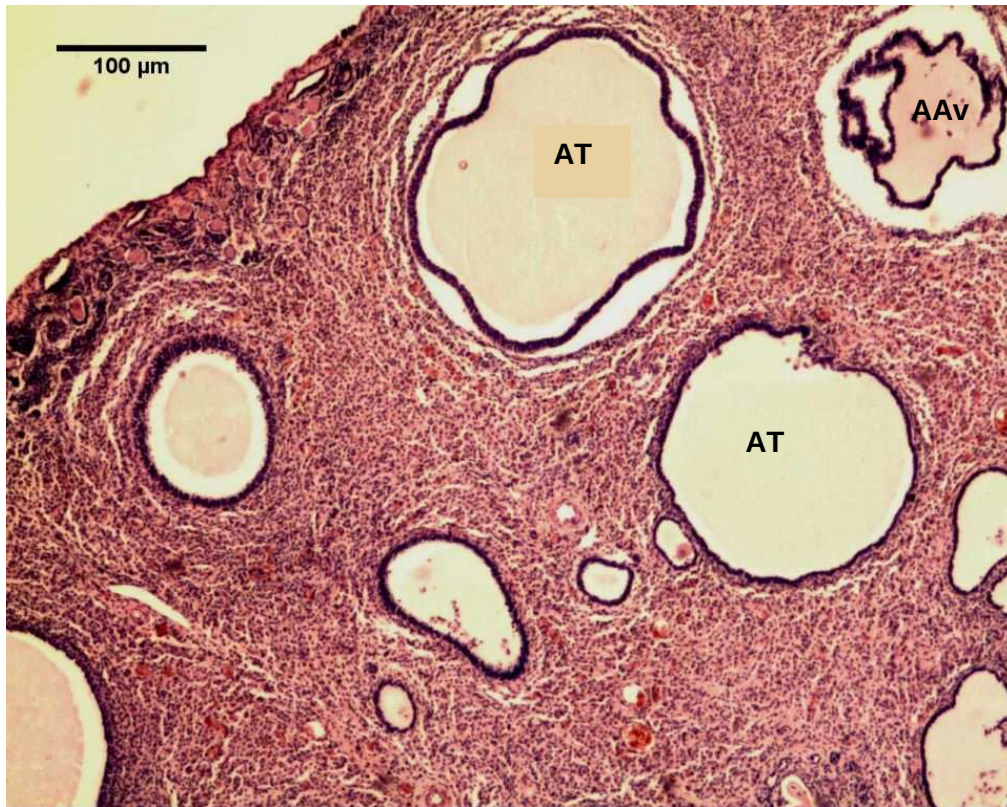


Fig. 22. Folículos antrales en diferente estadio de atresia y a diferente profundidad de la corteza. AT: atresia temprana; AAv: atresia avanzada. HE. 40x.

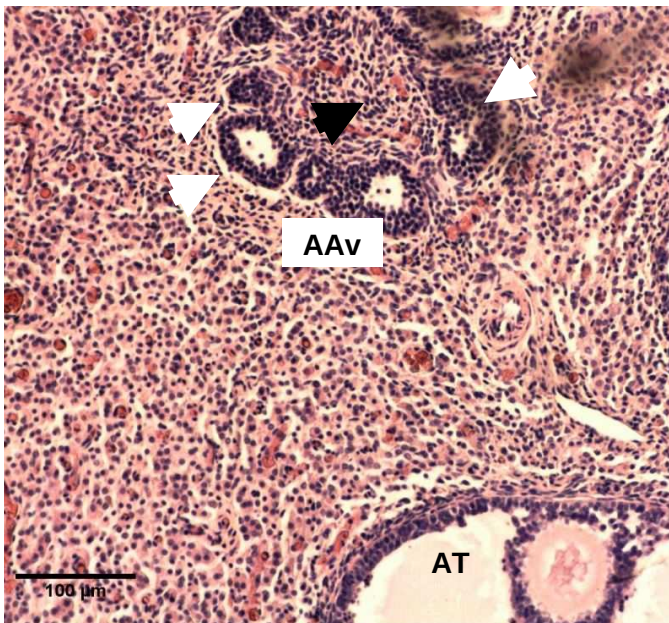


Fig. 23. Folículos en diferente estadio de atresia. AT: atresia temprana, se observan alteraciones del ovocito, la membrana pelúcida se mantiene, células de la granulosa desprendidas hacia la cavidad antral; AAv: atresia avanzada, se observan grupos compactos de células con núcleo heterocromático (flechas blancas) y en el centro células de núcleo euromático y citoplasma eosinófilo (flecha negra). HE. 200x.

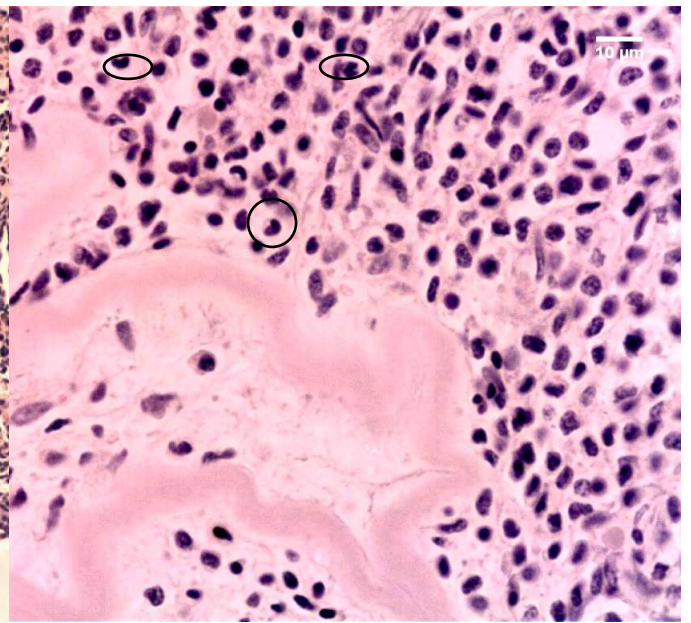


Fig. 24. Folículo en atresia avanzada. La membrana pellúcida presenta aspecto irregular; externa e internamente se observan células de aspecto fibroblástico y numerosos macrófagos (círculos negros). HE. 400x.



Células intersticiales

En observación panorámica, las células intersticiales se encontraban distribuidas homogéneamente y en gran número por toda la corteza ovárica. Estaban organizadas en nidos o cordones limitados por finas bandas de tejido conjuntivo, o simplemente distribuidas en forma irregular en el espacio intersticial entre los folículos ováricos. Con las técnicas de coloración de rutina (H-E) fueron evidenciadas como células grandes, poliédricas con citoplasma eosinófilo pálido y núcleo eucromático excéntrico; en muestras bien preservadas se podía evidenciar un leve aspecto espumoso por la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas. Entre las células se observaba una extensa red de capilares. En la médula, las células intersticiales formaban pequeños grupos entre las fibras colágenas y los vasos sanguíneos; este patrón sólo fue observado en escasos ejemplares. No se observaron cordones de células epiteliales cerca o asociados a las criptas subcapsulares (Fig. 25).

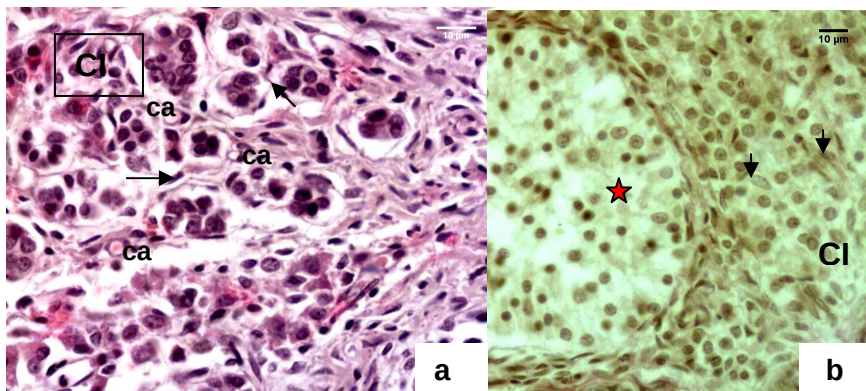


Fig. 25. a: CI organizadas en pequeños nidos en la corteza profunda. H-E- 400x. **b:** CI organizadas en cordones o irregularmente en la corteza. Van Giesson- 400x. Entre ellas se ubican delgados tabiques de tejido conjuntivo (flechas negras) y pequeños capilares (ca). En B se observa un folículo en atresia avanzada con los diferentes tipos celulares (estrella roja).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primer descripción detallada de la histología ovárica de cachorras de *A. australis*.

Al igual que en otros mamíferos y focas inmaduras, los ovarios presentaron la misma estructura córticomedular con folículos en diferente estado de desarrollo (Pearson y Enders, 1951; Zukerman, 1962; Skinner y Westlin-Van Aarde 1989). Skinner y Westlin-Van Aarde (1989) describieron los ovarios de hembras maduras de foca de Ross (*Ommatophoca rossii*) donde los folículos primordiales y primarios



estaban siempre incluidos en la túnica albugínea. Esto fue raramente observado en ovarios prepuberales de *A. australis* donde los folículos tipo 1 y 2 se distribuyeron por debajo de la túnica albugínea en monocapa de células individuales o en pequeños grupos tal como está descrito en otros pinnípedos (Tedman, 1991).

Otra característica interesante es que si bien los folículos ováricos se encontraron a diferentes profundidades de la corteza, todos estaban rodeados o cercanos a una importante red de vasos sanguíneos (arteriolas y capilares del estroma) a diferencia de lo que se menciona para el ovario de la mujer donde los folículos quiescentes (primordiales) se localizan en una zona relativamente avascular de la corteza mientras que los folículos en crecimiento o en atresia y cuerpos lúteos en involución se localizan en el borde córticomedular que está ricamente vascularizado (Gougeon, 2004).

La presencia de folículos poliovulares ha sido descrita en diferentes especies y la incidencia es variable entre ellas, presentándose con mayor frecuencia en perras; en éstas, el porcentaje de folículos poliovulares era mayor en animales jóvenes y disminuían con la edad. La pared de este tipo de folículo contenía un mayor número de células de la granulosa comparado con los folículos monoovulares (Telfer y Gosden, 1987). En cachorras de *A. australis* la frecuencia de folículos poliovulares era baja y la capa granulosa presentaba un espesor variable de la misma manera que en los monoovulares, debido probablemente a un insuficiente estímulo de gonadotrofinas que promovieran la división celular (Van Voorhis, 1999). De acuerdo a Zukerman (1962) los folículos poliovulares terminan en atresia.

Las criptas subcapsulares de *A. australis* presentaron características similares a las descritas para otras especies con la particularidad de que estaban presentes en animales muy jóvenes (ejemplares de 1 mes de edad) (Amoroso y col, 1951; Enders y col, 1946; Mülling y col, 1998; Zukerman, 1962). En otro trabajo en que se obtuvieron imágenes mediante la reconstrucción tridimensional (Katz y col, 2009-a) se confirmó su patrón de ramificaciones irregulares e interconexiones por el espesor de la albugínea así como su vecindad a los folículos primordiales, los cuales estaban localizados junto a las criptas pero no dentro de su luz como se describieron por Craig (1964) en loba marina del norte (*C. ursinus*). Aparentemente las criptas no mostraron diferencias en la profundidad en relación a la edad del animal durante el periodo prepuberal. En foca del puerto (*P. vitulina*), las criptas eran cortas y estrechas en ejemplares juveniles, mientras que en adultas eran largas, anchas o angostas, ramificadas y un revestimiento epitelial de altura variable (plano a cilíndrico). Estas modificaciones se acentuaban durante la estación reproductiva (Mulling y col., 1998), aparentemente asociadas a influencias hormonales (estrógenos) durante este período



(Mulling y col., 1998). Por otro lado, en foca de Ross (*O. rossii*), las criptas presentaban un escaso desarrollo durante la diapausa (Skinner y Westlin-Van Aarde, 1989). En ambas especies de fócidos, la estructura de las criptas refleja cambios en la actividad ovárica en diferentes momentos del ciclo reproductivo. En foca del puerto (*P. vitulina*), la función principal de las criptas es la formación de un pool de células (cordones celulares) durante el primer año de vida; luego de la pubertad, éstas células aparentemente se activan y diferencian en células intersticiales productoras de hormonas esteroideas (Boyd, 1983; Mülling y col, 1998). En los ovarios de la perra doméstica (*Canis familiaris*) también existe un sistema de criptas subcapsulares denominados túbulos corticales (Akihara y col., 2007), los cuales dan origen a células intersticiales (Guraya y Greenwald, 1964). En el presente trabajo no se encontraron dichos cordones celulares, por lo que no podemos asumir que las criptas tengan las mismas funciones que en fócidos. Por otro lado, las células intersticiales en los ovarios de *A. australis* se encontraban en abundancia y dispersas por toda la corteza ovárica ya desde etapas tempranas de la vida postnatal (desde un mes de edad, el animal muestreado más joven). Esta característica representa una de las diferencias más importantes con otros pinnípedos, donde eran detectables (después de la etapa postnatal temprana) en hembras de 2 a 3 años de edad, asociadas a folículos en crecimiento (antrales) y organizadas en grupos (Mülling y col, 1998). En otras especies, las células intersticiales pueden originarse ya sea de las criptas subcapsulares o de fibroblastos (*P. vitulina*, Mülling y col, 1998) o aparentemente de células tecales (*O. rossii*, Skinner y Westlin-Van Aarde, 1989). En *A. australis* prepuberales, dada la alta cantidad de folículos atrésicos y la abundancia de células intersticiales en la corteza ovárica, especulamos que puedan tener otro origen, quizás de células tipo mesenquimáticas. Sin embargo no poseemos evidencia que apoye esta hipótesis. En focas recién nacidas (*Leptonychotes weddellii*, Harrison, 1950; *Pagophilus groenlandicus*, *Erignatus barbatus*, *P. vitulina*, Osipova, 1976; *N. cinerea*, Tedman 1991), la médula ovárica contiene células intersticiales que se hipertrofian y actúan como glándula endócrina transitoria; posteriormente sufre cambios regresivos y son sustituidas por tejido conjuntivo (Osipova, 1976; Tedman, 1991). En contraste con esta información, no se encontraron este tipo de cambios histomorfológicos en *A. australis* prepuberales. En las focas, esta transformación progresa a medida que se aproxima el período de maduración sexual y aumenta el número de células intersticiales (Osipova, 1976; Mülling y col, 1998); en hembras adultas, la abundancia de estas células cambia cíclicamente de acuerdo a la etapa del ciclo estral (Harrison, 1950). Esta última característica también ha sido descrita en hembras adultas de *A. australis* (Corcuera, 1989) pero no se cuenta con detalles de los posibles cambios



estacionales o del ciclo reproductivo, y probablemente representen una población celular relativamente estable que se activa a determinada edad y bajo ciertas condiciones fisiológicas. Por último, en *Arctocephalus pusillus* (Rand, 1954) el crecimiento ovárico es pronunciado cuando la hembra entra en su segundo año de edad (diciembre, estación reproductiva) siendo el desarrollo folicular más que el crecimiento intersticial el responsable de estos cambios.

Poco se sabe acerca de las funciones de las células intersticiales en pinnípedos; en Phocidae (*P. groenlandicus*, *P. vitulina*, *E. barbatus*, *L. weddellii*) probablemente sean la fuente de hormonas sexuales debido a la presencia de inclusiones citoplasmáticas lipídicas y organelos indicativos de esteroidogénesis (Harrison Matthews y Harrison, 1949; Osipova, 1976; Mülling y col, 1998). En loba marina del Norte (*C. ursinus*), las células intersticiales expresan enzimas esteroidogénicas (17 α -hidroxilasa/17,20-liasa y citocromo-b5) en el citoplasma relacionadas a la síntesis de hormonas sexuales (androgénesis) (Browne y col, 2006), que está en estrecha correlación con las altas concentraciones de esteroides sexuales en suero durante la estación reproductiva (también observado en *P. vitulina*, Mülling y col, 1998). Ovarios de *A. australis* adultas en diapausa analizados por inmunohistoquímica evidenciaron la expresión de receptores de estrógenos alfa y beta (ER β y α), progesterona y andrógenos en el citoplasma y núcleo de las células intersticiales así como en las células luteales; si bien su función específica no está establecida podemos inferir que las hormonas producidas por el propio ovario, ejercen funciones importantes en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *A. australis*, en particular podrían estar vinculadas al control de la diapausa y gestación (Katz y col. 2009-b).

En conclusión, los ovarios de *A. australis* presentan características histomorfológicas similares a las observadas en otros pinnípedos. Sin embargo, la presencia de abundantes células intersticiales en etapas tempranas de la vida de estos animales es una diferencia relevante y aparentemente característica de hembras prepuberales de *A. australis*, aunque la evaluación histomorfológica de las mismas no es suficiente para determinar su origen y funciones.



ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN FOLICULAR POR MÉTODOS MORFOMÉTRICOS

El análisis morfométrico evidenció un incremento gradual en el diámetro de los ovocitos, los núcleos y los folículos entre los tipos foliculares 1 a tipo 5 en los ovarios de cachorras de *A. australis*. Estas variaciones morfológicas son acordes a las descripciones clásicas del desarrollo folicular hasta la etapa de folículo preovulatorio (Lundy y col., 1999).

En la tabla 5 se representan los valores de los **diámetros de ovocitos, núcleos de ovocitos y diámetro folicular** entre los folículos tipo 1, tipo 2 y tipo 3, donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre ($p < 0,05$). Los diámetros de los folículos tipo 4 y 5 presentaron un amplio rango de variación (folículos tipo 4: 58-141 μm ; folículos tipo 5: 122- 425 μm).

Tabla 5. Características morfométricas generales de folículos ováricos en cachorras de *A. australis*. Valores expresados en μm , como media $\pm$ EEM.

	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5
<i>N</i> (ovario)	8	8	7	4	4
Diámetro ovocito	22,24 $\pm$ 0,6 ^a	27,56 $\pm$ 1,1 ^b	36,9 $\pm$ 3,1 ^c	48,5 $\pm$ 6, 2 ^d	68,2 $\pm$ 5,3 ^e
Diámetro núcleo	10,04 $\pm$ 0,2 ^a	11,12 $\pm$ 0,24 ^b	14,02 $\pm$ 1,1 ^c	14,7 $\pm$ 1,87 ^d	20,7 $\pm$ 1,6 ^e
Diámetro folículo	30,37 $\pm$ 1,2 ^a	39,3 $\pm$ 1,7 ^b	61,2 $\pm$ 4,3 ^c	95,9 $\pm$ 16,1 ^d	252,6 $\pm$ 53,6 ^e
Letras indican diferencias estadísticamente significativas (test de T, $p < 0,0001$)					

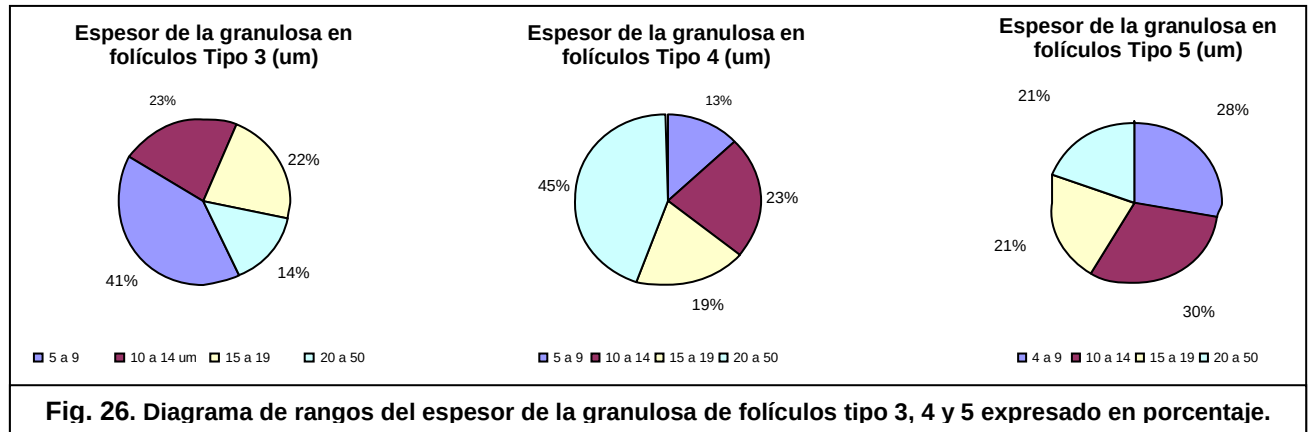
El espesor promedio de la teca y la granulosa de los folículos tipo 3, 4 y 5, se representan en la tabla 6. La granulosa presentó un incremento en el grosor de la pared entre los folículos tipo 3 y 4, mientras que entre los tipo 4 y 5 se observó una reducción.

Tabla 6. Características de la pared folicular de los folículos tipo 3, 4 y 5. Valores expresados en μm como media $\pm$ EEM.

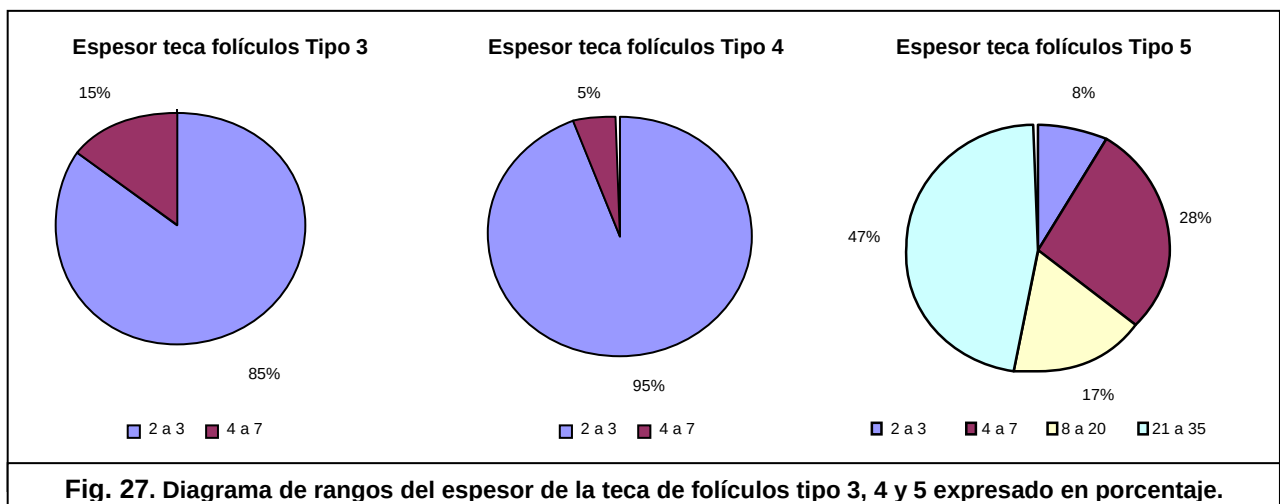
	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5
<i>N</i> ovarios utilizados	5	4	4
Espesor teca	3,13 $\pm$ 0,3 ^{a*}	3,3 $\pm$ 0,6 ^{b*}	13,8 $\pm$ 5,2 ^{c*}
Espesor granulosa	12,7 $\pm$ 2†	20,7 $\pm$ 3,5†	16,9 $\pm$ 4†
Letras con asterisco indican diferencias no muy significativas ($p = 0,0545$) †: diferencias no significativas ($p = 0,24$)			



Cuando los datos de espesor de la granulosa se analizaron por rangos de porcentaje, en los folículos tipo 3 la mayor frecuencia se observa entre las 5 a 9 μm , en los tipo 4 entre las 20 a 50 μm y los tipo 5 entre las 10 y 14 μm (Fig. 26).



La teca en general estaba formada por una a dos capas de células que se diferenciaban levemente de los fibroblastos del estroma, de aquí que en los folículos tipo 3 y 4 el espesor básicamente incluyó la altura de una célula tecal (rango de 2 a 3 μm) mientras que en los de tipo 5 se observó un incremento del espesor (Tabla 6), lo que estaría indicando una diferenciación y proliferación celular mucho más marcada (rango entre 3 a 23 μm ; Fig. 27).



En los ovarios estudiados se encontró un bajo número de folículos tipo 5, que asociado al descarte realizado por alteraciones morfológicas (retracciones, desprendimientos de células, alteraciones generales por autólisis), determinó un bajo número de folículos analizados.



En relación a la **profundidad de ubicación** de las diferentes poblaciones foliculares, los folículos tipo 1 y 2 se mantuvieron en zonas superficiales de la corteza ovárica, mientras que los folículos tipo 3, 4 y 5 se localizaron en regiones más profundas, presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellas; en algunos casos se registraron localizaciones excepcionales en zonas muy profundas de la corteza (Tabla 7).

Tabla 7. Ubicación de los diferentes tipos foliculares en el espesor de la corteza ovárica en cachorras de *A. australis*. Valores expresados en μm como media $\pm$ EEM.

Tipos foliculares	Profundidad (μm)	Rango de profundidad (μm)
Tipo 1	81,2 $\pm$ 24,3 ^a	13 a 400
Tipo 2	175,1 $\pm$ 34 ^b	17 a 1062
Tipo 3	247,08 $\pm$ 52,2 ^c	40 a 928
Tipo 4	372,4 $\pm$ 98,8 ^d †	101 a 1295
Tipo 5	335,2 $\pm$ 214,3 ^e ††	56 a 1363
† : no se incluyeron 4 folículos con profundidades mayores a 550 μm . †† : no se incluyeron 2 folículos con profundidad mayores a 1000 μm . Letras indican diferencias estadísticamente significativas (p= 0,036)		

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Desarrollo folicular

Los datos reportados en este trabajo constituyen el primer registro de las características morfométricas de los folículos ováricos en cachorras de *A. australis* mediante métodos histológicos. Los resultados indican que en hembras prepuberales ocurre un proceso de foliculogénesis desde etapas tempranas de la vida como ocurre en otras especies mamíferas independientemente del estímulo de las gonadotrofinas hipofisarias o a través de estímulos basales (Van Voorhis, 1999). El incremento en el diámetro nuclear, ovocitario y folicular entre folículos de las diferentes categorías (desde el primordial hasta antral temprano) es concordante con las descripciones realizadas para diferentes especies mamíferas (castor, Felipe y col., 1999; cabras, Ariyaratna y Gunawardana, 1997, Sanchez y Ocampo, 1998; vacas, Braw-Tal y Yossefi, 1997; conejas, Zitny y col., 2004; perras, Songsasen y col, 2009; gatas, Reynaud y col, 2009).

El desarrollo folicular puede seguir un patrón de ondas como ocurre en varias especies domésticas (vacas, ovejas, yeguas); las ondas foliculares se generan durante la etapa prepuberal y en forma cíclica en cada ciclo estral, e incluso durante la



gestación (ruminantes y camélidos; Rubianes, 2001; Evans, 2003) estando reguladas por la FSH. En cerdas, los folículos se desarrollan a través de un patrón continuo de crecimiento y atresia, regulado mediante hormonas sintetizadas por el cuerpo lúteo (inhibina, estrógenos) (Evans, 2003). Si bien en pinnípedos no se sabe con certeza cuál es el patrón de desarrollo folicular, es evidente que la foliculogénesis ocurre en hembras prepuberales y adultas fuera de la estación reproductiva (durante la diapausa y la gestación) de acuerdo a los datos reportados en el presente estudio y por la presencia de folículos de diverso tamaño registrados mediante observaciones macroscópicas de ovarios (*C. ursinus*, Craig, 1964; *H. grypus*, Boyd, 1983; *A. tropicalis*, Bester, 1995; Atkinson, 1997; *A. pusillus*, Odendaal, 2000) y métodos ecográficos (Adams y col., 2007) en diferentes etapas del ciclo reproductivo. De acuerdo a las características histomorfológicas, en la loba marina del Norte (*C. ursinus*) los folículos aparentemente se desarrollan de acuerdo al patrón de una onda durante la estación reproductiva (Craig, 1964).

Morfometría

Los resultados obtenidos en cachorras de *A. australis* muestran folículos primordiales de mayor tamaño comparado con *C. ursinus* (Craig, 1964) (promedios: 22µm vs. 30,37µm en cachorras de *A. australis*); quizás en este trabajo, el autor consideró el ovocito como si fuera el folículo sin tener en cuenta el espesor de la capa de células de la granulosa. Por otro lado, los diámetros foliculares máximos registrados en *A. australis* prepuberales (480 µm) fueron menores a los reportados para otras especies de pinnípedos, aunque es de destacar que no contamos con datos de tamaño folicular en hembras prepuberales registrados por métodos histológicos en otros mamíferos marinos. Se puede especular que estas diferencias de tamaño puedan deberse a que en cachorras de *A. australis* las gonadotrofinas no se estén liberando en concentración suficiente para promover un desarrollo folicular de la misma manera que ocurre en especies domésticas antes de la pubertad (Evans, 2003).

A su vez, el espesor de las capas tecales y granulosa en folículos tipo 4 y 5 de es extremadamente delgado en comparación con adultas de *C. ursinus*, indicando a su vez la probable influencia de las gonadotrofinas y hormonas esteroideas sexuales en la proliferación y diferenciación celular según la edad o categoría del animal. La fase de crecimiento folicular explosivo que ocurre en la etapa final de maduración folicular es fuertemente dependiente de las gonadotrofinas e involucra la división de las células de la granulosa e incremento de la esteroidogénesis folicular, mientras que las etapas previas desde folículo primario hasta antral temprano necesitan niveles basales de



estas hormonas hipofisarias (Van Voorhis, 1999). Se presume también que los ovocitos maduros regulan la proliferación de células de la granulosa mediante la liberación de factores parácrinos (GDF-9 y BMP-15) ya que se ha observado una multiplicación más rápida de las células cercanas al ovocito que las células de la granulosa más distales (Eppig, 2001). Sin embargo, en algunos folículos tipo 5 de *A. australis*, se observó una reducción en el número de capas de células de la granulosa en las zonas próximas al ovocito (Fig. 21d y 21e), por lo que quizás sea un complejo de factores los que determinen la multiplicación de las células de la granulosa en forma apropiada.

La morfometría de la capa granulosa en folículos tipo 4 y 5 es coherente con las descripciones realizadas previamente (características del ovario); histológicamente la granulosa estaba formada por 3 a 4 estratos de células, pero en algunos folículos tipo 5 se iba adelgazando hasta reducirse a una capa simple de células epiteliales, lo que en conjunto estaría sesgando los valores de la media y menores a los de los folículos tipo 4.

Respecto a la ubicación de los folículos en la corteza ovárica, la distribución folicular se ajustó a las descripciones clásicas con una localización cada vez más profunda a medida que se desarrollaba el folículo y que después de formado el antro retomaban una ubicación superficial (Zukerman 1962; Bloom-Fawcett, 1993). Son llamativas las localizaciones muy profundas que se observaron en algunos folículos tipo 1 y 2 así como la gran dispersión en la ubicación de los folículos de mayor tamaño, quizás asociado al patrón de migración folicular. Por otro lado, no contamos con referencias en mamíferos marinos o especies relacionadas (perras) respecto a la profundidad folicular dentro de la corteza ovárica que permitan realizar análisis comparativos.

Por último, es importante mencionar que en todos los trabajos de morfometría consultados hubo importantes diferencias en la metodología utilizada que hay que considerar al comparar resultados obtenidos; entre ellos se destacan:

- 1) la clasificación de los folículos es muy heterogénea a pesar de referirse a los mismos estadios de desarrollo, lo que puede dar lugar a confusiones en la interpretación de los parámetros morfométricos.
- 2) las categorías por edades y eventualmente por razas incluidas en cada estudio, muchas veces no estaba especificado o eran generados a partir de un pool muy heterogéneo, y en particular son extremadamente escasos los datos morfométricos en hembras prepuberales de cualquier especie.
- 3) la etapa del ciclo estral o reproductivo en que se obtuvieron las muestras generalmente no era preciso.



4) la metodología en el procesamiento de muestras (morfometría en muestras macroscópicas o por métodos histológicos), calibración del instrumento de medida y los parámetros analizados puntualmente: número de ovarios, número de cortes, diámetros analizados, estadístico aplicado, entre otras.

En conclusión, los datos morfométricos obtenidos de folículos ováricos en cachorras de *A. australis* son diferentes a los reportados para hembras adultas de otras especies de pinnípedos, debiéndose tener especial énfasis que estas diferencias histomorfométricas pueden deberse a diferencias de edad o categoría de las hembras estudiadas.



CAPÍTULO 3: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL TRACTO REPRODUCTOR

LA TUBA UTERINA

Apariencia macroscópica.

La tuba uterina transcurría por el mesosálpinx, el cual envolvía completamente al ovario. Presentaba un trayecto contorneado o en zigzag, desde el extremo ovárico ubicado en la cara medial del ovario, siguiendo la cara lateral hasta desembocar en el cuerno uterino.

La tuba se organizaba en diferentes sectores: infundíbulo, ampolla, istmo y porción uterina o intersticial tal como lo reportado para otros mamíferos (Barone, 1990), difíciles de delimitar externamente debido a las pequeñas dimensiones del órgano y límites no bien diferenciados de dichos sectores. Básicamente se consideró al infundíbulo como el tercio que se abría hacia la bursa uterina, la ampolla o ámpula al tercio medio que discurría por el sector cráneo-medial del ovario, y el istmo-porción

uterina al tercer tercio que desembocaba en el cuerno uterino; este último sector presentaba un trayecto en zigzag más compacto y cada vez más angosto hasta terminar en un segmento recto en el extremo uterino (Fig. 28).

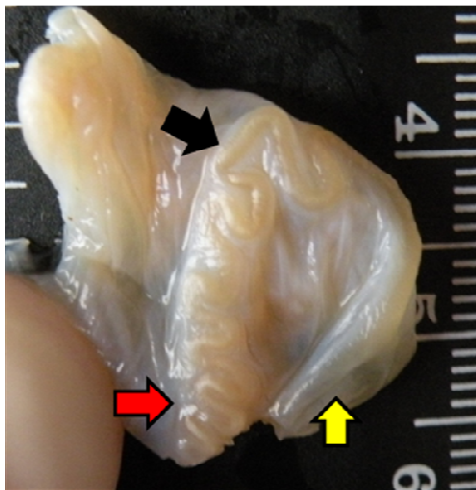


Fig. 28. Vista macroscópica de la tuba uterina y mesosálpinx envolviendo completamente al ovario. Flechas: amarilla: infundíbulo; negra: ampolla; roja: istmo.

Aspecto histológico general

En observación panorámica la mucosa tubárica presentó numerosos pliegues, cuya altura y complejidad se fue reduciendo desde las zonas proximales (infundíbulo) hacia las distales (istmo). Todos los sectores de la mucosa (endosálpinx) presentaron un

revestimiento formado por epitelio simple apoyado sobre un corion de tejido conjuntivo laxo (TCL). Las células epiteliales variaron de cilíndricas a cúbicas. En la población celular no se diferenciaron las células ciliadas de las no ciliadas (glándulas unicelulares o secretorias). El corion de la mucosa estaba formado por TCL y en las zonas cercanas a la muscular se continuaba con un tejido conjuntivo algo más denso y con mayor vascularización pero que no constituía una verdadera submucosa.

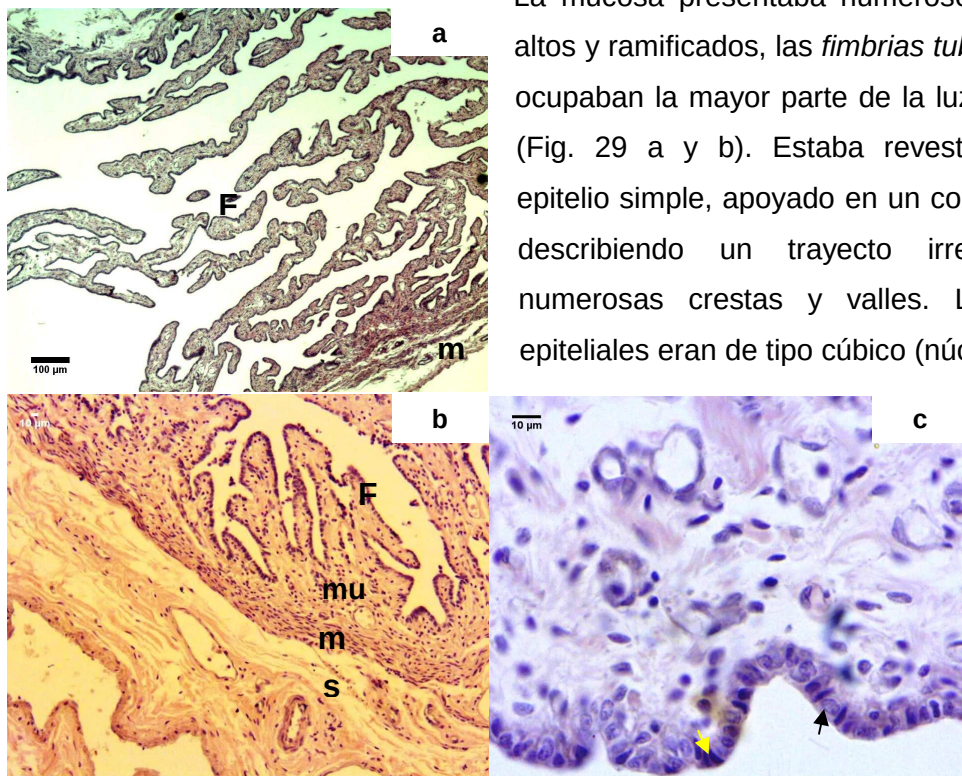


La capa **muscular** (miosálpinx) estaba formada por fibras musculares lisas (FML), con una capa interna circular y externa longitudinal cuyo espesor entre las regiones variaba desde muy delgado hasta ausente: entre ellas se disponía una capa conjuntivo-vascular. La **serosa** estaba formada por dos láminas peritoneales que formaban el **mesosálpinx**; histológicamente estaba formada por una capa de TCL, externamente cubierto por mesotelio, conteniendo en su espesor numerosos vasos sanguíneos, delgadas láminas de músculo liso, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. En algunos sectores presentaba FML, derivadas de la capa muscular, dispuestas en bandas dispersas entre las fibras colágenas. El mesosálpinx envolvía casi completamente al ovario dejando un pequeño orificio: el espacio periovárico, que comunicaba al infundíbulo y al ovario con la cavidad peritoneal.

Sectores:

I.- INFUNDIBULO (*infundibulum tubae uterinae*): de aspecto cónico y pequeño; se abría hacia la bursa ovárica a través del orificio abdominal (*ostium abdominale tubae uterinae*) y de aquí hacia la cavidad abdominal. En su luz se observaron las fimbrias tubáricas como pequeñas proyecciones digitiformes de la mucosa hacia la luz del órgano. Las fimbrias tubáricas se continuaban en el borde externo del infundíbulo con las fimbrias ováricas, éstas últimas poco desarrolladas.

Aspecto microscópico



29. Infundíbulo. **a:** en la mucosa (mu) se observan las fimbrias (F) extensas y delgadas; muscular (m) muy delgada. HE. 40x. **b:** sector periférico de la pared tubárica donde se observa la serosa (s) con grandes vasos sanguíneos. HE. 200x. **c:** detalle de la mucosa infundibular, se observan células cúbicas (flechas negras) y células cilíndricas (flecha amarilla). HE. 400x.

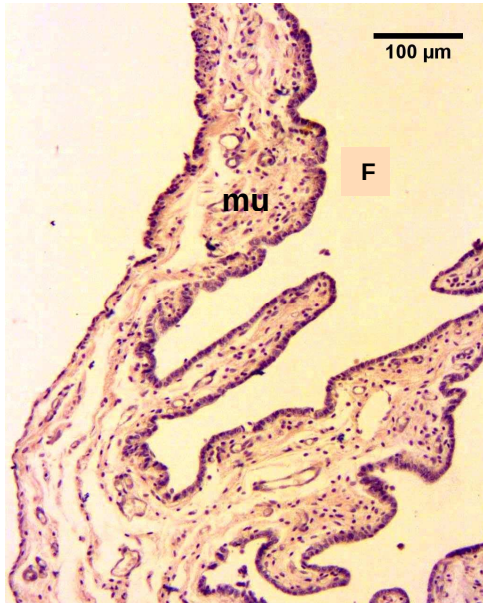


Fig. 30. Infundíbulo. Porción de una fimbria infundibular (F), las células epiteliales están apoyadas sobre un corion con vasos sanguíneos distendidos. HE. 200x.

redondeado eucromático) y cilíndricas (núcleo alargado heterocromático) sin cilias (Fig. 29 c). En los pliegues mayores, se observó un eje de tejido conjuntivo algo más denso y regular que rodeaba a los vasos sanguíneos, en particular venas de diferente calibre y vasos linfáticos (Fig. 30); este TCD se continuaba hacia la periferia limitando con la capa muscular donde las fibras colágenas y fibroblastos se ordenaban en sentido circular. La capa **muscular** se observó relativamente delgada, formada por FML (29 a y b); la mayor parte de las fibras estaban dispuestas en sentido circular y sólo en algunos cortes se observaron escasas bandas longitudinales. En su espesor se localizaron numerosos cortes de vasos

sanguíneos, pequeñas ramas nutricias y otros vasos mayores que ascendían hacia la mucosa a través de delgados haces de tejido conectivo. La **serosa** era ancha conteniendo en su espesor cortes de vasos sanguíneos (venas, arterias) y linfáticos que se continuaban hacia el mesosálpinx donde se alojaban importantes nervios, gruesas bandas de FML derivadas de la capa muscular y adipocitos, en particular en los sectores más alejados de la pared del infundíbulo (Fig. 29 b).

En los sectores más cercanos al ovario, las fimbrias tubáricas eran mucho más largas y se continuaban con las fimbrias ováricas pero de manera poco marcada; la estructura de la mucosa era similar a la del infundíbulo pero la capa muscular era aún más delgada y en algunos sectores era apenas evidente.

II.- AMPOLLA (*ampulla tubae uterinae*): externamente estaba poco diferenciada de las otras regiones, por lo que se la consideró como la región media y más extensa de la tuba uterina.

Aspecto microscópico

La **mucosa** presentaba pliegues de menor altura y menos ramificados que en el infundíbulo (Fig. 31a); el revestimiento epitelial era similar al resto de la tuba uterina. Las fibras del corion se orientaban irregularmente por debajo del epitelio pero hacia el eje de los pliegues mayores y en la unión con la capa muscular, las células y fibras



adquirían un ordenamiento más regular, en sentido circular y paralelas entre sí (Fig. 31b).

La **muscular** era algo más ancha que el infundíbulo; la capa circular interna era la más desarrollada y sus células se entremezclaban con los fibroblastos y fibras colágenas en la zona limitante con el corion de la mucosa; la muscular externa era longitudinal y más delgada, externamente se observaron algunas fibras oblicuas. Entre ambas capas musculares se disponían haces de TCD con vasos sanguíneos relacionados tanto con los estratos más superficiales de la mucosa como los periféricos de la serosa (Fig. 31c).

La **serosa** era relativamente gruesa; en los sectores periféricos se observaron bandas de FML derivadas de la muscular que formaban como un anillo perimetral, muy vascularizado y acompañado por haces nerviosos y tejido adiposo (Fig. 31a, b, c). En un ejemplar, los sectores periféricos del mesosálpinx presentaban abundantes adipocitos y entre ellos se ubicaban grupos de células linfoides (macrófagos, células gigantes, linfocitos) (Fig. 31c y d).

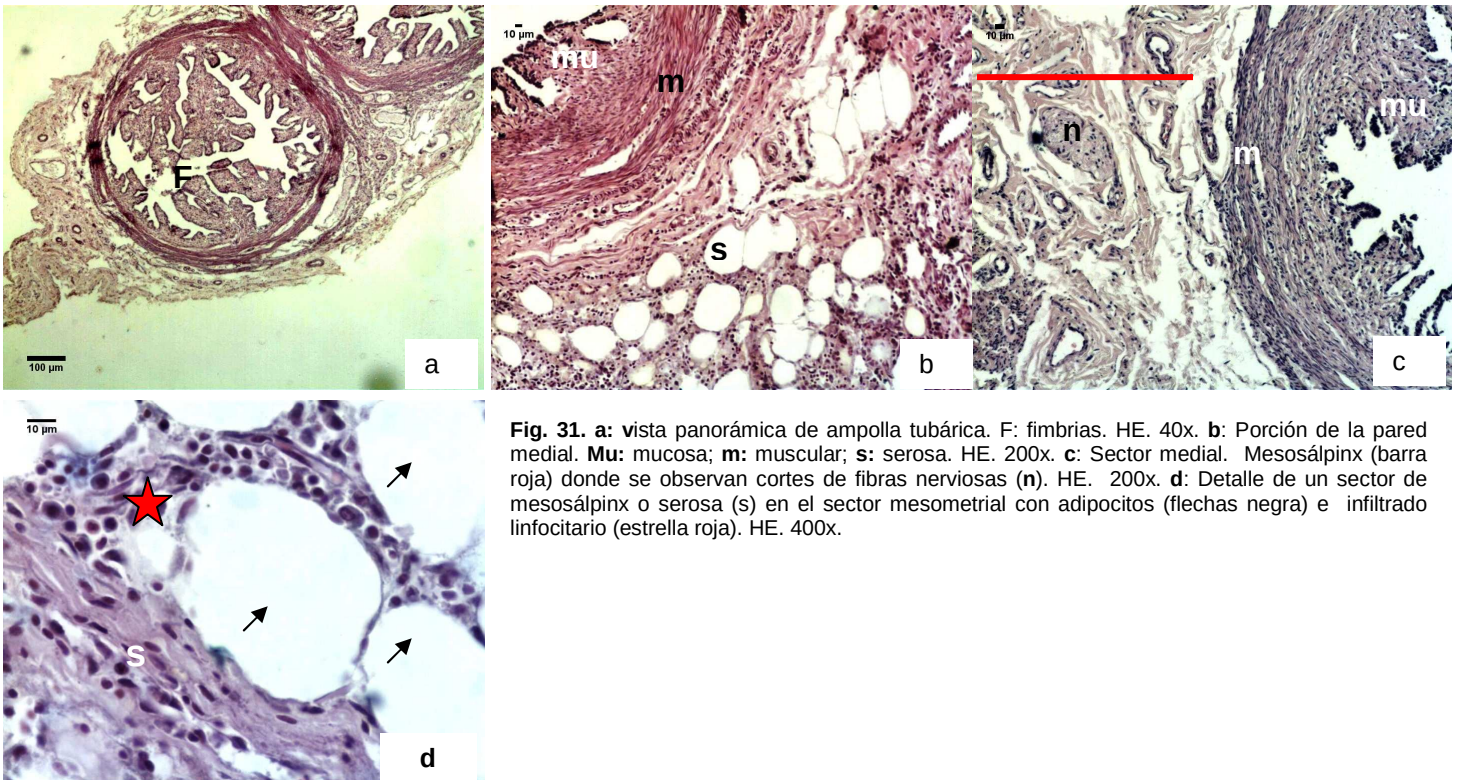


Fig. 31. a: vista panorámica de ampolla tubárica. F: fimbrias. HE. 40x. b: Porción de la pared medial. Mu: mucosa; m: muscular; s: serosa. HE. 200x. c: Sector medial. Mesosálpinx (barra roja) donde se observan cortes de fibras nerviosas (n). HE. 200x. d: Detalle de un sector de mesosálpinx o serosa (s) en el sector mesometrial con adipocitos (flechas negra) e infiltrado linfocitario (estrella roja). HE. 400x.



III.- ISTMO (*isthmus tubae uterinae*): era la porción más estrecha y cercana al cuerno uterino. Se la consideró junto con la “**porción uterina**” (*pars uterina*) que desemboca en el útero a través del orificio uterino tubárico (*ostium uterinum tubae*).

Aspecto microscópico

La **mucosa** presentaba pliegues de menor altura (Fig. 32a) y el epitelio de revestimiento era similar a los otros sectores tubáricos (Fig. 32c). El estroma conjuntivo en las zonas profundas que contactaba con la muscular era más delgado que en las otras regiones de la tuba.

La capa **muscular** interna era más ancha que en el infundíbulo y la ampolla, con fibras en sentido circular; la muscular externa presentaba fibras oblicuas o longitudinales, era muy delgada y no estaba presente en todo el perfil del corte, sino que presentaba fibras entremezcladas con las circulares o estaban ausentes (Fig. 32b).

La **serosa** era ancha con vasos sanguíneos de gran calibre en particular en las regiones que se continuaban con el mesosálpinx (32 a y b); presentaba haces de FML en gruesas bandas separadas por tabiques de fibras colágenas y dispuestas en zonas periféricas del mesosálpinx, como anillo o límite externo, extendiéndose hacia zonas distales del mesosálpinx. En dos ejemplares, en los sectores más externos del mesosálpinx, entre las fibras colágenas o musculares se observaron grupos de células con aspecto “epitelioide” e infiltrado linfocitario. Al igual que en las otras regiones presentaba una importante irrigación e inervación.

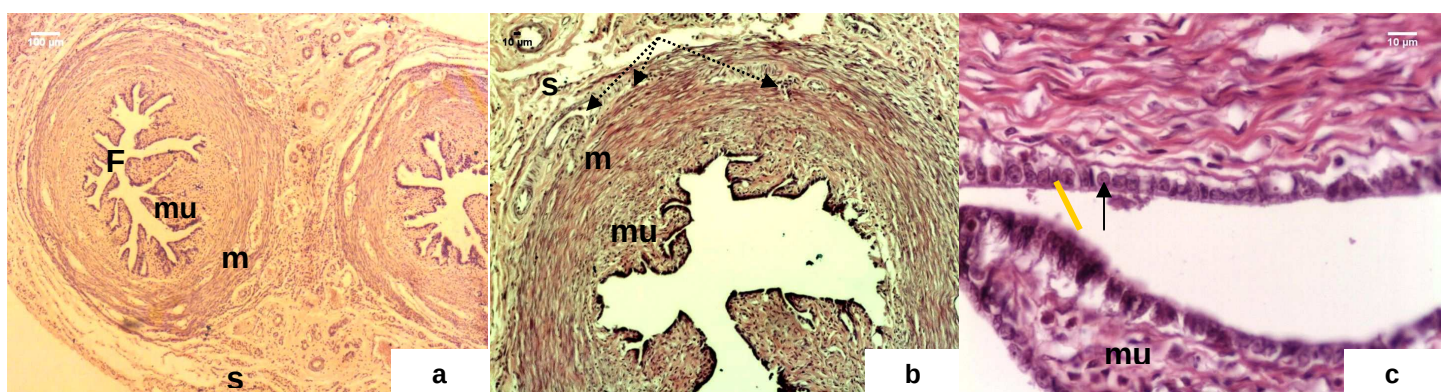


Fig. 32. Istmo. a: Fimbrias cortas, pared muscular mas ancha que en los otros sectores. HE. 40x. b. Istmo. Pared muscular con numerosos vasos sanguíneos (flechas punteadas) provenientes de la serosa. HE.200x. c: Epitelio de revestimiento con células cúbicas (flecha negra) y cilíndricas (línea amarilla). mu: mucosa; m: muscular; s: serosa. HE. 400x.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Microscópicamente la tuba uterina de cachorras de *A. australis* era similar a la de otros mamíferos siendo ésta la única referencia registrada en pinnípedos de esa categoría etaria.

La descripción realizada por Tedman (1991) para hembras adultas de *N. cinerea* no detalla las diferentes poblaciones de células que componen el epitelio de revestimiento: ciliadas y secretorias (o no ciliadas). En *O. flavescens*, se describió la tuba uterina como “un amplio pabellón rico en franjas” (numerosos pliegues de acuerdo a las fotos del artículo), con epitelio alto sin cilias (Buño y col., 1950); esta característica puede ser debida al momento de muestreo durante la diapausa o gestación donde las influencias hormonales no estuvieran promoviendo la ciliogénesis o diferenciación celular activa. En perras prepuberales (especie doméstica más emparentada a los pinnípedos) el epitelio tubárico está formado por células cúbicas; bajo tratamiento estrogénico ocurrió una marcada citodiferenciación dando origen a células secretoras y células cilíndricas ciliadas; la supresión de hormonas (estrógenos y progesterona), determinaron la regresión o desdiferenciación celular volviendo la mayoría a su estado inicial, determinándose así la influencia de los esteroides sexuales en la diferenciación celular de la tuba uterina, en particular de algunos segmentos de la ampolla tubárica donde ocurre la fecundación (Sawyer y col. 1984; Steinhauer y col, 2004). Los resultados obtenidos en cachorras de *A. australis*, donde el epitelio de revestimiento no presentaba células ciliadas ni células secretorias pero sí células epiteliales cúbicas y cilíndricas, probablemente sea debido a que las hembras eran sexualmente inmaduras y por tanto no estén bajo el estímulo de hormonas que promovieran la diferenciación celular.

Por otra parte, en aquellos sectores donde las capas musculares están bien definidas (ampolla e istmo), se interpone entre ellas una capa conjuntivo vascular similar a lo descrito por Barone (1990) para las especies domésticas aunque no encontramos descripciones similares en otras especies de pinnípedos.

Con respecto a la innervación del órgano, si bien en las cachorras de *A. australis* se observaron cortes de nervios en el mesosálpinx y en la serosa inmediatamente por debajo de la muscular, con las técnicas histológicas de rutina no se pudo identificar sus terminaciones hacia los diferentes sectores de la pared del órgano. En pinnípedos no se han publicado trabajos referentes a la innervación de la tuba uterina. En la mujer y algunas especies domésticas, la innervación autonómica (simpática y parasimpática) de la tuba uterina está distribuida en el miosálpinx, en los vasos sanguíneos y la mucosa tubaria (Bloom-Fawcett, 1993). A nivel de la ampolla, la capa muscular longitudinal está innervada primariamente por alfa-adrenorreceptores, mientras que en



la capa circular predominan los beta-adrenoreceptores. La innervación adrenérgica junto con el estímulo de otros neurotransmisores, regulan la contractilidad muscular del istmo funcionando como un *esfínter* que regula el transporte ovocitario o embrionario (humanos, Lindblom y col, 1979). En otras especies, las terminaciones nerviosas se distribuyen hacia la pared de los vasos sanguíneos y los diferentes sectores de la tuba (bovinos, Wrobel y Kujat, 1993; mona, Cottle y Higgs, 1998) que provee un mecanismo contráctil de regulación del flujo sanguíneo y motilidad tubárica en las diferentes etapas del ciclo reproductivo asociado a su vez a estímulos de esteroides sexuales (García-Pascual y col, 1996; Knobill, 1999). Se podría especular que en pinnípedos, la innervación tubárica podría participar en la regulación del flujo sanguíneo y el transporte ovocitario-embrionario como ocurre en otras especies mamíferas.

En suma, los hallazgos histológicos obtenidos en cachorras de *A. australis* son similares a otras especies mamíferas y constituyen los primeros registros básicos para la especie. Los datos generados podrán contribuir a la evaluación de cambios morfofuncionales del órgano en hembras sexualmente maduras asociados al proceso de fecundación y preparación del embrión para la diapausa.



EL ÚTERO

Aspecto macroscópico

El útero de las lobas marinas *A. australis* se clasifica como bipartito (Barone, 1990) de acuerdo a sus características anatómicas, ya que presenta forma de Y griega. Los cuernos uterinos se observaron largos, rectos y algo curvados en el tercio proximal; el cuerpo era relativamente corto, presentando en su luz un tabique medial (velo del útero) que lo dividía de forma incompleta.

Cuernos y cuerpo uterino (*Cornu et corpus uteri*): los cuernos formaban la mayor parte del órgano y eran de apariencia delgada; en su extremo proximal se unían a la tuba uterina, hacia su tercio distal ambos cuernos estaban adosados por su cara medial y se continuaban caudalmente con el cuerpo del útero (de perfil más redondeado). La porción unificada de los cuernos (que he denominado “*de transición*”) y el cuerpo del útero eran difíciles de diferenciar externamente; la referencia más comúnmente utilizada para diferenciar ambos sectores era la disposición de la pared dorsal de la vejiga que se encontraba adosada al cuerpo uterino. Internamente, en la porción de transición (33a), las paredes mediales de cada cuerno estaban fusionadas formando un tabique medial que se extendió hasta el cuerpo del útero. El cuerpo uterino era corto, y el tabique medial: “velo del útero” (*velum uteri*), derivado de los cuernos, se extendía aproximadamente en su mitad proximal y ventral. En la luz de los

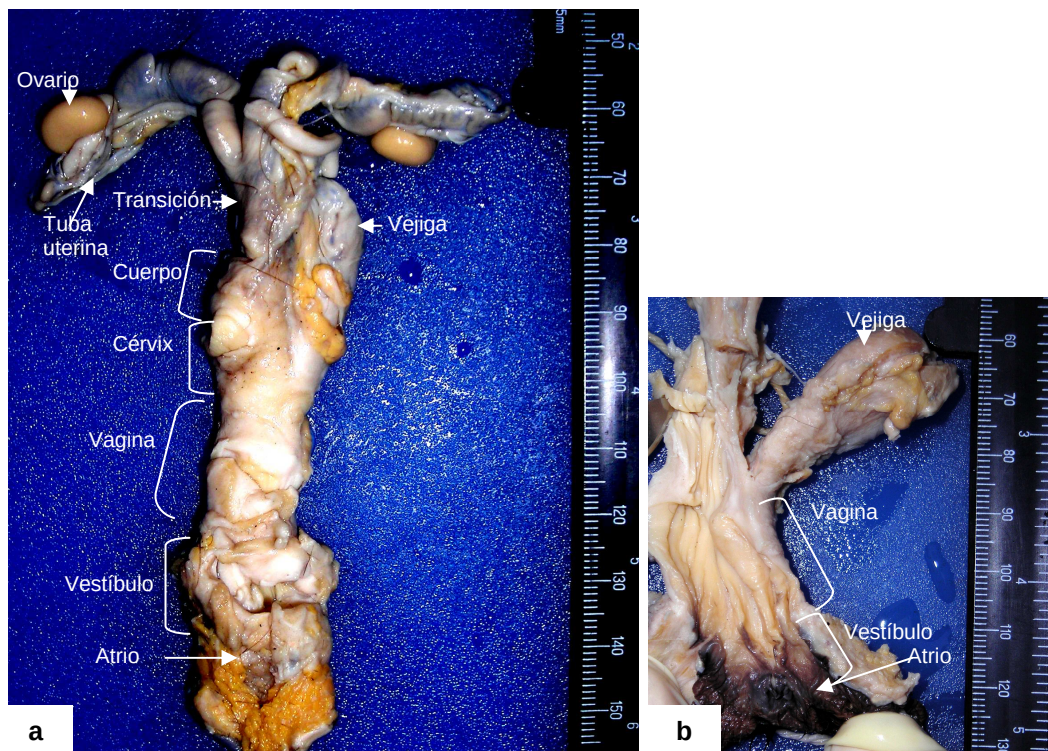


Fig. 33. a: Vista exterior del tracto reproductor de cachorra de *A. australis*. b: Vista interior de la porción distal del tracto reproductor.



diferentes sectores se observaron pliegues longitudinales que al corte transversal le daban un aspecto estrellado irregular.

Cérvix: corresponde a la porción caudal del útero que se observó formada por un engrosamiento de la pared entre el cuerpo uterino y la vagina. En la porción central se ubicaba el canal cervical; el “orificio interno” se abría hacia el cuerpo del útero (*ostium interno*), y el “orificio externo” (*ostium externo*) hacia la vagina. La pared del cérvix se extendió hacia el fondo de la vagina a través de una estructura de pared voluminosa correspondiente a la porción vaginal del cérvix (*Portio vaginalis cervicis*) también denominado hocico de tenca; entre la porción vaginal del cérvix y la pared de la vagina quedaba un surco relativamente profundo correspondiente al **fórnix** (33b).

Estructura histológica del útero

Los cuernos uterinos de las cachorras analizadas presentaron las mismas características histomorfológicas generales en toda la extensión de los cuernos (proximal, medio y distal), existiendo diferencias a nivel de la mucosa del cuerpo uterino y cérvix.

CUERNOS UTERINOS

En todos los casos, en la observación panorámica de los cortes transversales se visualizó una luz irregular debido a los pliegues longitudinales de la mucosa que ocupaban la luz del órgano (Fig. 34).

Mucosa o endometrio: estaba revestida por un epitelio simple cúbico ó cilíndrico cuyas células presentaban núcleo ovalado perpendicular a la superficie basal y escaso citoplasma, y en menor proporción se observaron células cúbicas de núcleo

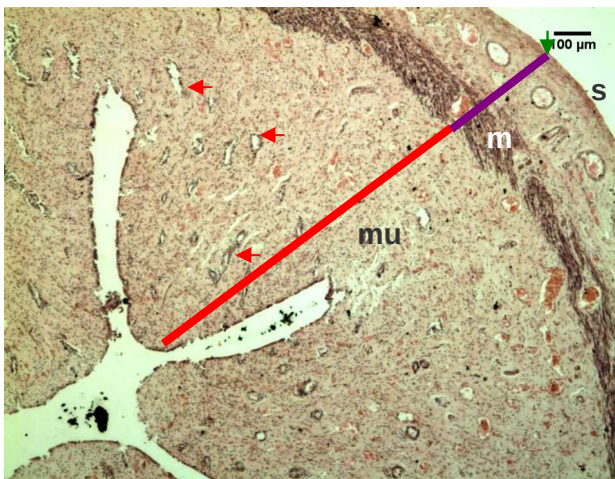


Fig. 34. Cuerno uterino, vista panorámica. HE- 40x. Línea roja y **mu**: mucosa; línea violeta y **m**: muscular; **s** y flecha verde: serosa; flechas rojas: glándulas endometriales.

redondeado y citoplasma pálido, todas apoyadas sobre un corion de TCL. No se observaron cilias en la superficie apical de las células. Las glándulas mucosas o endometriales (*Glandulae uterinae*) eran tubulares simples, formadas por un epitelio cúbico simple, se extendían hasta la profundidad de la mucosa y estaban limitadas por delgadas



bandas de tejido conjuntivo. Las glándulas eran poco numerosas y con distribución homogénea por toda la pared del cuerno uterino (Fig. 34 y 35). El corion o lámina propia de la mucosa (*Stroma endometrialis*) estaba formado por TCL; en el sector subepitelial o superficial, las células y fibras se ordenaban en sentido paralelo a la superficie o en forma irregular; en los pliegues mayores tomaban un sentido perpendicular a la superficie y paralelas entre sí, y en el estroma profundo se tornaban circulares en el sentido de las fibras del miometrio; sus fibras se continuaban con el tejido conjuntivo interfascicular del miometrio. En su espesor se alojaban vasos sanguíneos de diferente calibre provenientes del miometrio, destacándose la presencia de numerosos capilares y venas en las porciones más superficiales (Fig. 35 y 36).

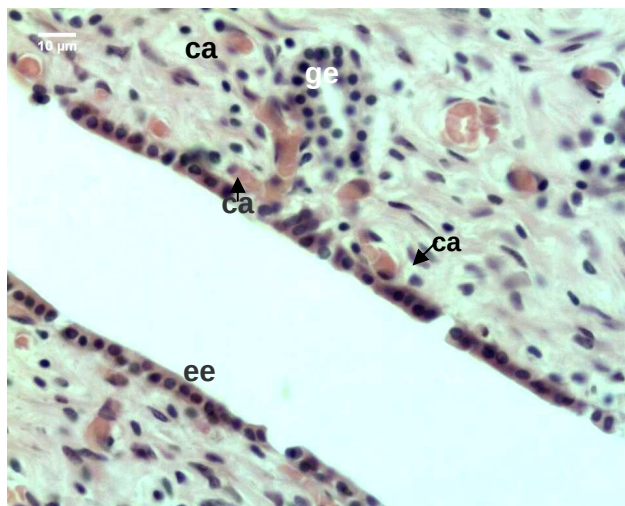


Fig. 35. Endometrio revestido por epitelio simple, glándula endometrial y numerosos capilares en el estroma. HE. 400x. ee: epitelio endometrial; ge: glándula endometrial; ca: capilar.

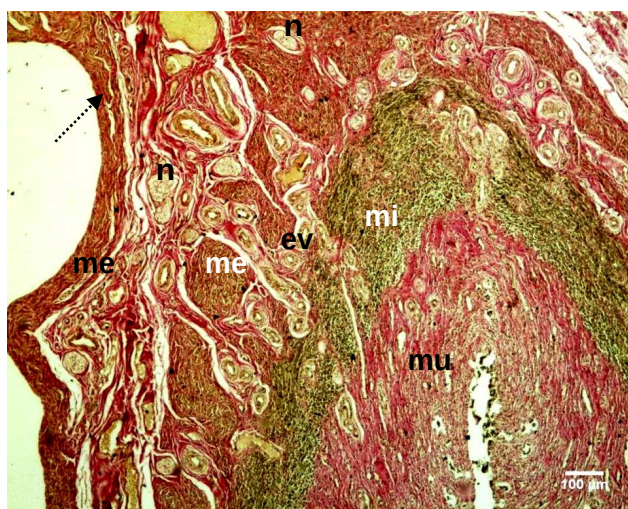


Fig. 36. Pared uterina. Sector mesometrial y lateral; muscular interna ancha atravesada por grandes vasos y nervios del estrato vascular, la muscular externa en esta zona deriva una gruesa capa de fibras hacia el ligamento mesometrial (flecha punteada). Van Giesson. 40x. mu: mucosa; mi: muscular interna; me: muscular externa; ev: estrato vascular; n: nervio.

Muscular o miometrio: se evidenciaron tres estratos:

Capa interna, formada por FM circulares; tendió a ser la capa muscular más gruesa; las fibras se encontraban atravesadas por tabiques de tejido conjuntivo que acompañaban a los vasos y nervios que se dirigían o provenían de la mucosa y se continuaban externamente hacia el estrato vascular.

Capa media o estrato vascular, muy desarrollado, formada por un estroma de TCD junto a grandes vasos y nervios de donde provenían ramas hacia las capas musculares y desde allí a la mucosa. El estrato vascular se ensanchaba notablemente en la zona que recibía los vasos del mesometrio de la misma forma que lo hacía la muscular externa (Fig. 36).

Capa externa, con FML dispuestas en sentido longitudinal y en general era más delgada que la capa



muscular interna en la mayor parte del perfil del órgano.

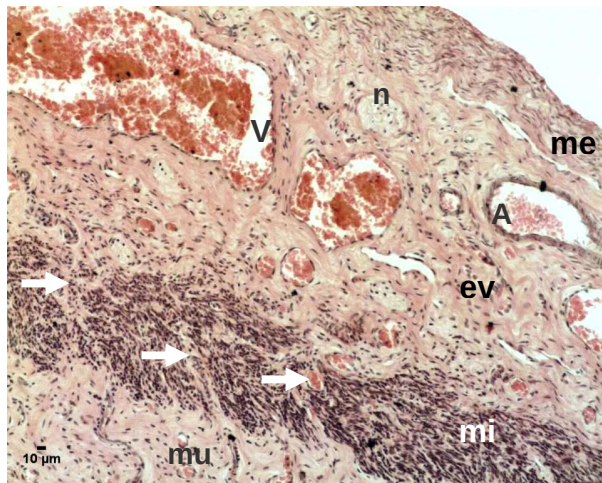


Fig. 37. Miometrio y sector profundo del endometrio, se observan grandes vasos sanguíneos y nervio en el estrato vascular y vasos sanguíneos (flechas blancas) que atraviesan la muscular interna desde el endometrio. HE-200x. **mu:** mucosa; **mi:** muscular interna; **me:** muscular externa; **ev:** estrato vascular; **s:** serosa; **A:** arteria; **V:** vena; **n:** nervio.

En la zona mesometrial de los cuernos, la capa muscular externa se observó dividida o segmentada por bandas de tejido conjuntivo provenientes del mesometrio y extendía hacia éste gruesos haces musculares ubicados hacia la periferia de la serosa conformando una gruesa capa (fibras longitudinales u oblicuas). A través de las bandas conjuntivas transcurrían importantes vasos y nervios que gradualmente se distribuían en la zona media constituyendo el estrato vascular.

En la cara mesometrial (*Margo mesometricus*) de los cuernos uterinos, las capas musculares externa e interna se disponían de forma muy estrecha reduciéndose el espesor de la capa vascular y gradualmente se ensanchaba a medida que se dirigía hacia las caras laterales y antimesometrial/libre (*Margo liber*). Esta conformación era aún más marcada en los sectores medio y distal de los cuernos donde se observaba una capa muscular de gruesos haces longitudinales (separados por bandas de TC) y en la porción central, se ubicaba el TCD proveniente del mesometrio que alojaba a los grandes vasos y nervios del plexo uterino (complejo masivo vascular) (Fig. 36 y 38). Hacia la cara antimesometrial del cuerno se ubicaban las restantes capas del miometrio en su distribución habitual (Fig. 37).

En las tres capas musculares se observó una importante vascularización e inervación proveniente del mesometrio, en particular arterias que se ramificaban desde el estrato vascular y tomaban un trayecto espiralado ascendente hacia la mucosa. Tanto en el estrato vascular como en las capas musculares se observaron numerosos cortes de fibras nerviosas (Fig. 36, 37 y 38).

Serosa o perimetrio: era delgada, formada por TCL cubierto por mesotelio. La pared se ensanchaba a nivel del mesometrio, donde se observaron cortes de vasos sanguíneos de gran calibre, adipocitos, nervios y gruesas bandas de FML provenientes de la capa longitudinal externa dispuestas en una de las caras del mesometrio (Fig. 36, 38 y 39). En algunos ejemplares, entre los adipocitos y vasos del mesometrio también se observaron acúmulos linfoides similares a los presentes en la serosa de la tuba uterina.

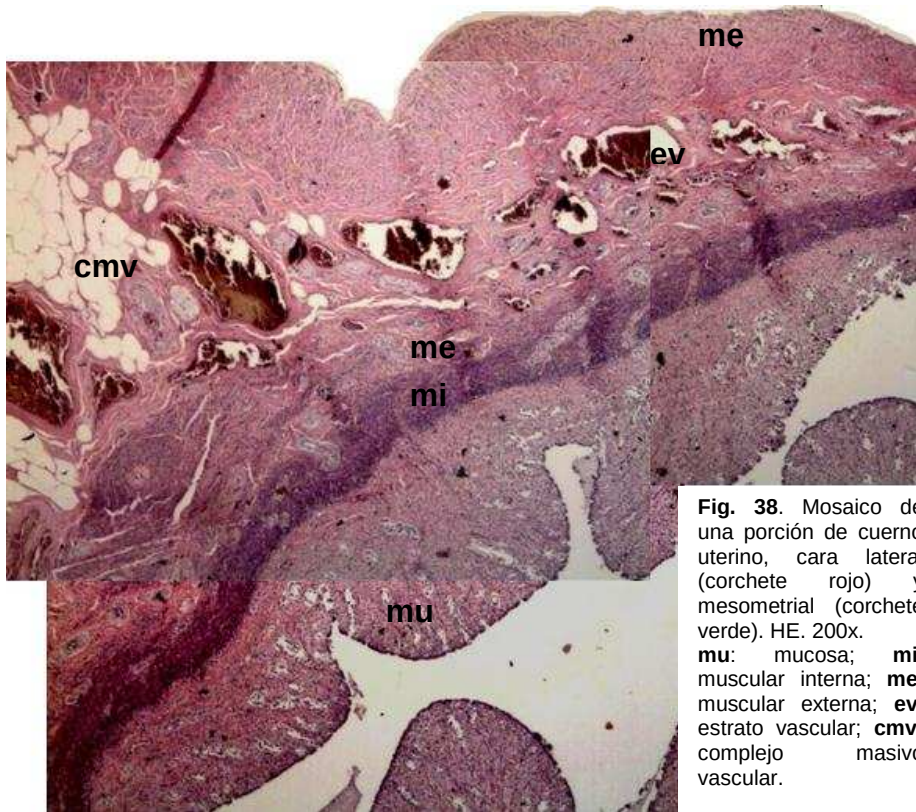


Fig. 38. Mosaico de una porción de cuerno uterino, cara lateral (corchete rojo) y mesometrial (corchete verde). HE. 200x.
mu: mucosa; **mi:** muscular interna; **me:** muscular externa; **ev:** estrato vascular; **cmv:** complejo masivo vascular.

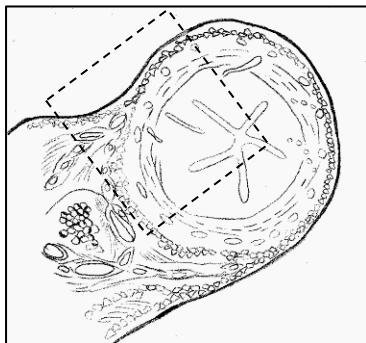


Fig. 39. Esquema de cuerno uterino, vista transversal. Recuadro: ubicación aproximada de la fig. 38.

PORCIÓN DE TRANSICIÓN O DE FUSIÓN DE LOS CUERNOS

Así se denominó el sector donde ambos cuernos se encontraban unidos externamente por su cara medial. Internamente se observaron dos luces correspondientes a cada uno de los cuernos, cuya luz estaba ocupada por pliegues longitudinales de la mucosa (Fig. 40 y 41).

Mucosa/endometrio: presentó numerosos pliegues longitudinales. El epitelio variaba desde las regiones más craneales a las caudales de *cilíndrico simple* a *pseudoestratificado cilíndrico alto* con células basales y cilíndricas, apoyadas en un corion de TCL irregular con abundantes fibras colágenas (Fig. 41). Las glándulas



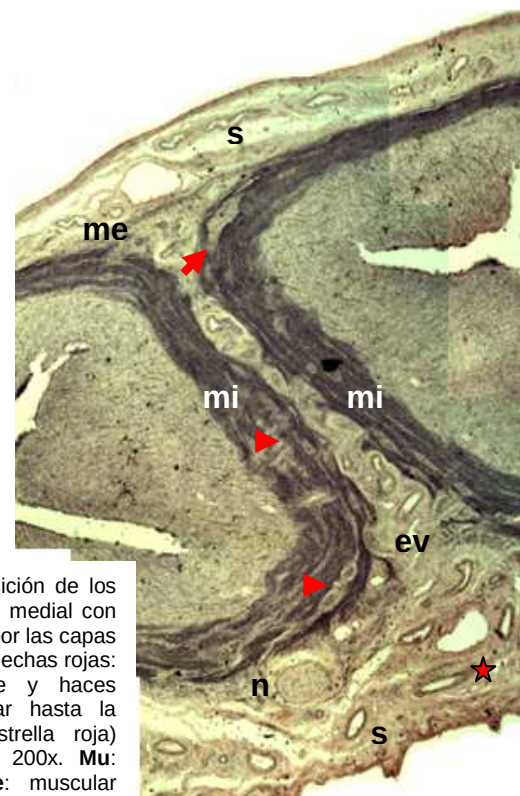
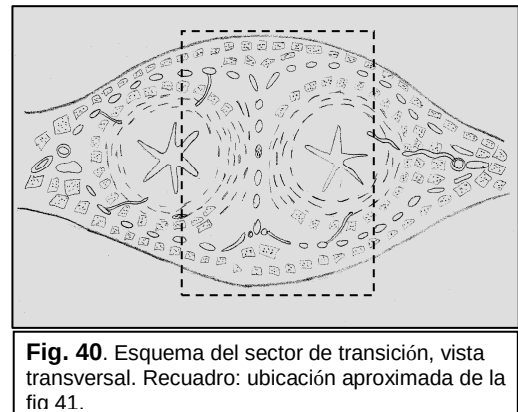
endometriales eran escasas y se localizaban en los sectores proximales pero gradualmente se iban reduciendo hasta desaparecer en sectores distales. Al igual que en los cuernos, dichas glándulas eran de tipo tubular simple formadas por epitelio cilíndrico o cúbico simple. Hacia la profundidad de la mucosa, el estroma conjuntivo estaba formado por TCD, con fibras colágenas orientadas paralelas a los pliegues y hacia la periferia

acompañaban la dirección circular de las fibras musculares internas; en este límite las fibras colágenas se entremezclaban con las provenientes de la capa muscular.

La pared de la mucosa presentaba numerosos vasos sanguíneos provenientes de capas periféricas

del órgano que se ordenaban siguiendo la dirección de las fibras conjuntivas.

La distribución de las **capas musculares** seguía el patrón observado en los cuernos, con una capa muscular interna circular ancha y otra externa longitudinal. En general las capas y haces musculares se encontraban separadas por bandas de tejido conjuntivo junto a numerosas arterias; a su vez la muscular externa estaba subdividida en las caras laterales por una gruesa capa de TCD con vasos de gran calibre (arterias, venas) y nervios, que se engrosaba notablemente desde la zona ventral hacia las zonas laterales y se dirigían al mesometrio y ligamento ancho (Fig. 41, 43 y 44).





10 µm

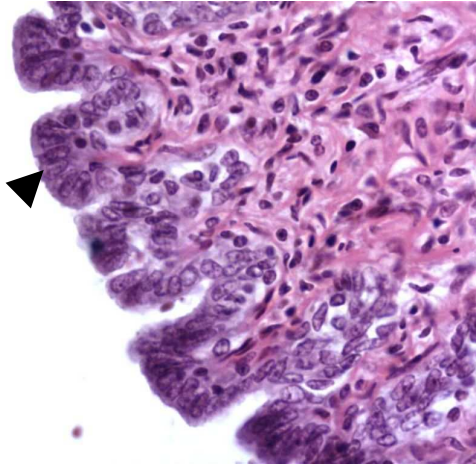


Fig. 42. Transición. Mucosa revestida por epitelio cilíndrico simple (flecha negra) apoyado sobre el corion laxo (flecha blanca). HE. 400x.

El **estrato vascular** estaba bien desarrollado en particular en las regiones laterales asociadas al mesometrio, y desde allí se interponía entre los haces de fibras musculares externas dividiéndolas en dos estratos de fibras musculares longitudinales (Fig. 43), hasta distribuirse por la región medial entre ambos cuernos uterinos.

El tabique medial que separaba ambos cuernos presentaba fibras musculares derivadas de la capa interna circular y en su eje encerraba importantes

vasos sanguíneos y nervios provenientes del estrato vascular, los cuales brindaban ramas menores hacia la mucosa de ambos cuernos (Fig. 41).

En las regiones distales cercanas al cuerpo, la vascularización de la región medial de la pared se reducía (zona del velo del útero) y las capas musculares de la zona medial aumentaban su grosor de forma notable. Aquí, la capa externa longitudinal estaba muy desarrollada hacia la región medial y se encontraba dividida por una gruesa banda de TCD que alojaba a los grandes vasos (similar a un segundo estrato vascular). Hacia las zonas laterales del cuerpo uterino esta capa muscular se reducía y las fibras colágenas que daban origen al segundo estrato vascular eran predominantes (Fig. 43).

Serosa/perimetrio: era ancha conteniendo grandes vasos y nervios derivados del mesometrio. Desde las zonas asociadas al ligamento ancho y regiones laterales de la serosa se observó la presencia de grandes vasos que constituían el estrato vascular y

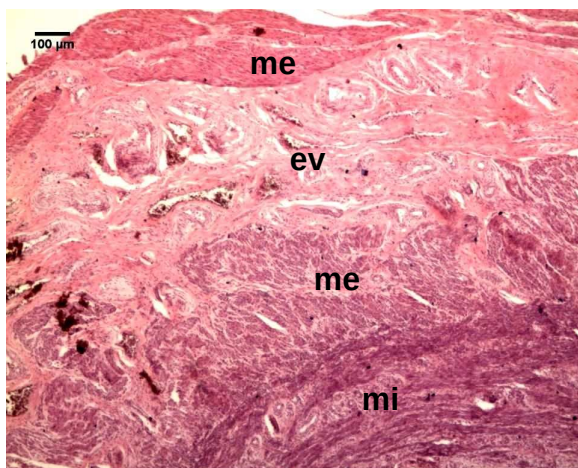


Fig. 43. Transición. Porción dorso-lateral de la pared muscular donde se observa las dos capas de la muscular externa separadas por un grueso tabique de tejido conjuntivo por donde corren grandes vasos y nervios a modo de un segundo estrato vascular. HE. 40x. **mi:** muscular interna; **me:** muscular externa; **ev:** estrato vascular; **n:** nervio; **s:** serosa.

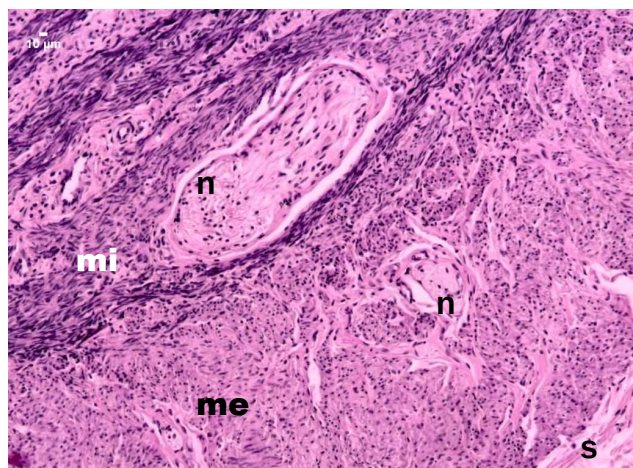


Fig. 44. Transición. Capa muscular donde se observa el corte de dos fibras nerviosas entre la circular interna y otra en longitudinal externa. HE. 200x. **mi:** muscular interna; **me:** muscular externa; **ev:** estrato vascular; **n:** nervio; **s:** serosa.



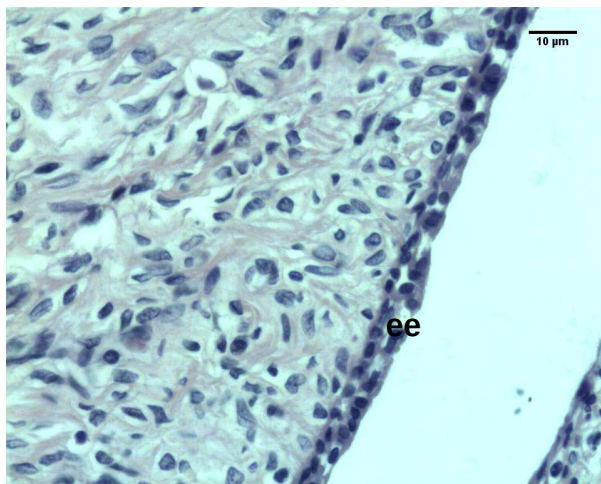
desde allí aportaban ramas hacia la mucosa. En los sectores de mesometrio se destacaba la presencia de grandes fibras nerviosas que se extendían hasta la muscular interna así como ganglios nerviosos los cuales formaban parte de una cadena ganglionar perteneciente al **plexo paracervical o de Frankenhäuser (PFH)**; esta cadena ganglionar se prolongaban caudalmente hasta las porciones craneales de la vagina. Este plexo de ganglios se disponía bilateralmente por fuera de la serosa y en algunos casos entre las capas más externas de la capa muscular. Las técnicas de coloración aplicadas no permitieron discriminar diferentes tipos celulares o neuronas. El PFH no era observable macroscópicamente.

CUERPO UTERINO

El cuerpo uterino era pequeño y fue seccionado y estudiado en dos porciones. La región proximal del cuerpo uterino era la continuación distal de la zona de transición de los cuernos; aquí la luz del órgano se encontraba dividida medialmente por el velo del útero (*Velum uteri*). La mitad distal correspondía a la cavidad común del útero que se continuaba con el orificio interno del cérvix.

La **mucosa** presentaba numerosos pliegues longitudinales que deformaban la luz al igual que en los cuernos uterinos. El epitelio endometrial era biestratificado formando en algunos casos pequeñas invaginaciones en la superficie. El corion subepitelial estaba formado por TCL, mientras que predominaba el denso en el resto del estroma. No se observaron glándulas endometriales (Fig. 45).

La **muscular** estaba formada por una capa interna circular muy ancha y otra externa con fibras longitudinales y oblicuas, atravesadas por grandes vasos sanguíneos y nervios provenientes del perimetrio. El estrato vascular no estaba bien



definido en la región media pero se destacaba en las zonas laterales del cuerpo. En la región media dorsal y ventral, la capa externa era más delgada, con vasos de pequeño calibre; gradualmente esta capa se iba ensanchando hacia las zonas laterales del cuerpo uterino junto con el estroma interfascicular del perimetrio acompañado de numerosos vasos

Fig. 45. Cuerpo uterino. Mucosa; se observa el epitelio endometrial (ee) biestratificado apoyado en un corion de TCL carente de glándulas endometriales. HE. 400x.



sanguíneos y nervios. Aquí la muscular externa era más ancha y doble con un estrato

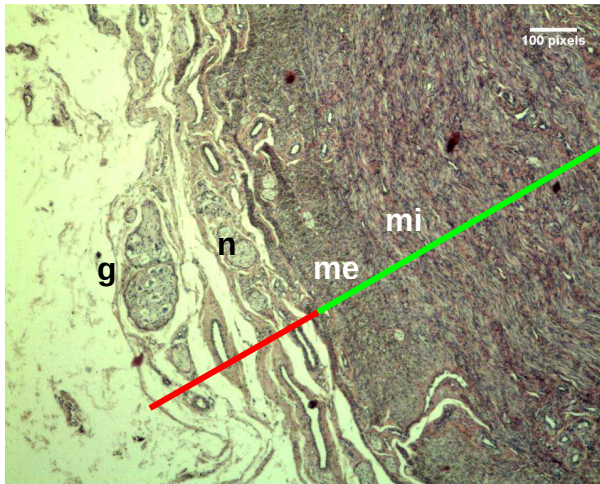


Fig. 46. Cuerpo uterino. Capa muscular (línea verde) y serosa (línea roja) donde se disponen los ganglios (g) y fibras nerviosas (n) del PFH. HE. 40x. **me:** muscular

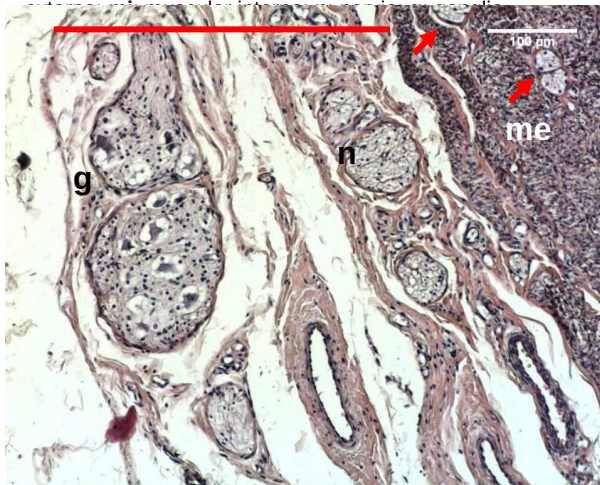


Fig. 47. Cuerpo uterino. Serosa (línea roja), vista magnificada de los ganglios y nervios del PFH donde se observa a los nervios ubicados en el espesor de la muscular interna (flechas rojas). HE. 200x. **me:** muscular externa; **n** y flechas rojas: nervio; **g:** ganglio

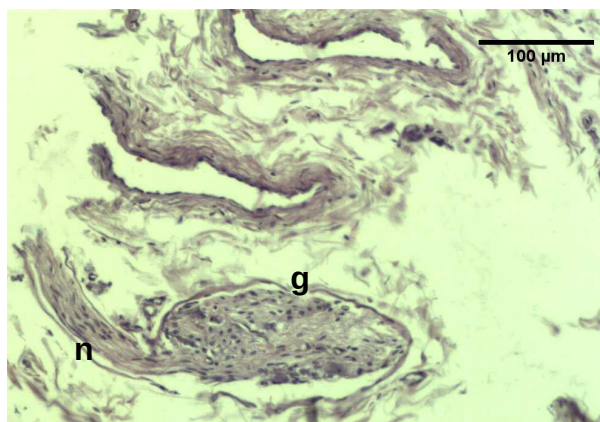


Fig. 48. Cuerpo uterino. Detalle de un ganglio y la salida de sus fibras nerviosas junto a dos vasos sanguíneos en la serosa. HE. 200x. **n:** nervio; **g:** ganglio.

vascular entre medio de las dos capas similar al sector de transición pero comparado con éste, se observaba un aumento del grosor de la pared, en particular la capa muscular circular interna (Fig. 46).

En las zonas más distales se observó el corte de la vejiga, revestida externamente por una serosa y parte del mesometrio.

El **perimetrio** presentaba las mismas características que una serosa con numerosos vasos, nervios y ganglios nerviosos del PFH (Fig. 46, 47, 48 y 49).

El **velo del útero (*Velum uteri*)** tenía la misma estructura que en la zona de transición pero con menor densidad de fibras musculares circulares, menor número de vasos y de menor calibre; también se observaron cortes de fibras nerviosas.

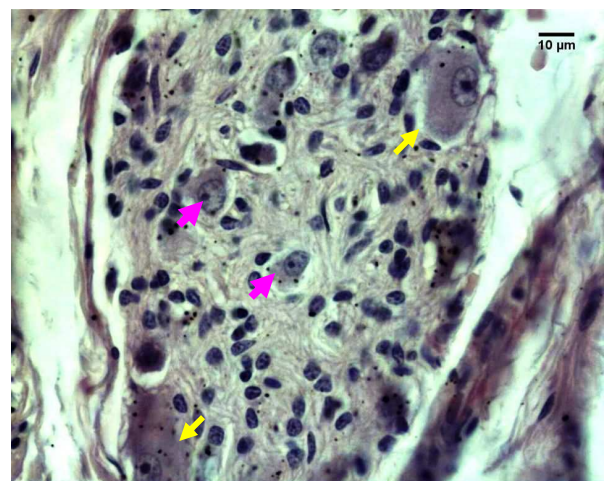


Fig. 49. Cuerpo uterino. Detalle de un ganglio del PFH donde se observan neuronas de cuerpo grande (flechas amarillas) y otras más pequeñas (flechas rosadas). HE. 400x.



CÉRVIX

Aspecto macroscópico

La pared del cérvix delimitaba una cavidad central estrecha correspondiente al canal cervical (*Canalis cervicis uteri*). El canal se comunicaba con el cuerpo uterino a través del orificio interno del útero (*Ostium uteri internum*) y con el fondo de la vagina a través del orificio externo del útero (*Ostium uteri externum*). Externamente presentaba un perfil oval, pared ancha e internamente la porción vaginal del cérvix estaba bordeada por un fórnix vaginal de perfil semicircular y profundo ventralmente, e interrumpido dorsalmente por un pliegue que se continuaba directamente con la pared dorsal de la vagina, dando a la luz un aspecto irregular con varios pliegues (*Plicae longitudinales*) (Fig. 50 a y b).

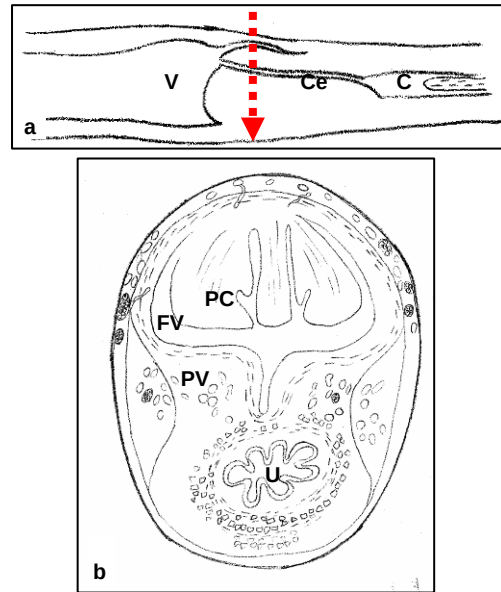


Fig. 50. a. Tracto reproductor, corte lateral que representa cuerpo (C), cérvix (Ce) y vagina proximal (V). Flecha roja marca la porción vaginal del cérvix. b. Esquema del cérvix, porción vaginal. PC: pared del cérvix; FV: fórnix vaginal; PV: pared vaginal; U: útero.

Aspecto microscópico

La **mucosa** era aglandular, formada por epitelio estratificado cilíndrico (2 a 3 capas) no queratinizado, apoyado en corion de TCL irregular (Fig. 51) muy vascularizado (Fig. 52a); se observó PAS positividad en las células superficiales del epitelio cervical. El estroma conjuntivo de las zonas más profundas era más denso y regular, las fibras se encontraban ordenadas paralelas al eje de los pliegues y hacia la periferia seguían la dirección circular de las fibras musculares internas como en otros sectores del tracto reproductor (Fig. 52b). Se observaron cortes de vasos sanguíneos de diferente calibre - provenientes de las capas musculares- siguiendo la dirección de las fibras colágenas del corion (Fig. 52b). En algunos sectores del estroma se destacaba la presencia de numerosos macrófagos entre las fibras.

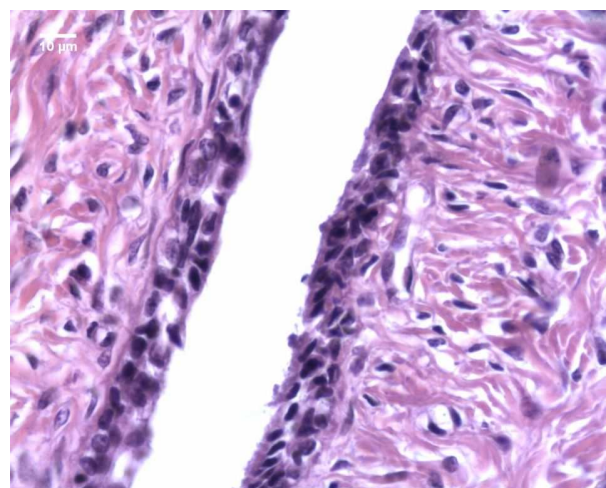


Fig. 51. Cérvix. Mucosa revestida por epitelio estratificado con 2-3 capas celulares. HE. 400x.

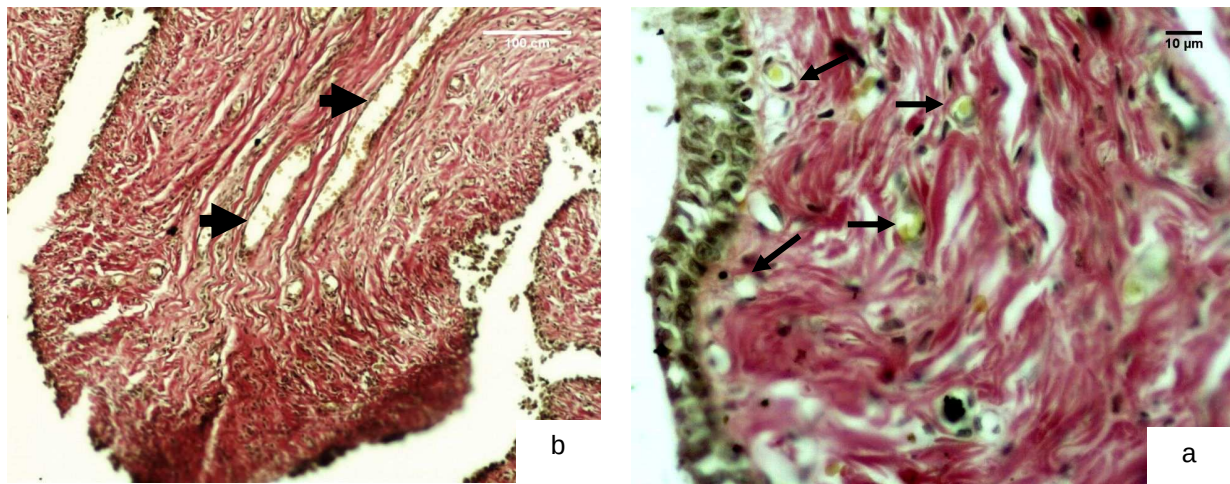


Fig. 52. Cérvix. **a:** Mucosa: epitelio estratificado apoyado en un corion laxo con abundantes fibras colágenas ordenadas paralelas a la superficie; se observan numerosos cortes de capilares (flechas negras). Van Giesson. 400x. **b:** Pliegue de la mucosa del cérvix donde se observa el estroma de TCL con abundancia de fibras colágenas de tonalidad rojiza ordenadas siguiendo la dirección del pliegue. Entre ellas se ubican vasos sanguíneos (flechas negras). Van Giesson. 40x.

La **muscular** era ancha con dos capas de fibras musculares: 1) interna circular que se engrosaba en la zona media y central del canal cervical formando una especie de anillo, 2) externa longitudinal más delgada, la cual se ensanchaba en las caras laterales asociada a la serosa; los haces musculares se encontraban separados por bandas de tejido conjuntivo, formando redes conectadas con el conjuntivo de la serosa y el corion de la mucosa, por donde transcurrían numerosos vasos sanguíneos y nervios (Fig. 55). Las fibras nerviosas provenían de la serosa y llegaban a los sectores más superficiales de la muscular en contacto con el corion de la mucosa. En un ejemplar se observaron ganglios del PFH que se extendían entre las capas musculares en la interfase cérvix-vagina. Comparado con el cuerpo del útero, en proporción la capa muscular se afinaba y aumentaba la densidad del estroma conjuntivo. A través del pliegue dorsal de la región medial ascendían FML desde la capa circular hacia la superficie (Fig. 54).

En los cortes proximales del cérvix, se encontraba la uretra previo a su ingreso a través de la pared ventral del cérvix. Una vez que ingresaba en el sector ventral de la pared muscular del cérvix, la uretra quedaba rodeada por un espesamiento de TC.

La **serosa** era relativamente gruesa en las zonas laterales, donde se destacaban los vasos sanguíneos y en particular numerosos nervios y ganglios del PFH (en algunos casos hasta 7 ganglios en cortes incompletos) con neuronas de soma grande.

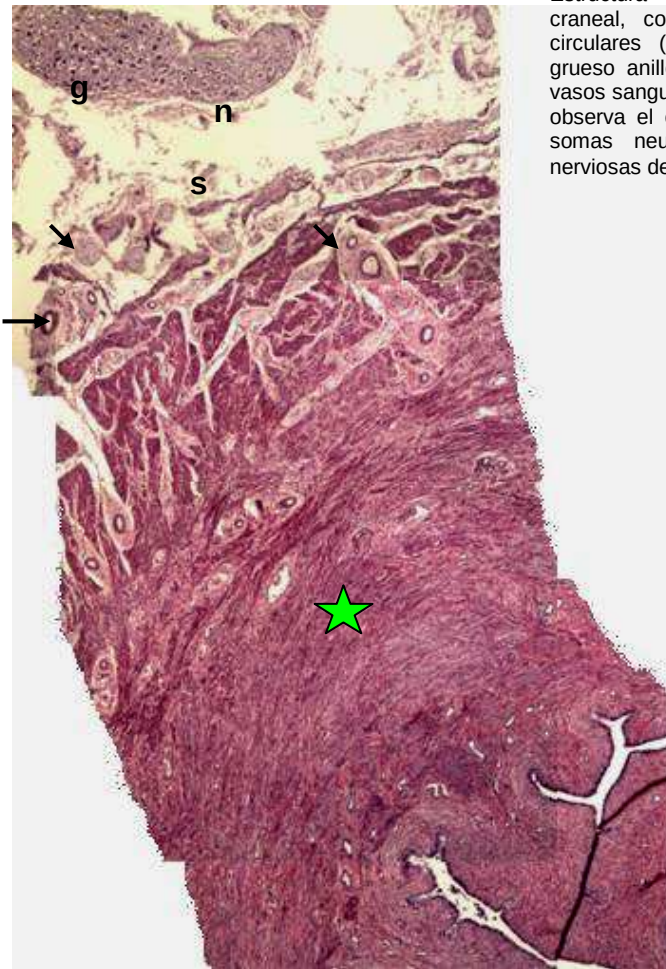
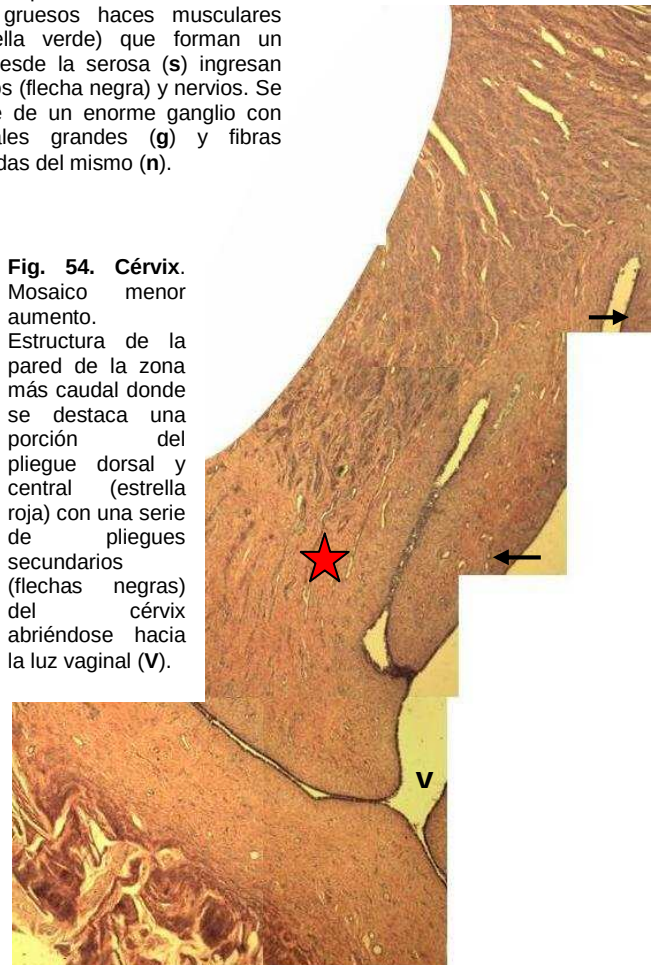


Fig. 53. Cérvix. Mosaico menor aumento. Estructura de la pared de la zona más craneal, con gruesos haces musculares circulares (estrella verde) que forman un grueso anillo. Desde la serosa (s) ingresan vasos sanguíneos (flecha negra) y nervios. Se observa el corte de un enorme ganglio con somas neuronales grandes (g) y fibras nerviosas derivadas del mismo (n).

Fig. 54. Cérvix. Mosaico menor aumento. Estructura de la pared de la zona más caudal donde se destaca una porción del pliegue dorsal y central (estrella roja) con una serie de pliegues secundarios (flechas negras) del cérvix abriéndose hacia la luz vaginal (V).



(Fig. 53, 56 y 57). Los ganglios se ubicaban alrededor de la pared, en particular a nivel dorsolateral y eventualmente en el estroma entre cérvix y la uretra; los ganglios ventrales estaban más cercanos a la pared vesical. El grupo de ganglios del PFH se extendía caudalmente hasta la vagina. La serosa se continuaba con tejido mesentérico asociado a los órganos vecinos, recibiendo de la muscular externa gruesas bandas de FML en la vecindad de los paquetes vásculonerviosos. Desde la serosa partían tabiques de TC que separaban a las FML en gruesas bandas por donde discurrían vasos y nervios (Fig. 53).

La **uretra** se caracterizaba por presentar una luz estrecha ocupada por numerosos pliegues, revestidos por

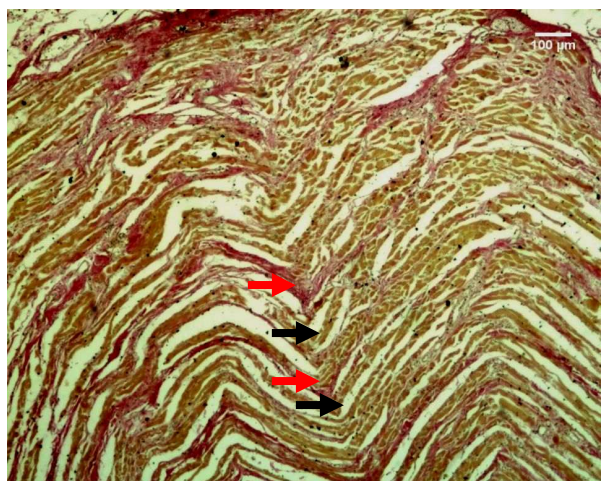


Fig. 55. Cérvix. Capa muscular ancha, las bandas de fibras musculares (flechas negras) se intercalan con bandas conjuntivas (flechas rojas). Van Giesson. 40x.



epitelio de transición (urotelio); en la superficie se observaban células en sombrilla con aspecto de bastones y núcleo alargado. El corion subyacente poseía abundantes fibras colágenas que se intercalaban con FML circulares. En el límite externo se disponía un cinturón de vasos sanguíneos y nervios apoyados en un estroma conjuntivo denso. La muscular del cérvix formaba un cordón periférico que envolvía a la uretra.

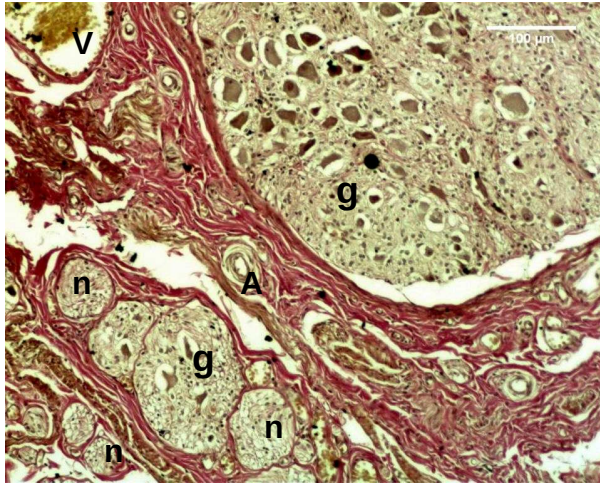


Fig. 56. Cérvix. Serosa conteniendo vasos sanguíneos (A: arteria; V: vena), nervios (n) y ganglios nerviosos (g). Van Giesson. 200x.

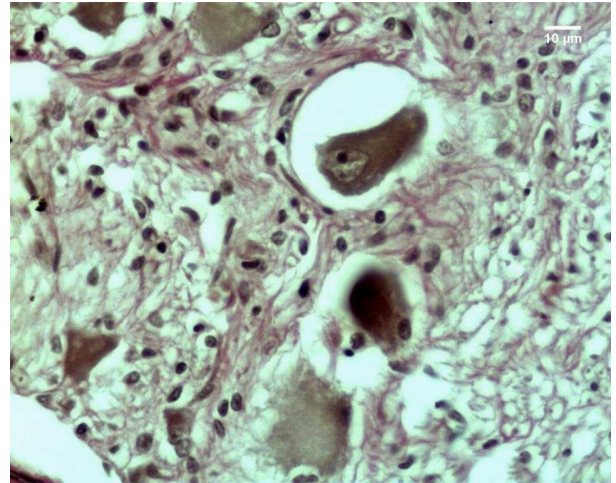
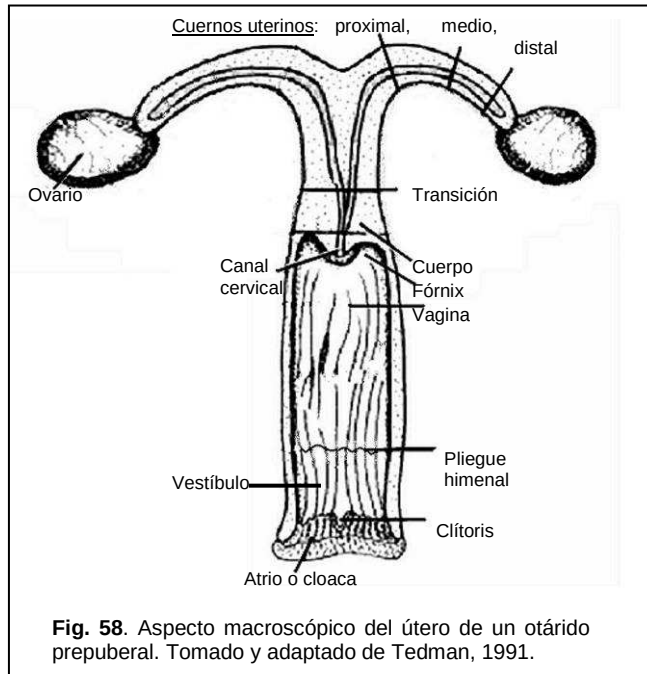


Fig. 57. Cérvix. Detalle de una porción de un ganglio donde se observan grandes cuerpos celulares de las neuronas. Van Giesson. 400x.



DISCUSIÓN

Desde el punto de vista macroscópico, las descripciones del útero de



pinnípedos hasta ahora realizadas lo consideraban como bicorne (Tedman, 1991; Atkinson, 1997; Colegrove, 2009); sin embargo, la denominación correcta de acuerdo a Barone (1990) es bipartito debido a la subdivisión interna del cuerpo uterino por el tabique medial correspondiente al velo del útero (fusión de las paredes mediales de los cuernos uterinos en Carnivora y Artiodactyla, Nomina Histologica Veterinaria) y en concordancia con la descripción realizada por Tedman

(1991) (Fig. 58). Colegrove y col. (2009) en el útero de leona marina de California (*Z. californianus*) describen erróneamente dos orificios cervicales internos así como la extensión de la mucosa cervical interna hasta los cuernos uterinos sin que exista un cuerpo uterino; también describe al velo del útero como “bifurcación cervical interna”. Las observaciones realizadas en cachorras de *A. australis* y algunos tractos de adultas (no incluidas en este estudio) muestran que el orificio interno del cérvix se abre hacia el cuerpo del útero formando a veces un pequeño pliegue, pero el cuerpo del útero, a pesar de ser pequeño, está bien definido en esta especie. Los mismos autores mencionan a su vez la ausencia de pliegues longitudinales a lo largo del cérvix los cuales sí están presentes en los ejemplares de *A. australis* así como en otras especies de pinnípedos (Rand, 1954; Tedman, 1991), especies domésticas y la mujer (Barone, 1990).

Desde el punto de vista histológico, la morfología del útero en cachorras de *A. australis* es similar a la descrita en la leona marina australiano (*N. cinerea*) (Tedman, 1991), loba marina sudafricana (*A. pusillus*) (Rand, 1954) y otras especies de carnívoros domésticos (perra y gata, Barone, 1990). En ejemplares de un año de edad de *A. pusillus*, Rand (1954) describe el epitelio endometrial pero no se discrimina sobre la presencia de células ciliadas y secretoras que probablemente estén ausentes



al igual que en *A. australis*. En las especies mencionadas anteriormente, el epitelio de las glándulas endometriales variaba en su altura desde el nacimiento (cúbico o columnar simple) hasta las etapas juveniles (epitelio bajo y glándulas poco desarrolladas) (Rand, 1954; Tedman, 1991). En *A. australis*, en un ejemplar recién nacido (no incluido en el estudio), se pudo observar una mayor altura del epitelio endometrial y de las glándulas endometriales comparado con el de hembras de 10-12 meses de edad, pero sin edema intersticial como está descrito para hembras recién nacidas de león marino australiano (*N. cinérea*); se presume que las variaciones en altura epitelial se deben a las influencias hormonales que reciben las cachorras a través de la placenta en las últimas etapas de la gestación y el parto tal como ocurre en otras especies.

Una característica particular encontrada en *A. australis* es la ausencia de glándulas en el cuerpo del útero y el cérvix aunque sí se describen con escaso desarrollo en el cuerpo uterino de adultas de *N. cinerea* (Tedman, 1991). Probablemente ocurra una diferenciación y desarrollo glandular en el cuerpo uterino de adultas, aunque la gestación suceda en el cuerno uterino, por lo que la presencia de glándulas a nivel del cuerpo sería de escasa importancia en el desarrollo de la diapausa y posterior implantación del embrión.

Tedman (1991) describe al miometrio de la leona marina australiana (*N. cinérea*, de 3 a 30 semanas de edad) formado por láminas angostas de músculo liso. En *A. pusillus* de un año de edad se describe la muscular externa e interna con un espesor de 130 μm cada una (Rand, 1954). En cachorras de *A. australis*, a pesar que no se realizaron análisis morfométricos de la pared uterina, el espesor de la capa muscular era relativamente grueso en relación al diámetro de los cuernos uterinos (más de 500 μm en conjunto los tres estratos). Por otro lado, en ejemplares adultas ocurren modificaciones miometriales y vasculares importantes en diferentes etapas el ciclo reproductivo que están mediadas por esteroides sexuales (*C. ursinus*, Craig, 1964). El miometrio es mucho más ancho en el lado mesometrial y está entremezclado con el “masivo complejo vascular” (*N. cinerea*, Tedman, 1991); esta característica fue observada en pequeña escala en el útero de las cachorras de *A. australis* donde la pared en el lado mesometrial se destacaba por un aumento en el espesor de las capas musculares asociado a importantes vasos y nervios provenientes del mesometrio.

No se han encontrado referencias que describan en forma precisa la vascularización, tanto de la capa media del miometrio como de los grandes vasos provenientes del mesometrio y perimetrio en ejemplares sexualmente inmaduros o adultas. En *A. australis*, las arterias musculares presentan una capa media muy desarrollada y en la vecindad se encuentran acompañadas de numerosas fibras



nerviosas. La organización vásculonerviosa probablemente le permite al útero adaptarse morfofuncionalmente a las exigencias fisiológicas impuestas por los ciclos sexuales y la gestación bajo condiciones extremas de actividad física durante el buceo (Riet y col, 2010) y los extensos viajes de forrajeo que realizan las hembras de *A. australis* (de Oliveira y col, 2006).

Las características histológicas normales son fundamentales para entender fenómenos patológicos que puedan estar ocurriendo en el sistema reproductor femenino. En focas grises (*H. grypus*) del Mar Báltico, en la década de los ´70 se registró una alta prevalencia de leiomiomas, tumores ováricos y bajas tasas reproductivas asociado a altas concentraciones tisulares de contaminantes ambientales (organoclorados y policlorinados). Los leiomiomas afectaban el cuerpo uterino pero también los cuernos, cérvix y vagina; el 63% de las hembras estudiadas no presentaban signos de actividad ovárica reciente (cuerpos lúteos, cuerpos albicans), probablemente debido a que los contaminantes actúan como disruptores endócrinos con actividad estrogénica o antiestrogénica, alterando los ciclos reproductivos normales. En la mujer y en perras, estos tumores aparentemente son dependientes de hormonas ováricas (Bäcklin y col., 2003). Si bien no hemos encontrado lesiones patológicas en los tractos de cachorras y adultas de *A. australis* (no incluidos en este estudio) analizados, no se puede descartar la ocurrencia de enfermedades reproductivas en pinnípedos sudamericanos, en particular *O. flavescens* cuya población en Uruguay presenta un decrecimiento anual del 1,7-2% anual (Páez, 2006).

La mucosa del cérvix de *A. australis* se caracteriza por tener un epitelio estratificado cilíndrico y la ausencia de glándulas mucosas a diferencia de lo que ocurre en perras (Schmidt, 2006) y otros mamíferos domésticos (pequeños rumiantes, gata, cerda, Barone, 1990; mujer, Bloom-Fawcett, 1993). No se encontraron referencias detalladas o correctas en relación a la histología del cérvix de otras especies de pinnípedos. En este sentido, para el león marino de California (*Z. californianus*, Colegrove y col, 2009) se confunde al cérvix proximal (canal endocervical) que corresponde en realidad al cuerpo del órgano, mientras que la porción distal del cérvix presenta características similares a las descritas en *A. australis*.

En focas grises (*H. grypus*) durante la gestación se observó la presencia de un tapón mucoso en la base del cérvix y se sugiere que es secretado por las células cilíndricas superficiales de la vagina (Ouellette y Ronald, 1985). En el caso de cachorras de *A. australis*, la mucosa cervical sería responsables de la síntesis y secreción de moco. Quizás después de la madurez sexual ocurra una mayor actividad



del epitelio de revestimiento del cérvix y vagina responsable de las secreciones vaginales observadas en el tracto femenino durante la estación reproductiva (obs. pers., no incluida en este estudio).

Con respecto al estroma conjuntivo del cérvix, en perras adultas la densidad de venas aumenta con el incremento en la concentración de progesterona y estrógenos (fase luteal temprana o metaestro). Se especula que estos vasos actúan como un plexo venoso, donde el aumento de la circulación sanguínea y volumen tisular funcionan como un sistema de cierre cervical (Schmidt, 2006). Es probable que en *A. australis* sexualmente maduras puedan ocurrir cambios histomorfológicos similares de acuerdo a la gran vascularización encontrada en el estroma conjuntivo a lo largo del cérvix.

Por otro lado, no contamos con referencias respecto a la innervación del tracto reproductor en pinnípedos. En *A. australis* se encontraron importantes fibras y ganglios nerviosos en la capa muscular y serosa en toda la extensión del tracto reproductor, indicando una importante influencia del sistema nervioso autónomo hasta ahora no estudiada. En la perra, la innervación autónoma se realiza mediante fibras simpáticas (forman los plexos ovárico, pelviano y nervio hipogástrico) y parasimpáticas (terminan en ganglios cercanos al cérvix, parte superior de la vagina y tubas uterinas). La mayoría de los nervios forman parte del plexo uterino satélite de los vasos del mismo nombre. Las fibras se distribuyen principalmente por el miometrio y las que van al endometrio se arborizan a nivel de las glándulas (Barone, 1990). El plexo de *De Lee Frankenhauser* (o de Frankenhauser o paracervical) (PFH) reúne fibras simpáticas y parasimpáticas que inervan el útero, tercio superior de la vagina y la tuba uterina (cerda, Lakomy y Szatkowska, 1992; Sowicz y col., 1998). Está formado por un grupo extenso y bilateral de neuronas (adrenérgicas, colinérgicas, peptidérgicas) e interneuronas, localizadas en el tejido conjuntivo paracervical y paravaginal (Van Orden y col., 1983; Mitchell y col., 1996). En el útero de rata, la innervación simpática es la predominante y se encuentra asociada a las células del miometrio y la pared de los vasos sanguíneos (Alm y col, 1988; Brauer, 2008). Los nervios parasimpáticos sólo fueron descritos alrededor de la arteria uterina en chinchillas (Alm y col, 1988). A pesar que no se realizaron análisis específicos en la determinación del tipo de fibras y neuronas del sistema nervioso autónomo en el tracto reproductor de *A. australis*, los ganglios observados en la pared cérvico-vaginal corresponden a los del PFH hasta ahora no descrito en pinnípedos.

En cobayos y otras especies, el PFH constituye el principal ganglio autónomo del tracto genital femenino. Ejercen influencias moduladoras en los ciclos de cronificación vaginal, y se ha sugerido que participan en la regulación del flujo



sanguíneo uterino ya que inervan los vasos sanguíneos y contienen neurotransmisores con función vasodilatadora (cobayos) (Van Orden y col., 1983). Sin embargo, los trabajos experimentales demostraron que los efectos parasimpáticos observados sobre los vasos sanguíneos probablemente sean efectuados por fibras preganglionares de otro origen. Otra posible función sugerida para el PFH es su influencia sobre la contractilidad miometrial de origen humoral que ocurre durante el parto a través de monoaminas biogénicas, dado que las células cromafines y otras células del PFH contienen catecolaminas que pueden ser liberadas a los vasos que se dirigen al útero (Kanerva y Teravainen, 1972). Las neuronas **aferentes** primarias periféricas que inervan el cérvix son puntos intermedios (relay) de la información sensorial mecánica y química inducida por estímulos locales cervicales y por el pasaje del feto que se dirigen hacia la médula espinal y centros supraespinales. Además de su función sensitiva, las neuronas probablemente ejercen acciones locales **eferentes** en la relajación del cérvix próximo al momento del parto donde los estrógenos participan en la producción de neuropéptidos en los ganglios (en referencia al lumbosacro). Quizás el PFH en *A. australis* participe en mecanismos de regulación funcional útero-vaginal en la circulación sanguínea y contractilidad miometrial durante el parto en conjunto con los otros componentes autonómicos del tracto reproductor como lo descrito para otras especies (coneja, Schofield, 1952).

Por otro lado, el control vasomotor sería en extremo importante en hembras gestantes de *A. australis* u otros mamíferos marinos durante el buceo. Los animales que realizan buceo exhiben una **respuesta fisiológica** caracterizada por apnea, bradicardia y vasoconstricción periférica, donde sólo disponen del oxígeno almacenado en la sangre, los músculos y pulmones para sostener un metabolismo aeróbico o alternar a vías metabólicas anaeróbicas. El flujo sanguíneo al resto de los órganos decrece proporcionalmente al ritmo cardíaco (Kooyman y col., 1980). En el sistema nervioso de focas existen proteínas respiratorias (neuroglobinas y citoglobinas) que mantienen la homeostasis del oxígeno neuronal y brindan protección frente a la hipoxia (Hanklein y col, 2005). Sin embargo no se han descrito los mecanismos que permiten una irrigación continua y homogénea del útero y la placenta durante los procesos de inmersión a grandes profundidades y por tiempo prolongado, que eviten la hipoperfusión del útero en gestación. En los síndromes de preeclampsia en la mujer ocurre una reducción en la perfusión útero-placentaria llevando a hipoxia e isquemia de la placenta; secundariamente ocurre vasoconstricción y aumento de la presión sanguínea que pueden llevar a la muerte materno-fetal (Stennett y Khalil, 2006). Es probable que los mecanismos neurovasculares del útero y la placenta en desarrollo de los mamíferos buceadores determinen un control muy preciso del flujo



sanguíneo y oxigenación de la unidad útero-placentaria que eviten el desarrollo de este tipo de síndrome en las hembras gestantes, teniendo en cuenta que durante el buceo ocurre una reducción importante del flujo sanguíneo a diferentes órganos viscerales.

De los trabajos histofisiológicos realizados en focas y a partir de los hallazgos obtenidos en *A. australis* podemos hipotetizar que el importante desarrollo de la vascularización e inervación uterina podría ser una adaptación funcional para aportar un flujo sanguíneo apropiado a las necesidades del útero (durante la gestación) en especies con actividad física bajo condiciones de hipoxia y/o importantes cambios del flujo sanguíneo durante el buceo.

En suma, las características generales del útero son similares a otros pinnípedos estudiados, con ausencia de glándulas endometriales en el cuerpo y cérvix. Se destaca la presencia de una importante irrigación de la pared muscular de los cuernos uterinos y del estroma endometrial a nivel del cérvix, así como la presencia de importantes nervios y ganglios que constituyen el plexo de Frankenhauser hasta ahora no descrito en mamíferos marinos.



LA VAGINA, EL VESTÍBULO Y EL ATRIO

Aspecto macroscópico

La vagina se extendió desde la desembocadura del cérvix hasta el límite con el vestíbulo a nivel del pliegue himenal; el pliegue himenal se observó como un delgado plegamiento transversal de la mucosa. Macroscópicamente presentó una luz amplia y plegada, recorrida en toda su extensión por pliegues longitudinales que le daban un aspecto irregular.

Hacia la zona distal del pliegue himenal, se destacaba sobre la pared ventral, la papila o tubérculo uretral (*Tuberculum urethrale*) como una pequeña protrusión redondeada sobre uno de los pliegues longitudinales, donde desemboca el orificio uretral externo, aunque no era muy evidente en todos los ejemplares. En algunos casos, la mucosa de dicha papila era pigmentada. La superficie vestibular era lisa y la pared presentaba pliegues longitudinales al igual que el resto del tracto (Fig. 59a).

En el límite externo entre el vestíbulo y la cloaca/atRIO se ubicó el clítoris, como una pequeña protrusión redondeada de la pared cubierta por un delicado pliegue de la mucosa ubicado hacia ventral y caudal de la papila uretral; en esta región la mucosa generalmente presentaba cierto grado de pigmentación (Fig. 59a) y en la zona orientada hacia el atrio se observaron pequeñas fibras pilosas que se continuaban externamente hasta la piel ventral del atrio.

La cloaca o atrio correspondió a una concavidad donde desembocan el ano (dorsal) y el vestíbulo (ventral). Macroscópicamente se lo observó formado por una pared lisa y pigmentada donde se alojaban fibras pilosas finas y cortas. Los bordes

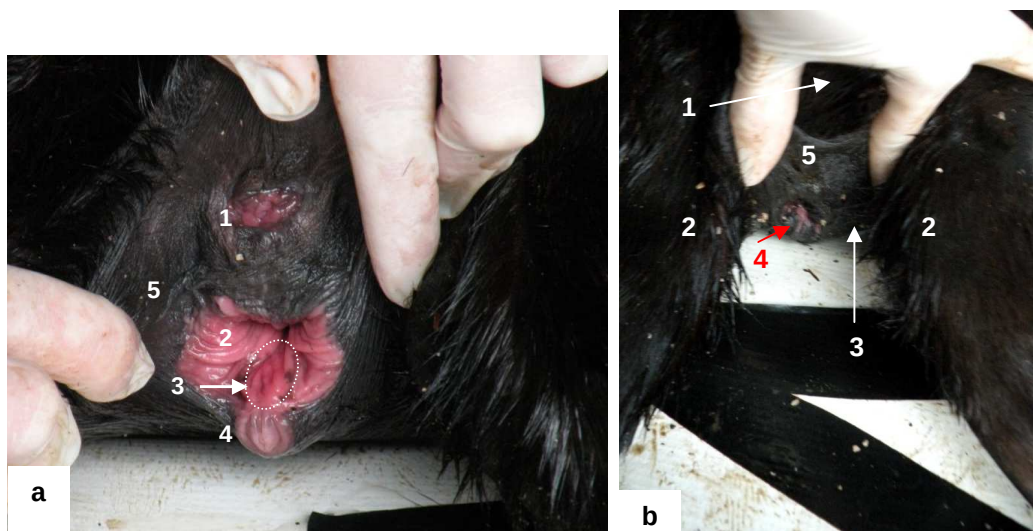


Fig. 59. **a:** Vista macroscópica de tracto reproductor inferior de *A. australis* adulta. 1) ano; 2) vestíbulo; 3) papila uretral; 4) clítoris; 5) mucosa atrial. **b:** Vista macroscópica del atrio y sus límites anatómicos (adulta). 1) rabo; 2) aletas caudales; 3) piel ventral de la pelvis; 4) vestíbulo; 5) ano.



externos estaban limitados por piel de la pared ventral de la pelvis, de las porciones mediales de las aletas caudales y la porción ventral de la base del rabo (Fig. 59b).

VAGINA

Aspecto microscópico

La **mucosa** se observó revestida por epitelio estratificado (2-3 capas) apoyado en una lámina de TCL y hacia la profundidad con TCD; en el espesor del corion se disponían abundantes vasos y nervios entrecruzados con haces de músculo liso en diferentes sentidos. La **muscular** se observó formada por fibras lisas y estriadas que corrían en sentido interno circular y externo longitudinales, constituyendo una gruesa capa; en algunos sectores los haces estaban subdivididos por redes de TCD que acompañaban a grandes vasos provenientes o que se dirigían hacia la serosa o la adventicia.

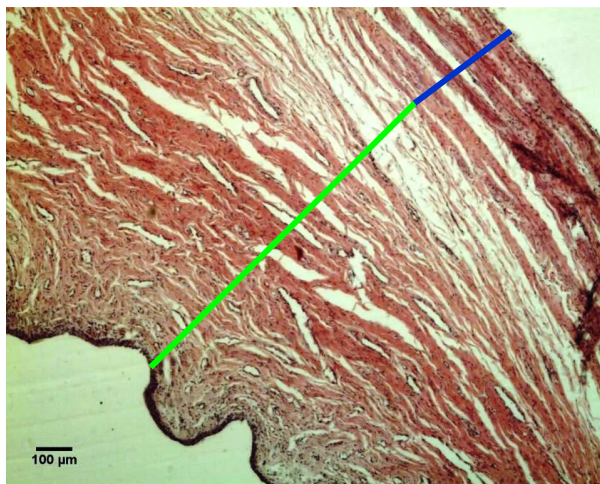


Fig. 60. Vagina. Sector craneal y ventral. Línea verde: mucosa; línea azul: muscular. HE. 40x.

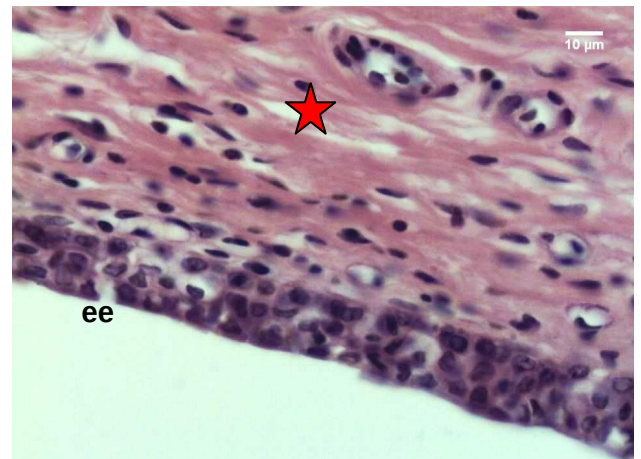


Fig. 61. Vagina. Detalle de la mucosa superficial del sector craneal. ee: epitelio estratificado no queratinizado; estrella roja: corion. HE. 400x.

La mucosa vaginal en el sector craneal presentó una estructura similar al cérvix, con una luz amplia y plegada (Fig. 60), revestida por epitelio estratificado cilíndrico o cúbico (de 2 a 3 capas) (Fig. 61), que en algunas zonas formaba pequeñas papilas y se apoyaba en un corion laxo más ancho que en el cérvix. Como en otros sectores del tracto, debajo del epitelio las fibras colágenas se orientaban irregularmente, luego tomaban un sentido paralelo a los pliegues de la mucosa y profundamente seguían el sentido circular de las fibras musculares internas (Fig. 60). El sector más profundo del estroma se caracterizó por poseer abundantes fibras colágenas que gradualmente se entremezclaban con haces conjuntivos



interfasciculares entre las fibras de la muscular interna. En la pared ventral de la vagina se ubicó la uretra y más periféricamente varias fibras nerviosas. La mucosa del fórnix (*Fórnix vaginae*) se observó revestida por epitelio estratificado cilíndrico,

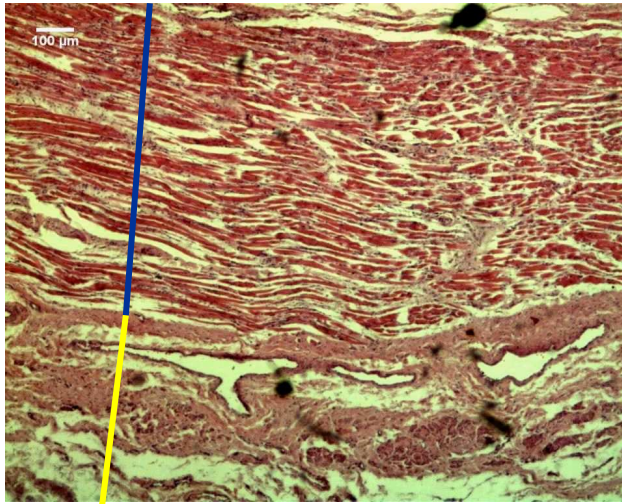


Fig. 62. Vagina. Sector craneal y dorsal. Pared muscular externa (línea azul) ancha junto a serosa (línea amarilla) con grandes vasos y nervios. HE. 40x.

apoyado en un corion laxo irregular continuándose externamente con el estroma denso regular. El estroma presentó una importante vascularización, en particular venas, similar a un tejido eréctil. A su vez estaba rodeado por una capa muscular circular delgada, entremezclada con fibras colágenas y más externamente una muscular longitudinal más gruesa (Fig. 62) donde se destacaban cortes de fibras nerviosas.

En los sectores caudales de la vagina, el epitelio era estratificado (3 a 5 capas) de cilíndrico bajo a plano, con papilas en la región basal que daban aspecto ondulado (Fig. 63a, b y c). Se observaron linfocitos atravesando el epitelio o ubicados en la luz vaginal. En el corion subepitelial se disponían abundantes células linfoides (macrófagos, linfocitos, polimorfonucleares y plasmocitos) (Fig. 63b y c) y en algunos ejemplares se destacaban sectores bien definidos de acúmulos de tejido linfoideo asociado a mucosas (Fig. 63a y 63c).

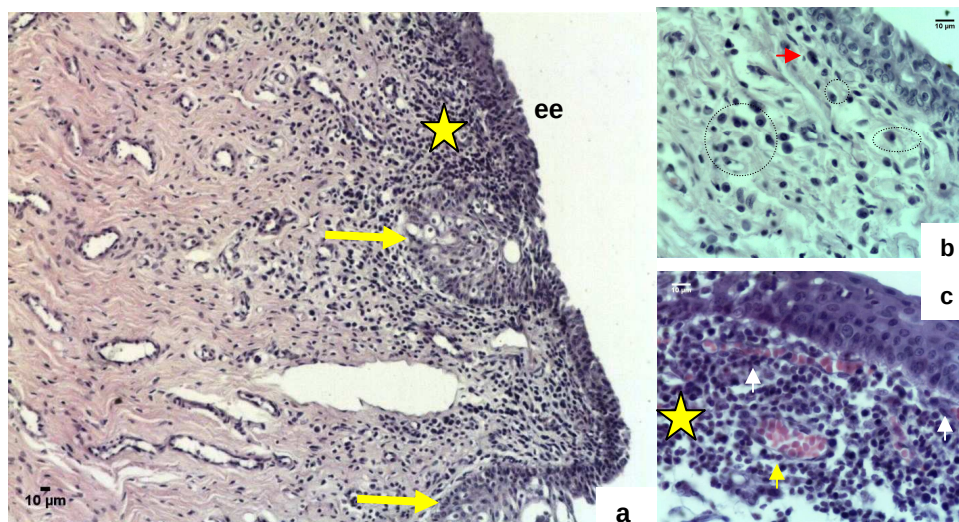


Fig. 63. Vagina. Sector caudal. **a:** mucosa con epitelio estratificado (ee), papilas (flechas amarillas) e infiltrado linfoideo (estrella amarilla). HE. 40x. **b:** epitelio estratificado y corion con abundantes plasmocitos (círculos punteados) y macrófago (flecha roja); **c:** acúmulo linfoideo en corion subepitelial (estrella amarilla), capilares con eritrocitos (flechas blancas) y vena (flecha amarilla). HE. 400x.



Periféricamente la pared se continuaba con una gruesa capa de TCD regular (Fig. 64) entre las que se observaron pequeños nidos de adipocitos, vasos linfáticos, nervios, haces aislados de FML circulares y numerosos vasos sanguíneos. El contenido de fibras colágenas aumentaba cada vez más hacia la periferia de la pared. Los cortes realizados no incluyeron al pliegue himenal.

La capa **muscular** también presentó variaciones entre los sectores craneales y caudales. En las *zonas craneales* formaban una gruesa capa, más delgada en la cara ventral que hacia la cara dorsal (Fig. 60 y 62); la capa interna era circular, formada por haces muy delgados de FML interpuestas entre bandas conjuntivas del estroma, y estaba más desarrollada hacia los sectores dorsales; la capa externa se observó constituida por fibras musculares estriadas (FME) longitudinales y oblicuas

entremezcladas, más desarrolladas en las caras ventrolaterales. En los tabiques conjuntivos que separaban los haces de músculo liso y estriado, se observaron numerosos haces nerviosos que formaban una especie de anillo alrededor de la pared vaginal y en algunos casos la presencia de ganglios nerviosos ubicados en las capas musculares periféricas de la pared vaginal.

En las *zonas caudales* la capa muscular era más delgada que en la porción craneal, predominando el estroma conjuntivo de la mucosa; la muscular interna presentaba delgadas bandas de FML circulares organizadas en pequeños haces aislados; periféricamente se continuaba con una gruesa capa de FME con la misma disposición que en los sectores craneales. A través de los tabiques conjuntivos ascendían vasos sanguíneos y nervios hasta la profundidad del

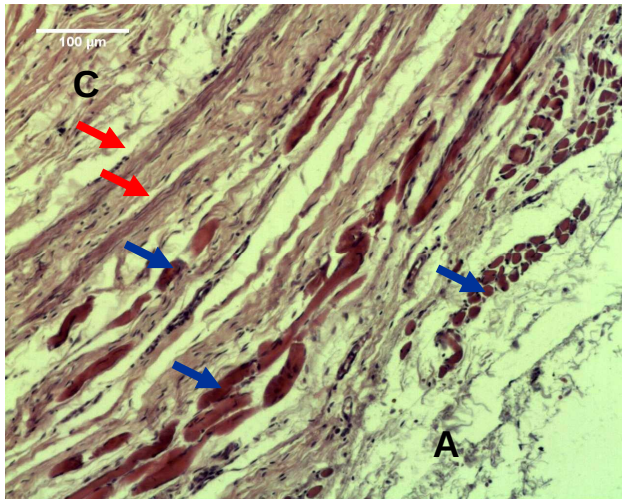


Fig. 64. Vagina. Sector caudal. Se observa el corion profundo de la mucosa (C), bandas de FML circulares (flechas rojas) y FME en sentido circular y longitudinal (flechas azules). Externamente la adventicia (A). HE. 200x.

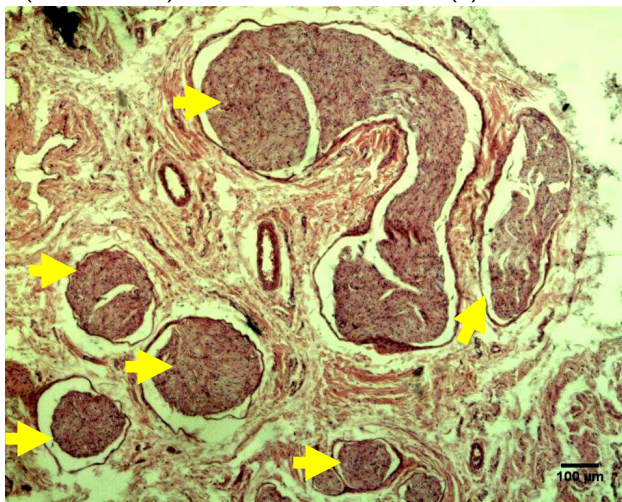


Fig. 65. Vagina, sector craneal. Corte de numerosos nervios (flechas amarillas) del PFH ubicados en el la serosa. HE. 200x.

corion de la mucosa (Fig. 64).



Los sectores *craneales* se observaron envueltos por una serosa ancha, con numerosos vasos sanguíneos, adipocitos, nervios de gran calibre y ganglios nerviosos (Fig. 65). En algunos sectores dorsales, el estroma estaba enriquecido por haces de FML probablemente en su unión con el mesenterio que se continuaba con el intestino grueso. Una gruesa adventicia rodeaba los sectores medio y caudal de la vagina (Fig. 64), acompañada por los mismos componentes celulares y vásculonerviosos que la serosa (adipocitos, numerosos vasos sanguíneos y ganglios nerviosos). Los ganglios y nervios localizados a lo largo de la pared vaginal pertenecían al PFH.

ESTRUCTURAS ANEXAS EN LA PARED VAGINAL

En la pared vaginal se observaron cortes de diferentes estructuras anexas:

1) las glándulas túbulo alveolares, observadas en un ejemplar, ubicadas en la región dorsal de la pared de la zona proximal de la vagina; si bien el nombre las ubica en el vestíbulo, en este caso estaban en la vagina o cercanas a la zona vestibular. Estaban constituidas por grupos de 6-15 alvéolos. Su conducto excretor, formado por epitelio estratificado cúbico, se orientaba hacia la luz vaginal. Su aspecto era similar a las glándulas vestibulares mayores o de Bartholin pero en menor número y tamaño (Fig. 66).

2) la uretra, se observó incorporada a la pared vaginal de los sectores medio y distal como una estructura canalicular, de perfil irregular, ubicada en la pared ventral, del lado opuesto a las glándulas vestibulares. Estaba revestida por epitelio de

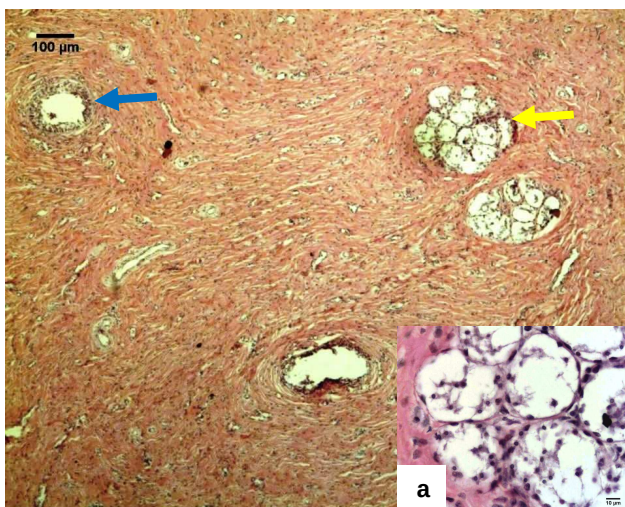


Fig. 66. Vagina. Sector de la mucosa craneal y dorsal con dos grupos de adenómeros (flecha amarilla) y conducto excretor (flecha azul) en el estroma conjuntivo. HE. 200x. **a:** detalle de las glándulas. HE. 400x.



Fig. 67. Uretra. Mucosa revestida por epitelio de transición (et). HE. 400x.



transición y se modificaba a estratificado cilíndrico (4 a 5 capas) (Fig. 67) en la cercanía de su desembocadura en el meato urinario. El epitelio se apoyaba en un corion laxo con abundantes vasos y nervios, principalmente venas, que le daban un aspecto similar a tejido eréctil; externamente se continuaba con TCD regular.

Entre la uretra y la luz de la vagina se ubicaban bandas delgadas de FML inmersas en el estroma conjuntivo.

VESTÍBULO

El vestíbulo se caracterizó por presentar una luz amplia muy irregular, con la pared muscular más ancha que la vagina.

La **mucosa** se observó revestida por epitelio estratificado plano, pigmentado en algunas regiones, con pequeñas papilas en la zona basal; el epitelio se iba engrosando y queratinizando en forma gradual desde las zonas proximales hacia las distales (Fig. 68 y 69).

En el estrato basal y espinoso se localizaron melanocitos y en forma dispersa células de citoplasma claro que podrían corresponder a células de Langerhans. El epitelio se encontraba apoyado sobre un corion laxo más celular que en otros sectores del tracto, con infiltraciones linfocitarias en acúmulos que incluyeron plasmocitos, linfocitos y macrófagos (Fig. 70 y 71).

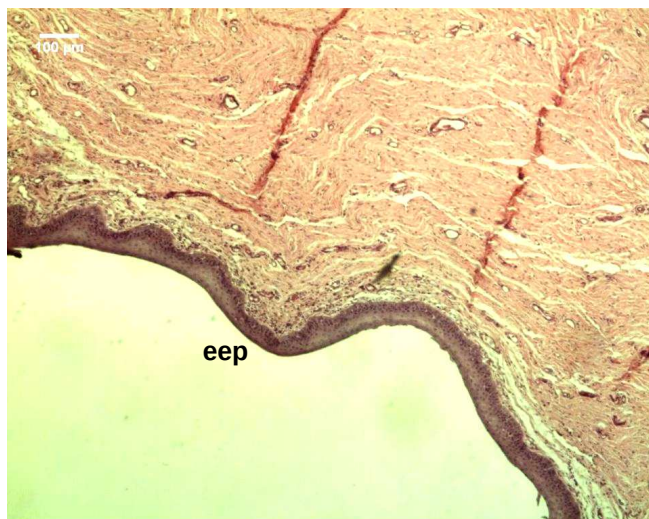


Fig. 68. Vestíbulo. Sector craneal. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano (eep) apoyado en un corion laxo y periféricamente más denso con abundantes vasos sanguíneos. HE. 40x



Fig. 69. Vestíbulo. Sector caudal. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano (eep) más alto que en el sector craneal, apoyado en un corion laxo y periféricamente más denso con abundantes vasos sanguíneos. HE. 200x.

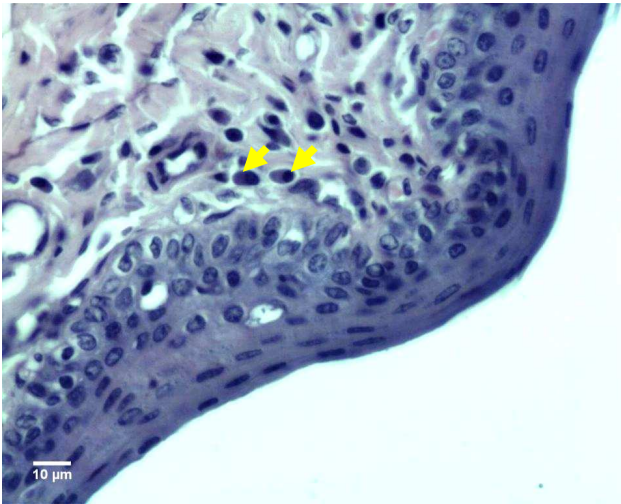


Fig. 70. Vestíbulo. Sector craneal. Mucosa del sector craneal. Epitelio estratificado plano, 6-7 capas. Por debajo corion con plasmocitos (flechas amarillas). HE. 400x.

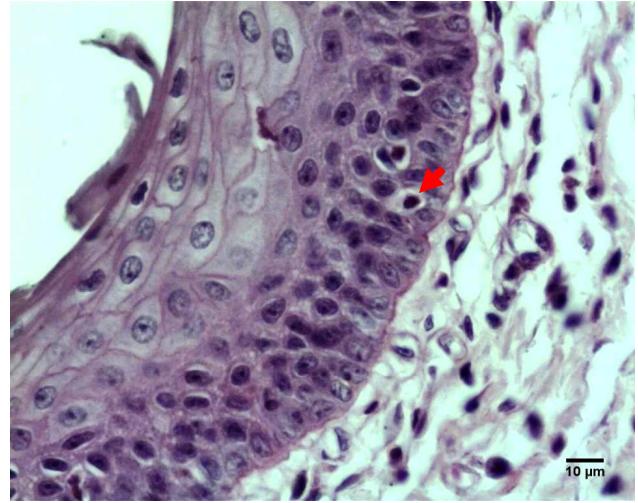


Fig. 71. Vestíbulo. Mucosa del sector caudal. Epitelio estratificado plano, 11-12 capas. Célula de citoplasma pálido que podría corresponder a una célula de Langerhans (flecha roja). HE. 400x.

Profundamente se continuaba con un TCD regular donde los vasos se distribuían muy ordenadamente entre las fibras colágenas (Fig. 72 y 73); ambas capas conjuntivas eran más delgadas que en la vagina. En zonas más distales y en la profundidad de la mucosa se localizaban paquetes vasculonerviosos.

La **muscular**, en su capa más interna contenía delgadas bandas de FML circulares organizadas en pequeños haces aislados y en menor cantidad que en el vestíbulo; hacia la periferia se disponían haces de FME en bandas internas longitudinales y externas circulares y oblicuas, separados por tabiques de TC que limitaban hacia la periferia una delgada capa de FML periféricas (Fig. 74 a 77).

La **adventicia** se observó formada por bandas de TCL que contenía grandes vasos y nervios, tejido adiposo y en algunos ejemplares estudiados infiltrado linfocitario que se extendía hacia el tejido conjuntivo mesentérico asociado a los órganos vecinos (Fig. 74).

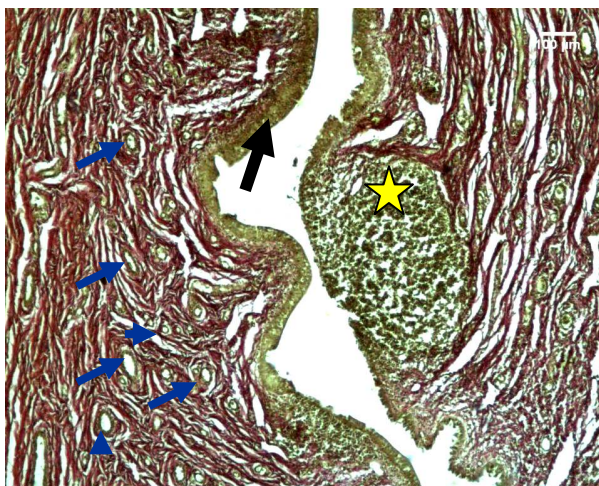


Fig. 72. Vestíbulo. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano (flecha negra) y acumulo linfocitario en corion subepitelial (estrella amarilla). Corion con abundantes fibras colágenas (aspecto rojizo) muy ordenadas y entre ellas numerosos vasos sanguíneos (flechas azules). Van Giesson. 40x.

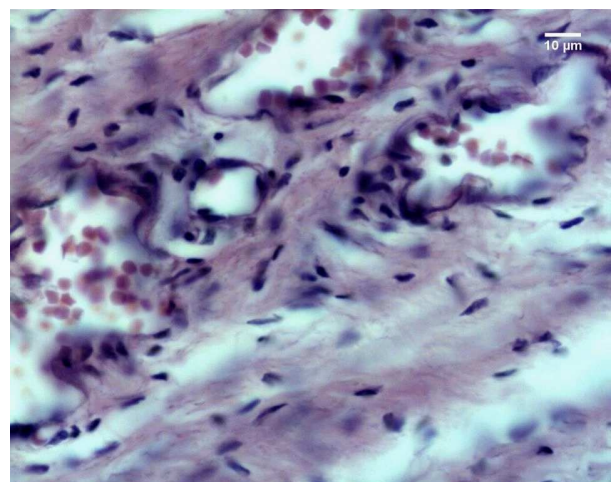


Fig. 73. Vestíbulo. Detalle del corion con venas dispuestas ordenadamente entre las fibras colágenas. HE. 400x.

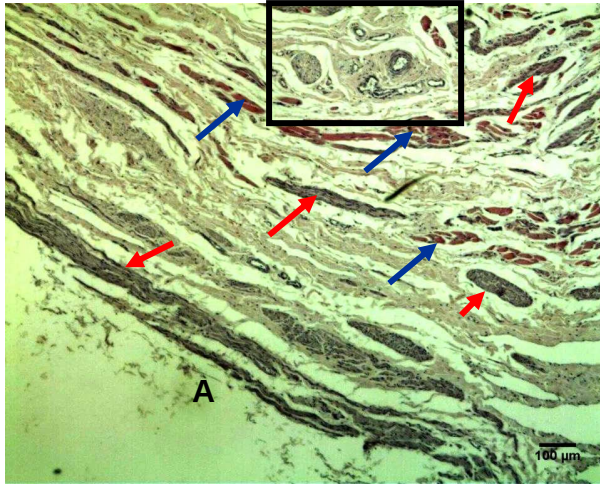


Fig. 74. Vestíbulo. Muscular. Capa interna y externa con FML y una intermedia de FME separadas por gruesos tabiques de TC con vasos y nervios en su espesor. En la periferia la adventicia (A) HE. 40x.

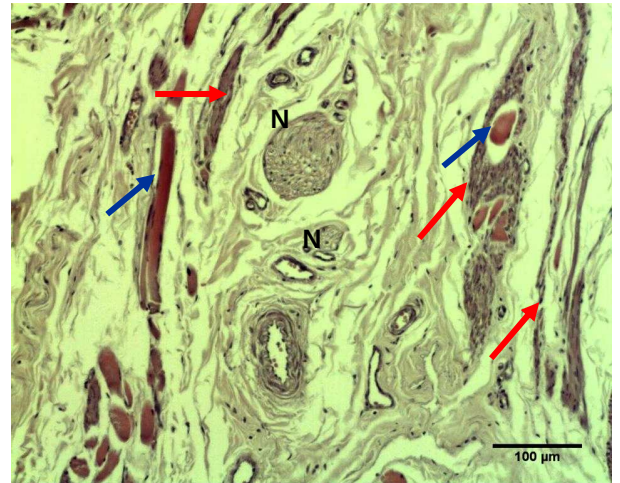


Fig. 75. Vestíbulo. Detalle del cuadro de la capa muscular donde se observan FML (flechas rojas) y FME separadas por tabiques conjuntivos y entre ellos vasos sanguíneos y nervios (N). HE. 200x.

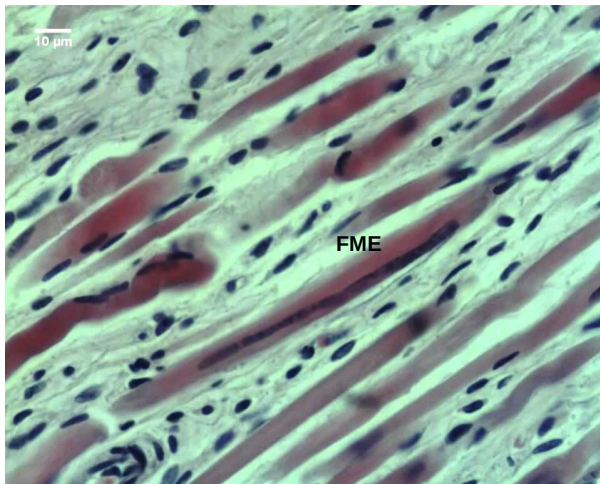


Fig. 76. Vestíbulo. Haces de FME separadas por tabiques conjuntivos y entre ellos vasos sanguíneos. HE. 400x.

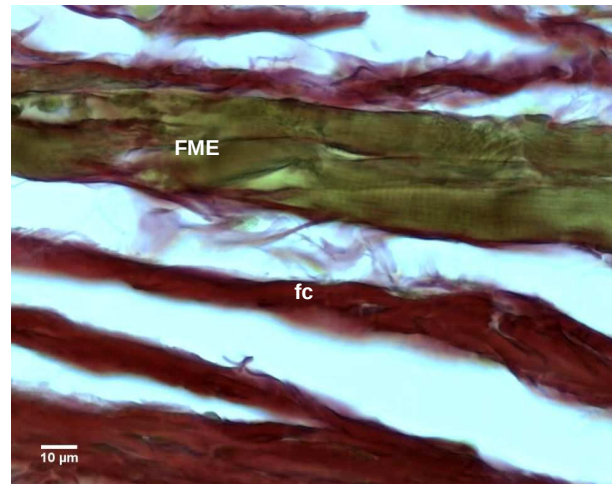


Fig. 77. Vestíbulo. Haces de FME con su estriación transversal y en la periferia fibras colágenas (fc) del estroma. HE. 400x.



ESTRUCTURAS ANEXAS EN LA PARED VESTIBULAR

En la Fig. 78 se representa esquemáticamente el corte transversal del vestíbulo y los anexos que se disponen en el espesor de la pared del órgano.

1) glándulas de Bartholin o vestibulares mayores (*Glandula vestibularis major*). Estaban ubicadas en la pared dorsal del vestíbulo cerca del clítoris. Eran de tipo túbulo-alveolar, formadas por epitelio simple organizados en lobulillos de más de 15 adenómeros, separados por haces de fibras colágenas. Se observaron una serie de conductos excretores de diferente calibre formados por epitelio estratificado cilíndrico (Fig. 79, 80 y 81). Periféricamente limitaban con la muscular interna de la pared vestibular.

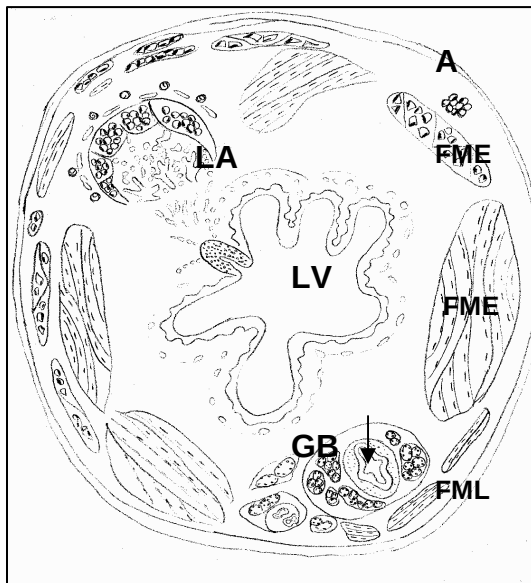


Fig. 78. Esquema simplificado del corte de la pared vestibular. Se detallan las siguientes estructuras: luz vestibular (LV); lóbulo adiposo (LA); glándulas de Bartholin (GB) y conducto excretor (flecha); haces de FML; haces de FME; adventicia (A). No dibujado a escala.

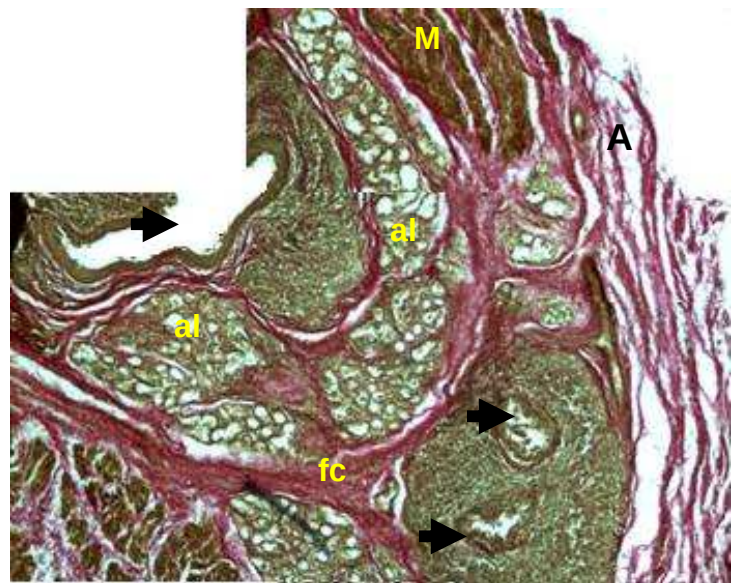


Fig. 79. Mosaico de las Glándulas de Bartholin. Grupos de alvéolos (al) limitados por bandas de fibras colágenas (fc), varios conductos excretores (flechas negras). Hacia la periferia haces de fibras musculares (M) y externamente la adventicia (A). Van Giesson. 200x.



Fig. 80. Pared vestibular y Glándulas de Bartholin. Grupos de alvéolos (al) en la profundidad de la mucosa. Periféricamente la capa muscular (M) y externamente la adventicia (A). HE. 40x.

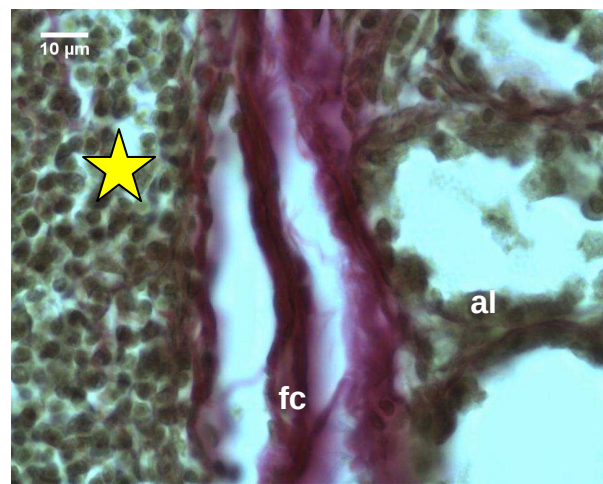


Fig. 81. Glándulas de Bartholin. detalle de la pared alveolar (al) junto a conducto excretor (estrella amarilla) separados por haces de fibras colágenas (fc). Van Giesson. 400x.



2) el **lóbulo adiposo**; fue observado en dos ejemplares, en el espesor del corion como una estructura redondeada de aspecto esponjoso. Presentaba perfil circular, limitado externamente por una cápsula de TCD, con abundantes fibras colágenas que extendía tabiques de diferente grosor hacia el interior (Fig. 82 y 78).

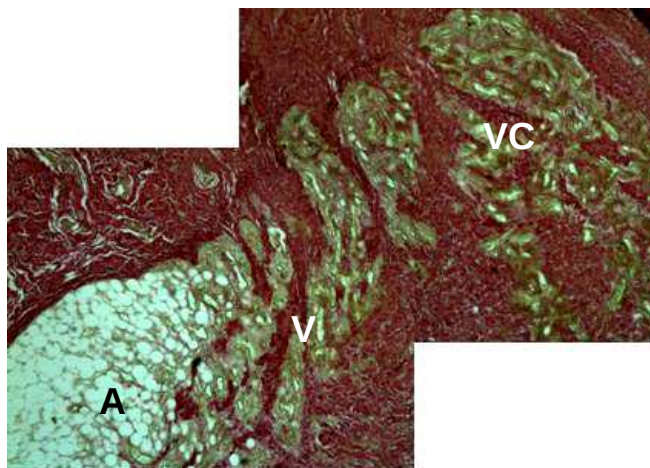


Fig. 82. Mosaico donde se observa la estructura general del lóbulo adiposo: porción periférica con el "colchón" de adipocitos (A) y la central con un plexo vascular (V) en continuación con vasos del corion (VC) de la mucosa que están ubicados hacia la luz del vestíbulo. Van Giesson. 40x.

La región más periférica estaba formada por grupos compactos de adipocitos que formaban un casquete exterior y se organizaban en grandes lóbulos; a través de los tabiques conjuntivos se disponían vasos sanguíneos y escasos nervios (Fig. 82 y 83). La región central, orientada hacia la luz vaginal, contenía un enorme plexo venoso, donde los vasos se organizaban en paquetes separados por gruesos tabiques conjuntivos y adipocitos (Fig. 83 y 84).

A su vez, el corion de la región asociado a dicha estructura vascular contenía abundantes venas y vasos linfáticos, característico de tejido eréctil.

Por fuera de la envoltura conjuntiva, en el estroma periférico del lóbulo, se observó un cordón perimetral de nervios y microganglios (Fig. 85 y 86) que emitían ramas hacia el interior a través de los tabiques conjuntivos (Fig. 87).

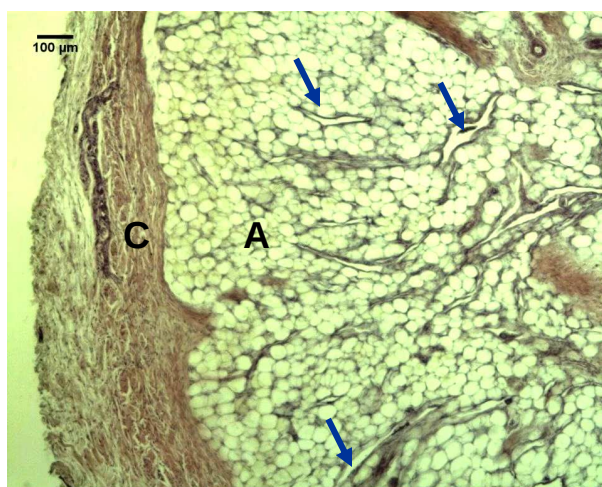


Fig. 83. Lóbulo adiposo. Cápsula (C) y sector periférico con adipocitos (A) entre los que transcurren vasos sanguíneos (flechas azules). HE. 40x.

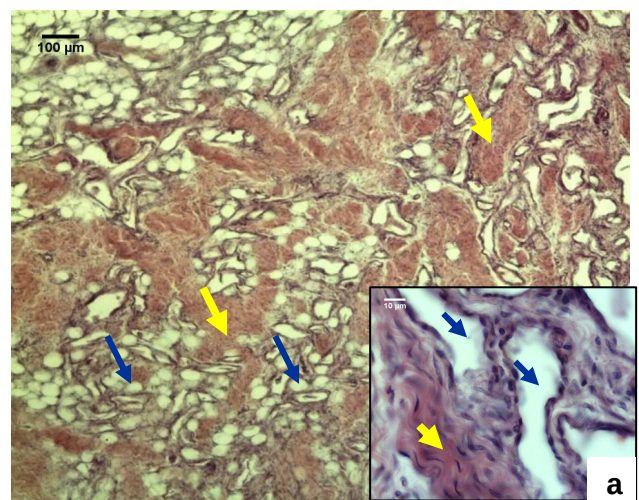


Fig. 84. Lóbulo adiposo. Sector central con numerosas venas (flechas azules) separadas por tabiques de tejido conjuntivo (flechas amarillas). HE. 40x. a: detalle a mayor aumento de venas limitadas por parte de un tabique conjuntivo. HE. 400x.

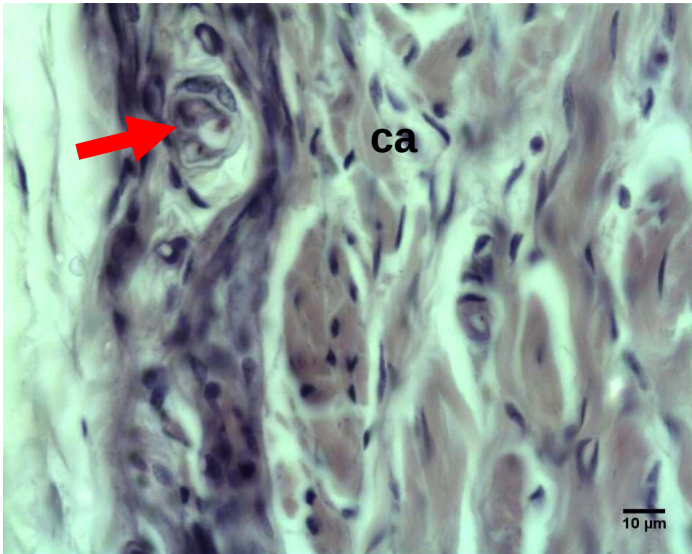


Fig. 85. Detalle correspondiente al estroma periférico del lóbulo adiposo con el corte de una delgada fibra nerviosa (flecha roja); ca: cápsula del lóbulo. HE. 400x.

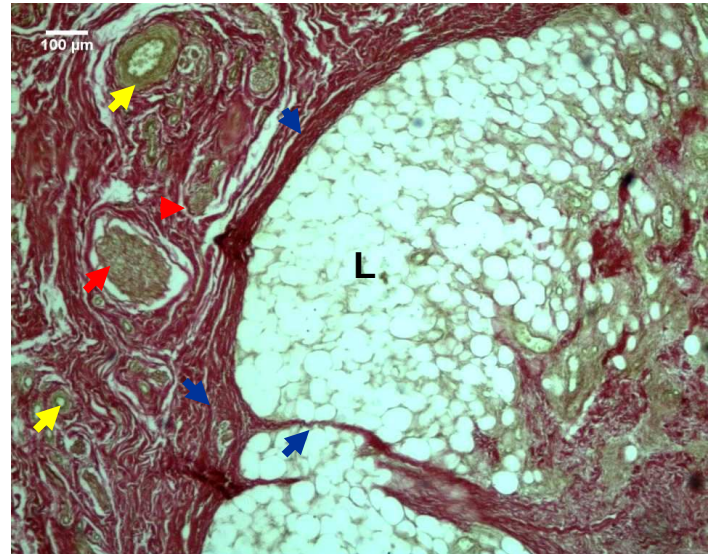


Fig. 86. Sector periférico del lóbulo adiposo (L), se destaca el estroma con fibras colágenas que forman la cápsula y envía tabique al interior (flechas azules); en la periferia se observan vasos sanguíneos (flechas amarillas) y nervios (flechas rojas) de gran calibre. Van Giesson. 40x.

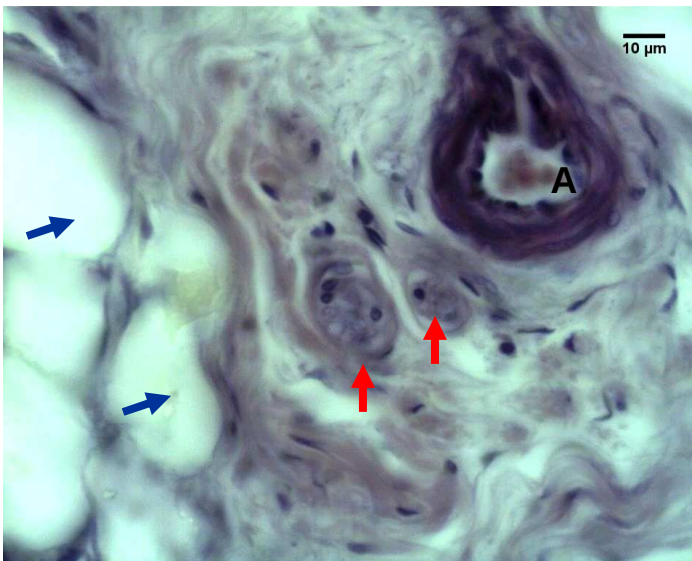


Fig. 87. Detalle de un tabique conjuntivo que contiene dos fibras nerviosas (flechas rojas) en la vecindad de una arteriola (A) junto a los adipocitos (flechas azules). HE. 400x.



3) el **clítoris**: macroscópicamente se observó como una pequeña prominencia redondeada, cubierta por un pliegue de la mucosa (Fig. 59). En la Fig. 88 se representa esquemáticamente el corte medial longitudinal del clítoris.

La mucosa del clítoris estaba revestida por epitelio estratificado plano que se queratinizaba hacia la periferia, y melanocitos entre las células epiteliales basales. El corion se observó muy vascularizado con numerosas venas similar a un tejido eréctil (cuerpos cavernosos del clítoris) (Fig. 89 y 90); la porción central se encontraba ocupada por tejido mesenquimático. Por debajo y rodeando a este tejido se disponía TCL con numerosos nervios (Fig. 91) y haces aislados de FML.

Profundamente y hacia la zona ventral el corion presentó adenómeros pertenecientes a las glándulas vestibulares menores (*Gll. vestibulares minores*) (Fig. 92). Gradualmente hacia la periferia, el estroma se tornó cada vez más denso, con grupos pequeños de adipocitos, numerosas fibras nerviosas, glándulas, así como bandas longitudinales dispersas de FML. Externamente se disponía una adventicia (Fig. 88).

La porción del pliegue que se extendía por la cara anterior del clítoris estaba revestida por epitelio estratificado plano queratinizado

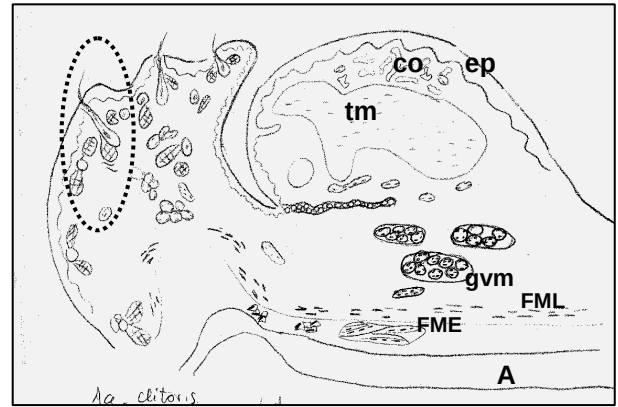


Fig. 88. Clítoris. Esquema del corte medial. Epitelio superficial (ep); corion muy vascularizado (co); tejido mesenquimático (tm); glándulas vestibulares menores (gvm); FML; FME; adventicia (A). En el repliegue de la izquierda se representan unidades apilosebáceas (círculo punteado). No a escala.

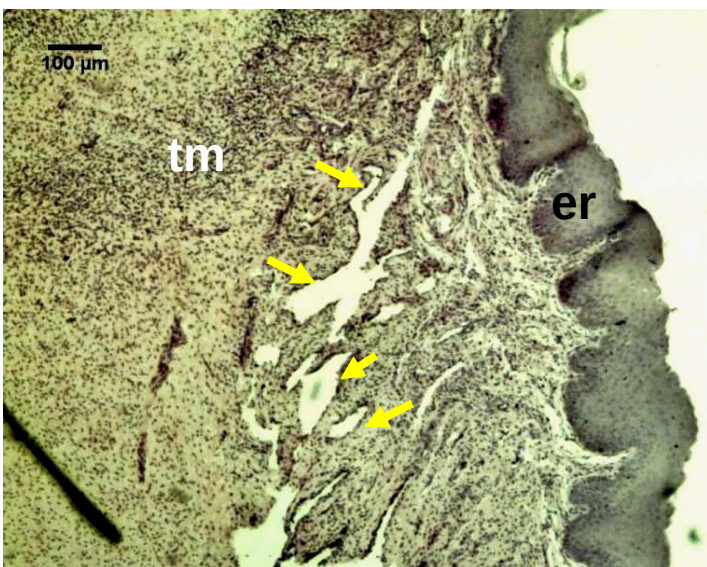


Fig. 89. Clítoris. Sector superficial. Epitelio de revestimiento (er), con melanocitos en el estrato basal; corion con numerosos vasos sanguíneos (flechas amarillas); porción central con tejido mesenquimático (tm). HE. 40x.



Fig. 90. Clítoris. Sector profundo. Corion con numerosos vasos sanguíneos (flechas amarillas) y terminaciones sensitivas (flechas azules). HE. 200x.



con melanocitos y por debajo un corion con unidades apopilosebáceas similares a las de la piel (Fig. 93); los folículos pilosos eran de tipo compuesto, asociados a glándulas sebáceas lobuladas (2 o más lobulaciones) (Fig. 94); las glándulas sudoríparas apócrinas se ubicaban profundamente y estaban organizadas en grupos de numerosos alvéolos. Hacia la periferia en el estroma conjuntivo, se observaron haces transversales de FME y algunos haces delgados de FML (Fig. 88).

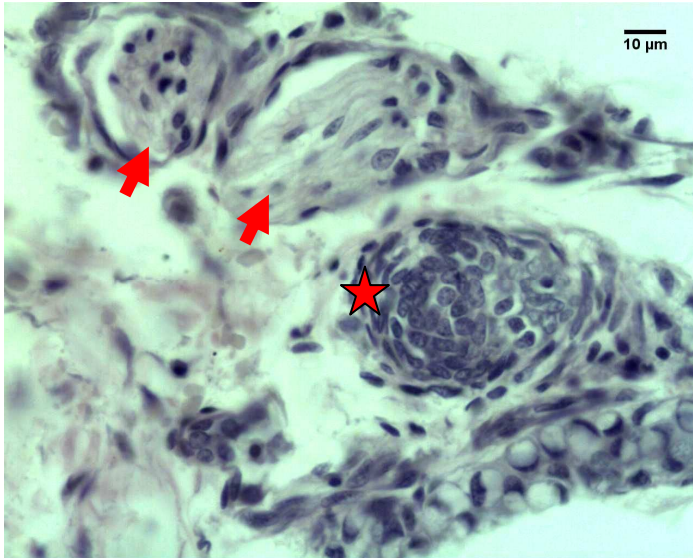


Fig. 91. Clítoris. Porción profundo del estroma. Detalle de dos fibras nerviosas (flechas rojas) y terminación sensitiva (estrella roja). HE. 400x.

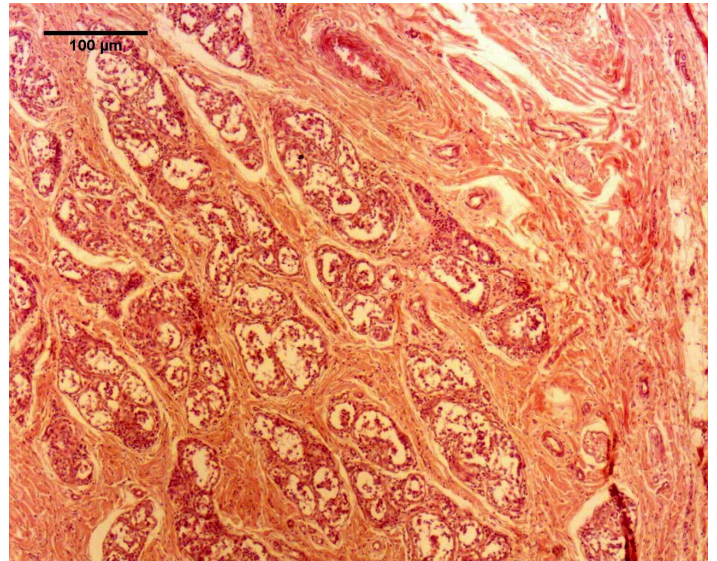


Fig. 92. Clítoris. Adenómeros de las glándulas vestibulares menores en la profundidad del corion. HE. 200x.

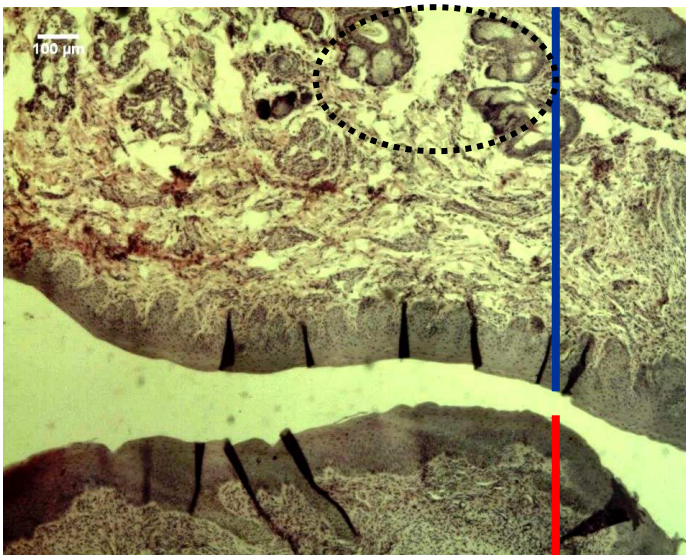


Fig. 93. Clítoris. Sector anterior, mucosa (barra roja) revestida por epitelio estratificado plano, pigmentado; el pliegue anterior que lo acompaña (barra azul) contiene anexos cutáneos (círculo punteado). HE. 40x.

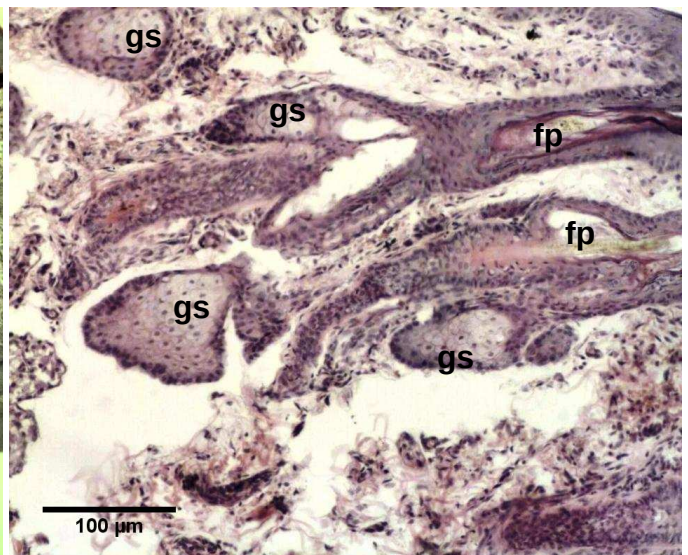


Fig. 94. Clítoris. Unidades apopilosebáceas. Folículos pilosos (fp); glándulas sebáceas (gs). HE. 200x.



ATRIO O CLOACA

La **mucosa** atrial estaba revestida por un epitelio estratificado plano queratinizado con estrato córneo bien definido; su región basal presentaba papilas similares a la piel gruesa y las células epiteliales basales estaban pigmentadas en la vecindad de los melanocitos (Fig. 95 y 96).

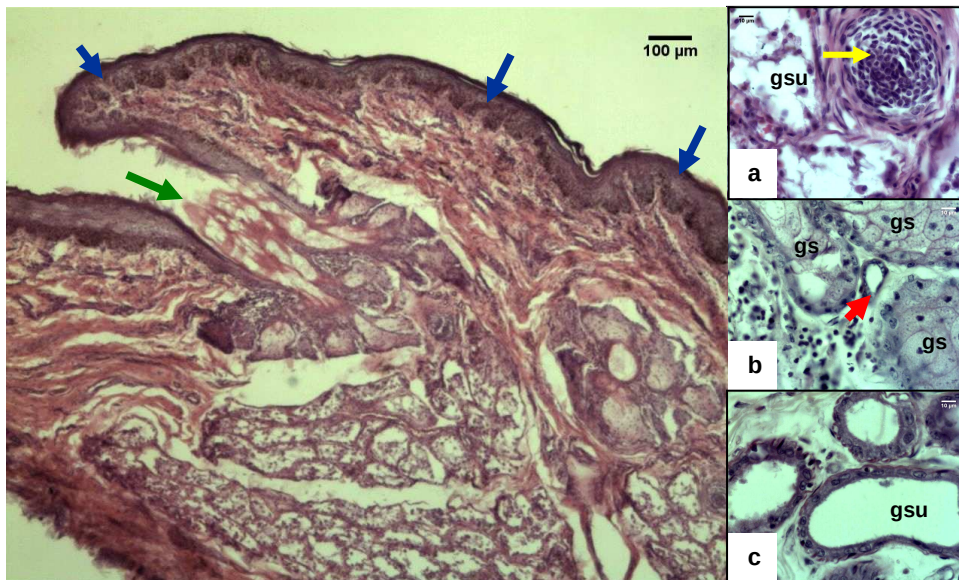


Fig. 95. Atrio. Vista panorámica. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano queratinizado (flecha azul); corion con unidades apopilosebáceas y fibras pilosas desembocando en la superficie (flecha verde); glándulas sebáceas (**gs**) asociadas a los folículos pilosos; grupos de glándulas sudoríparas (estrella roja). HE. 40x. **a:** detalle de terminación sensitiva (flecha amarilla) junto a glándulas sudoríparas (**gsu**). **b:** glándulas sebáceas (**gs**) y conducto excretor de glándula sudorípara (flecha roja). **c:** detalle de glándulas sudoríparas (**gsu**) en la profundidad del corion. **a, b y c.** HE. 400x.

Al igual que en otros sectores, el corion laxo superficial presentaba acúmulos linfoides asociado a mucosas; los melanocitos se disponían en el corion subepitelial. Profundamente se continuaba con una ancha franja de TCD, con fibras colágenas muy ordenadas y menor vascularización que en el vestíbulo donde se localizaban unidades apopilosebáceas similares a las descritas en el clítoris. Las glándulas sebáceas eran polilobuladas (hasta 8 lóbulos) (Fig. 95 y 96); entre ellas se localizaban bandas de FML y los conductos excretores de las glándulas sudoríparas (Fig. 95b). En todos los casos, las células de las glándulas sebáceas eran típicas, de gran tamaño, núcleo redondeado y citoplasma espumoso debido al contenido de gotitas lipídicas. Las glándulas sudoríparas eran de tipo apócrino (luz amplia y redondeada, epitelio cúbico simple y células mioepiteliales), organizadas en grupos cercanos a la base de los folículos y rodeadas por tabiques de TC (Fig. 95c y 96). Los folículos pilosos eran compuestos existiendo aproximadamente 10 a 20 fibras pilosas por grupo de folículo.



La **muscular** presentaba una capa interna con haces de FML en sentido longitudinal y oblicuo entremezcladas con las fibras colágenas del corion profundo, y alternaban con haces delgados de FME; periféricamente se continuaba con una gruesa capa de FME dispuestas en diferentes sentidos separadas por bandas anchas de TC conteniendo vasos de gran calibre, grupos de adipocitos y nervios (Fig. 96).

La **adventicia** era similar a las descripciones anteriores, conteniendo grandes vasos y nervios.

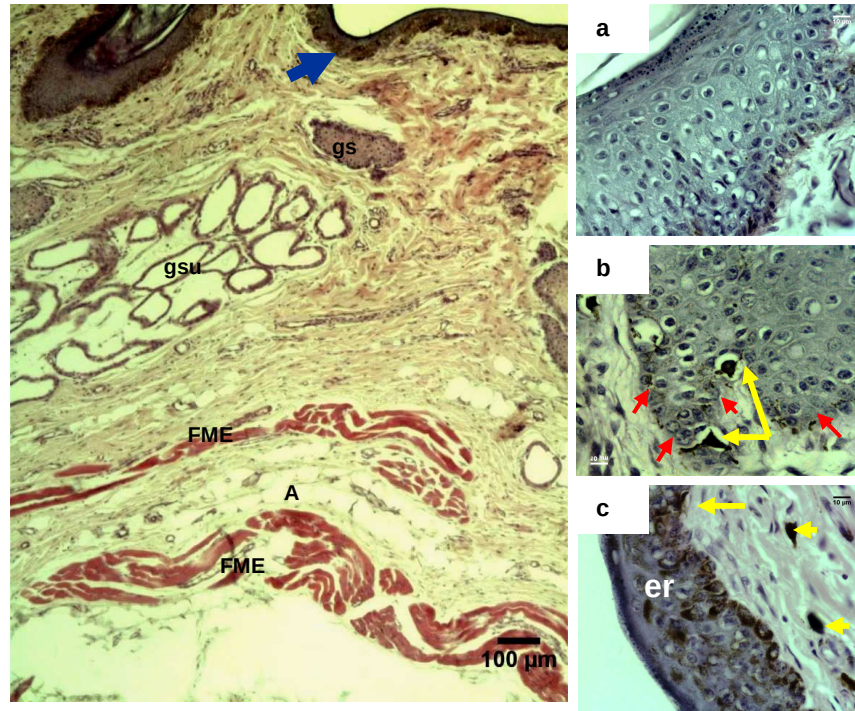


Fig. 96. Atrio. Vista panorámica. Epitelio de revestimiento fuertemente pigmentado (flecha azul); corion con glándulas sudoríparas (gsu) y sebáceas (gs). En la profundidad, delgados haces de FME de la capa muscular separadas por bandas de conjuntivo y adipocitos (A). HE. 40x. **a:** detalle del epitelio estratificado con capa superficial cornificada. **b:** melanocitos (flechas amarillas) entre los queratinocitos (flechas rojas) del estrato basal. **c:** epitelio de revestimiento pigmentado (er), melanocitos en el estrato basal y en el tejido conjuntivo subepitelial (flechas amarillas). a, b y c, HE, 400x.



DISCUSIÓN

Macroscópicamente, la mucosa vaginal de *A. australis* es a grandes rasgos similar a la descrita para leona marina australiana (*N. cinérea*). En ejemplares adultas de *A. australis* examinadas en la estación reproductiva (no incluidos en este estudio) dichos pliegues eran muy notorios a la entrada de la vagina. En mamíferas terrestres, el himen está formado por una mucosa similar a la del vestíbulo. Su función no está bien establecida; algunos autores lo consideran como un remanente del desarrollo embrionario mientras que otros le adjudican una función protectora. En pinnípedos se ha sugerido que evita la entrada de agua durante el buceo (Atkinson, 1997); si bien no está muy diferenciado en cachorras de *A. australis*, probablemente ocurra un desarrollo con el crecimiento del animal hasta la pubertad. En adultas quizás actúe a modo de “burlete”, complementando de esta manera el cierre del tracto reproductor inferior por contracción muscular de la pared durante el buceo. Por otra parte, se descarta la función de bloqueo genital descrita por Atkinson (1997) ya que *A. australis* no manifiesta bloqueo genital durante la cópula (obs. pers).

Histológicamente, la estructura vaginal hallada en *A. australis* es similar a la de otros pinnípedos estudiados (*A. pusillus*, Rand, 1954; *M. leonina*, Laws, 1956; *H. grypus*, Ouelette, 1983; *N. cinerea*, Tedman, 1991; *Z. californianus*, Colgrove y col., 2009). En fócidos y otáridos, el cérvix y la vagina se describen como revestidos por un epitelio biestratificado con células secretoras de moco, que gradualmente era invadido por leucocitos (*A. pusillus*, Rand, 1954; *P. groenlandicus*; *H. gryphus*, Ouelette y Ronald, 1985). En ejemplares sexualmente maduros se han registrado cambios en la altura del epitelio y profundidad de las papilas según la etapa del ciclo reproductivo similar a lo que ocurre en otras especies de mamíferos terrestres (Bloom-Fawcett, 1993).

En relación a los anexos glandulares, *A. pusillus* es la única especie en que se mencionan glándulas mucosas en la región de la vagina; dichas glándulas aumentan en cantidad luego de la implantación acompañadas por abundante presencia de moco en el fondo vaginal en hembras con implantación embrionaria reciente (Rand, 1954). En los ejemplares de *A. australis* estudiados, sólo en un caso se observaron adenómeros glandulares bien organizados en la vagina de acuerdo a sus características histológicas. Más allá de estas descripciones, es probable que el epitelio vaginal sea el responsable de la secreción de moco y formación del tapón cervical durante la gestación dada la ausencia de adenómeros glandulares en la mayor parte de los ejemplares estudiados y los registros realizados en otras especies.



Llama la atención que en ninguna especie de pinnípedos se mencionen características en la inervación y la distribución y tipo de fibras musculares de la vagina y vestíbulo cuya organización pueda funcionar a modo de esfínter, como ocurre en la mujer (Bloom-Fawcett, 1993). En mujeres, la inervación presenta una distribución variable en las diferentes regiones vaginales lo que ha sugerido su asociación a diferentes funciones reproductivas, en particular durante el parto (Hilliges y col, 1995).

Las características del vestíbulo vaginal halladas en *A. australis* prepuberales son similares a *N. cinerea*, describiendo en esta última especie cambios en la altura epitelial de acuerdo a la edad y etapa del ciclo reproductivo, así como una invasión linfocitaria en el estroma subepitelial en hembras preñadas (Tedman, 1991). La desembocadura de la uretra en una papila o tubérculo uretral ha sido descrita en diferentes especies de mamíferos marinos (*O. flavescens*) Buño, 1950; *L. carcinophagus*, *L. weddellii*, *Mirounga leonina*) y está ausente en la leona marina australiana (*N. cinerea*) (Harrison y col., 1952; Laws, 1956). En cachorras de *A. australis* la papila no era muy evidente pero en adultas se ha observado un mayor desarrollo (obs.pers, datos no incluidos en este estudio).

De los anexos asociados a la pared del vestíbulo sólo se ha descrito el clítoris en diferentes especies de fócidos y otáridos (Tedman, 1991). Las muestras obtenidas de adultas de *N. cinerea* reportan la presencia de un *os clitoridis* de hasta 21,4 cm. de largo. En cachorras sólo se ha encontrado tejido mesenquimático en la porción central del clítoris; por otra parte, en las observaciones realizadas en tractos de ejemplares juveniles o adultas (datos no incluidos en este estudio) no se ha encontrado *os clitoridis* evidente o con dimensiones de esa magnitud, pero quizás sea una característica de especie.

De los restantes anexos de la pared vestibular no se cuentan con registros en ningún pinnípedo estudiado; en la perra, cerda y vaca (Barone, 1990) y mujer (Bloom-Fawcett, 1993) hacia los lados de la papila uretral y sobre el clítoris desembocan las glándulas vestibulares menores. En *A. australis*, se observaron los adenómeros glandulares asociados al clítoris; los otros anexos encontrados corresponden a las glándulas vestibulares mayores (o de Bartholin) y al lóbulo adiposo, ninguno de ellos descritos en pinnípedos. En la mujer, las glándulas de Bartholin contienen células neuroendócrinas y axones intraepiteliales (Warner y col, 1996); su actividad está influenciada por estímulos estrogénicos y participan en la secreción de moco y electrolitos por estímulo autócrino o por presión en la pared vaginal (Russo y Vittoria, 2006). Por otro lado, estas glándulas probablemente secreten feromonas como señales atractivas para los machos que le permiten detectar hembras en estro. Durante la estación reproductiva en *A. pusillus* (Rand, 1954) y *A. australis* (obs. pers),



en general los machos realizan un cortejo muy simple y breve, donde parte de la conducta adoptada es inicialmente el olfateo del cuerpo de la hembra y posteriormente la “confirmación” del estro o receptividad sexual mediante la exploración genital intensa antes de la cópula. Es importante tener en cuenta que desde el punto de vista comportamental, *A. australis* posee un sistema de apareamiento tipo “lek” (Franco, 2005) donde son las hembras en estro las que se acercan a los machos para copular y es entonces cuando éstos realizan los despliegues de olfateo y exploración sobre la hembra receptiva.

Con respecto al lóbulo adiposo, no se encontraron referencias sobre la descripción de esta estructura ni sus funciones, sino una representación esquemática en una figura de la pared vaginal de la mujer como “lobulillos adiposos” (Bloom-Fawcett, 1966 y 1993). La innervación periférica y la abundancia de venas de este órgano podrían actuar como un órgano sensitivo; en humanos el estímulo de los genitales externos promueve una respuesta parasimpática que lleva a una dilatación arterial y constricción venosa de los tejidos; esta respuesta vascular determina un rápido ingreso de sangre y aumento subsiguiente del volumen tisular (símil tejido eréctil) acompañado de un estrechamiento de la luz del vestíbulo y vagina. Los estímulos parasimpáticos también llegan a las glándulas de Bartholin, estimulando su secreción, la del epitelio vaginal y de las glándulas vestibulares menores (Guyton, 1992). Quizás en *A. australis* la estimulación parasimpática local cumpla funciones similares a las descritas en humanos dada la importante vascularización observada en la pared de la vagina y vestíbulo. En relación a la posible función del lóbulo adiposo, quizás la presión recibida desde la luz vaginal sería transmitida hacia el “colchón” de adipocitos y desde allí dirigirse hacia aferencias medulares o locales relacionadas con los órganos genitales. Durante la estación reproductiva se ha observado congestión y edema en el vestíbulo y vagina de hembras adultas de *A. australis* (obs. pers.); quizás este incremento en la irrigación podría estimular el funcionamiento del lóbulo que sería plenamente activado durante la cópula. También se podría especular que actuara como sensor de temperatura ambiental para la apertura-cierre del tracto genital y el pliegue himenal durante el buceo. En ambos casos, la presión o la temperatura sanguínea serían “medidos” por este lóbulo y desde allí se enviarían señales hacia el resto del tracto genital o centros medulares para controlar estados de relajación-contracción.

La porción final del tracto correspondiente al atrio o la cloaca, Tedman (1991) la describe como una banda ancha de piel sin pelo ni pigmento que encierra la abertura del vestíbulo y el ano. Sin embargo, tanto macroscópicamente como en los cortes histológicos, en *A. australis* el tejido que recubre al clítoris y toda la cavidad de



la cloaca/atricio presentan pequeñas unidades apilosebáceas así como un epitelio fuertemente pigmentado y queratinizado en ejemplares recién nacidos, juveniles y adultos. Estas diferencias pueden ser debidas a distintas coloraciones de la piel entre pinnípedos y la presencia de diminutos folículos es la extensión de los anexos de la piel ventral.

En conclusión, las características histológicas del tracto reproductor inferior son similares a las de otras especies de pinnípedos. El pliegue himenal en cachorras de *A. australis* está poco desarrollado comparado con otras especies o categorías y probablemente ocurra un proceso de diferenciación durante la pubertad cuya función esté asociada al cierre del tracto reproductor durante el buceo. Se describen por primera vez anexos a la pared de la vagina y vestíbulo así como características generales de la inervación del aparato reproductor femenino.



5.- CONCLUSIONES GENERALES

Las principales conclusiones obtenidas en el presente trabajo de investigación se resumen en los siguientes puntos:

1. Las características generales de la CC en los primeros meses de vida fueron similares a las reportadas por otros autores para *A. australis* así como en otras especies de pinnípedos; se describen por primera vez características del crecimiento y de la CC durante el primer año de vida de las cachorras de esta especie.
2. Se encontraron diferencias importantes en el peso ovárico entre cachorras de *A. australis* y de otras especies de otáridos.
3. El presente estudio permitió describir con mayor detalle las características histomorfológicas de los ovarios comparado con las reportadas hasta el momento para otros pinnípedos, en particular sobre la clasificación de folículos y la estructura general del parénquima ovárico en cachorras.
4. Los datos morfométricos de folículos ováricos en cachorras de *A. australis* son diferentes a los reportados para hembras adultas de otras especies de pinnípedos, debiéndose poner especial énfasis en que estas diferencias histomorfométricas probablemente se deban a fenómenos fisiológicos asociados a la actividad funcional del ovario en hembras reproductivamente maduras.
5. Las características histológicas generales del tracto reproductor femenino en cachorras de *A. australis*, son similares a las descritas para otras especies de pinnípedos.
6. Se destaca la presencia de una importante irrigación de la pared muscular y estroma en toda la pared del útero, en particular el miometrio y endometrio de la región del cérvix, así como numerosas fibras y ganglios nerviosos que constituyen el plexo de Frankenhauser hasta ahora no descrito en mamíferos marinos.
7. El pliegue himenal en cachorras de *A. australis* está pobremente desarrollado comparado con otras especies y probablemente ocurra un proceso de crecimiento y diferenciación durante la pubertad cuya función esté asociada al cierre del tracto reproductor inferior durante el buceo.
8. Se describen por primera vez los anexos a la pared de la vagina y vestíbulo (glándulas vestibulares, lóbulo adiposo) en otáridos y se discute su posible asociación con la liberación de feromonas y otras secreciones, o en el caso del lóbulo adiposo como receptor de estímulos sensitivos asociados, en conjunto, a la conducta reproductiva.



-
9. La inervación uterina y del tracto reproductor inferior probablemente ejerza influencias importantes en el control del flujo sanguíneo durante el buceo evitando así fenómenos de hipoxia del útero y la placenta.
 10. Los resultados obtenidos constituyen una referencia para evaluar los cambios que puedan ocurrir en la pubertad y vida adulta de las hembras de *A. australis* así como durante las diferentes etapas de la gestación y su adaptación al buceo.



6.- PERSPECTIVAS EN EL ESTUDIO REPRODUCTIVO DE LOS PINNÍPEDOS

De acuerdo a los avances obtenidos en el desarrollo de esta tesis, se plantea:

1. Ampliar el estudio histológico del tracto reproductor para:
 - a.- evaluar los cambios que ocurren en diferentes etapas del ciclo reproductivo.
 - b.- estudiar la expresión de enzimas esteroideogénicas, la fuente de hormonas ováricas y los receptores hormonales, que participen en el ciclo reproductivo en *A. australis*.
 - c.- analizar de qué manera la estructura vasculonerviosa participa en la adaptación al buceo e intensa actividad física de las hembras durante la gestación.
2. Estudiar la dinámica de las hormonas sexuales en las diferentes etapas del ciclo reproductivo de *A. australis*, asociada a los cambios que ocurren en el tracto reproductor (diapausa, gestación y parto).



7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasaki K, Hirayama K, Terasawa A, Ohmachi T, Matsuda K, Okamoto M, Taniyama H. 2007. Histological and immunohistochemical evaluation of the canine ovary. *Reproduction in Domestic Animals*. 42:495-501.
2. Adams JP, Testa JW, Goertz CEC, Ream RR, Sterling JT. 2007. Ultrasonographic characterization of reproductive anatomy and early embryonic detection in the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) in the field. *Marine Mammal Science*. 23: 445–452.
3. Alm P, Lundberg LM, Wharton J, Polak JM. 1988. Effects of pregnancy on the extrinsic innervation of the guinea pig uterus. A histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochemical Journal*. 20:414-26.
4. Amoroso EC, Harrison RJ, Harrison Matthews L, Rowland IW. 1951. Reproductive organs of near-term and new born seals. *Nature*. 168: 771-772.
5. Ariyaratna HBS, Gunawardana VK. 1997. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. *Small Ruminant Research*. 26: 123-129.
6. Atkinson S, Becker LB, Johanos TC, Pietraszek JR, Kuhn BCS. 1994. Reproductive morphology and status of female Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*) fatally injured by adult male seals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100: 1225-1230.
7. Atkinson, S. 1997. Reproductive biology of seals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2:175-194.
8. Bäcklin BM, Eriksson I, Olovsson M. 2003. Histology of uterine leiomyoma and occurrence in relation to reproductive activity in the Baltic gray seal (*Halichoerus grypus*). *Veterinary Pathology*. 40:175–180.
9. Barrett T, Blixenkrone-Moller M, Di Guardo G, Domingo M, Duignan P, Hall A, Mamaev L, Osterhaus AD. 1995. Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Veterinary Microbiology*. 44:261-5.
10. Barone R. 1990. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4. Splanchnologie II. Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Éditions Vigot. 23, rue de l'École de Médecine, 75006, Paris. Deuxième édition.
11. Berta A, Sumich JL. 1999. *Marine Mammals: Evolutionary Biology*. Academic Press. London.
12. Bester M. 1995. Reproduction in the female subantarctic fur seal, *Arctocephalus tropicalis*. *Marine Mammal Science*. 11:362-375.



- 13.** Bloom-Fawcett. 1966 y 1993. Tratado de Histología. Ed. Interamericana-McGraw-Hill.
- 14.** Bonner WN. 1955. Reproductive organs of foetal and juvenile elephant seals. *Nature*. 176:982-983.
- 15.** Boshier DP. 1979. Electron microscopic studies on the endometrium of the grey seal (*Halichoerus grypus*) during its preparation for nidation. *Journal of Anatomy*. 128:721-735.
- 16.** Boshier DP. 1981. Structural changes in the corpus luteum and endometrium of seals before implantation. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 29:143-149.
- 17.** Boyd IL. 1983. Luteal regression, follicle growth and the concentration of some plasma steroids during lactation in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 69: 157.164.
- 18.** Boyd, IL. 2000. State-dependent fertility in pinnipeds: contrasting capital and income breeders. *Functional Ecology*. 14: 623-630.
- 19.** Brauer MM. 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying plasticity in uterine sympathetic nerves. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 140: 1–16
- 20.** Braw-Tal R, Yossefi S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 109:165-71.
- 21.** Bronson FH. 1989. *Mammalian Reproductive Biology*. The University of Chicago Press. Chicago and London.
- 22.** Browne P, Conley A, Spraker T, Ream R, Lasley B. 2006. Sex steroid concentrations and localization of steroidogenic enzyme expression in free-ranging female northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *General Compendium of Endocrinology*. 147:175-183.
- 23.** Buño W, Vaz Ferreira R, Franchi CM. 1950. Observaciones sobre la histología del tracto femenino de *Otaria flavescens* (Shaw). *Archivos de la Sociedad Biológica de Montevideo*. 17:6-13.
- 24.** Calambokidis J, L Gentry. 1985. Mortality of northern fur seal pups in relation to growth and birth weights. *Journal of Wildlife Diseases*. 21:327-330.
- 25.** Castro Ramos M, Katz H, Moraña A, Tiscornia MI, Morgades D, Castro O. Tuberculosis en pinnípedos (*Arctocephalus australis* y *Otaria flavescens*) de Uruguay. Menafrá R Rodríguez-Gallego L Scarabino F & D Conde (eds) 2006 Bases para conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo.
- 26.** Colegrove KM, Gulland FMD, Naydan DK, Lowenstine LJ. 2009. The normal genital tract of the female California Sea Lion (*Zalophus californianus*): Cyclic changes



in histomorphology and hormonal receptor distribution. The Anatomical Record. 292:1801–1817.

27. Cottle MKW, Higgs GW. 1998. Adrenergic innervation of the fallopian tube of the monkey. The Histochemical Journal. 5:143-149.

28. Corcuera J. 1989. Análisis preliminar de la biología reproductiva del lobo marino de dos pelos, *Arctocephalus australis*, (Zimmermann, 1783) (Carnivora, Otariidae). Seminario para la licenciatura en Ciencias Biológicas. Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

29. Craig AM. 1964. Histology of reproduction and the oestrus cycle in the female fur seal, *Callorhinus ursinus*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 21:773-811.

30. Daniel JC. 1981. Delayed implantation in the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) and other pinnipeds. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement. 29:35-50.

31. Davis R, Polasek L, Watson R, Fuson A, Williams TM, Kanatous SB. 2004. The diving paradox: new insights into the role of the dive response in air-breathing vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 138:263-268.

32. De Oliveira LR, Arias-Schreiber M, Meyer D, Morgant JS. 2006. Effective population size in a bottlenecked fur seal population. Biology of Conservation. 131: 505-509.

33. Dierauf L. 1990. Handbook of marine mammal medicine: health, disease and rehabilitation. C.R.C. Press.

34. Dickie GS, Dawson SM. 2003. Age, growth, and reproduction in New Zealand fur seals. Marine Mammal Science.19:173-185.

35. Ebling FJP. 2005. The neuroendocrine timing of puberty. Reproduction. 129: 675–683.

36. Eckery DC, Juengel JL, Whale LJ, Thomson BP, Lun S, Mc Natty KP. 2002. The corpus luteum and interstitial tissue in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). Molecular Cell Endocrinology. 191: 81-87.

37. Enders RK, Pearson OP, Pearson AK. 1946. Certain aspects of reproduction in the fur seal. Anatomical Record. 94: 213-223.

38. Eppig J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 122:829-838.

39. Evans ACO. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. Reproduction in Domestic Animals. 38:240-246.

40. Felipe A, Cabodevila J, Callejas S. 1999. Anatomicohistological characteristics of ovary of the coypu (*Myocastor coypus*) Anatomia Histologia Embryologia. 28:89-95.



- 41.** Franco Trecu V. 2005. Comportamiento maternal y aspectos reproductivos de *Arctocephalus australis* en Isla de Lobos, Uruguay. Tesis. Facultad de Ciencias. Montevideo, Uruguay.
- 42.** Franco Trecu V. 2010. Éxito de crianza y hábitos alimenticios en hembras del lobo fino sudamericano (*Arctocephalus australis*) y su relación trófica con hembras del león marino sudamericano (*Otaria flavescens*). Tesis de Maestría. PEDECIBA. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 90p.
- 43.** García-Pascual A, Labadía A, Triguero D, Costa G. 1996. Local regulation of oviductal blood flow. *General Pharmacology*.27:1303-10.
- 44.** Gerber LR, Hilborn R. 2001. Catastrophic events and recovery from low densities in populations of otariids: implications for risk of extinction. *Mammal Reviews*. 31:131-150.
- 45.** Gales NJ, Williamson P, Higgins LV, Blackberry MA, James I. 1997. Evidence for a postimplantation period in the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 111:159-63.
- 46.** Gougeon A. 2004. Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects. *The Ovary*. Chapter 2. Pp.25-43.
- 47.** Grimes RW, Matton P, Ireland JJ. 1987. A comparison of histological and non histological indices of atresia and follicular function. *Biology of Reproduction*. 37: 82-88.
- 48.** Guraya SS, Uppal J. 1978. Morphological and histochemical studies on the foetal and postnatal ovaries of the field rat (*Millardia meltda*). *Acta Morphologica Neerlandica-Scandinavica*. 16:287-304.
- 49.** Guraya SS, Greenwald G. 1964. A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *Anatomical Record*. 149:411-433.
- 50.** Guyton A. 1992. Tratado de fisiología médica. 8va edición. Ed. Interamericana.
- 51.** Hanklein T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Bolognesi M, De Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Weber RE, Fago A, Burmester T. 2005. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 99:110-119.
- 52.** Harrison Matthews L, Harrison RJ. 1949. Subsurface crypts, oogenesis, and the corpus luteum in the ovaries of seals. *Nature*. 164:587-588.
- 53.** Harrison RJ. 1950. Observations on the seal ovary. *Proceedings of the Anatomical Society, London. Journal of Anatomy*. 84: 400.
- 54.** Harrison RJ, Harrison Matthews L, Roberts JM. 1952. Reproduction in some Pinnipedia. *The Transactions of the Zoological Society of London*. 27:437-540.



55. Higgins L. 1993. The nonannual, nonseasonal breeding cycle of the Australian sea lion, *Neophoca cinerea*. Journal of Mammalogy. 74:270-274.
56. Hilliges M, Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Johansson O. 1995. Innervation of the human vaginal mucosa as revealed by PGP 9.5 immunohistochemistry. Acta Anatomica (Basel). 153:119-126.
57. Hobson BM, Boyd IL. 1984. Gonadotrophin and progesterone concentrations in placentae of grey seals (*Halichoerus grypus*). Journal of Reproduction and Fertility. 72: 521-528.
58. <http://imagej.softonic.com/mac>
59. Kanerva L, Teravainen H. 1972. Electron microscopy of the paracervical (Frankenhauser) ganglion of the adult rat. Z. Zellforsch. 129:161-177.
60. Katz H, Pérez W, Bielli A, Chavez R. 2009-a. Histomorphology of prepuberal ovaries in the South American fur seal (*Arctocephalus australis* Zimmerman, 1783). Folia Morphologica. 68:277-286.
61. Katz, H, Salvetti N, Pedrana G, Ortega H. 2009-b. Análisis inmunohistoquímico de ovarios de lobo fino (*A. australis*, Zimmerman 1783). Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. 19 y 20 de noviembre de 2009. Montevideo. Uruguay.
62. Knobil, Encyclopedia of Reproduction. Vol 2. 1999. Academic Press. Fallopian Tube. Diaa M. El-Mowafi and Michael P Diamond. 149-157.
63. Kooyman GL, Castellini MA, Davis RW. 1980. Physiology of diving in marine mammals. Annual Review of Physiology. 43:343-356.
64. Laws RM, 1956. The elephant seal (*Mirounga leonina* Linn). II. General, social, and reproductive behavior. Falkland Islands Dependencies Survey, Scientific Reports 13:1-88.
65. Lakomy M, Szatkowska C. 1992. Cytoarchitecture of paracervical ganglion (Frankenhauser) of pig. Archivum Veterinarium Polonicum. 32:31-39.
66. Lima M, Páez E. 1995. Growth and reproductive patterns in the South American fur seal. Journal of Mammalogy. 76:1249-1255.
67. Lima M, Páez E. 1997. Demography and population dynamics of South American fur seals. Journal of Mammalogy, 78:914-920.
68. Lindblom B, Ljung B, Hamberger L. 1979. Adrenergic and novel non-adrenergic neuronal mechanisms in the control of smooth muscle activity in the human oviduct. Acta Physiologica Scandinavica. 106:215-20.
69. Lindenfors P, Dalen L, Angerbjörn A. 2003. The monophyletic origin of delayed implantation in carnivores and its implications. Evolution. 57:1952-1956.



70. Lundy T, Smith P, O'Conne A, Hudson NL, Mc Natty KP. 1999. Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115:251-262.
71. Luna L. 1992. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. American Registry of Pathology. Lee G. Luna Editor. McGraw-Hill Book Company.
72. Marshall's. 1984. Physiology of Reproduction. 4th edition. Edited by G.E. Lamming. Published by Churchill Livingstone in Edinburgh, New York.
73. Mattlin R. 1978. Pup Mortality of the New Zealand fur seal (*Arctocephalus forsteri*). *New Zealand Journal of Ecology*. 1:138-144.
74. McDonald LE. 1989. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. 4ta. ed. Ed. Interamericana-McGraw-Hill.
75. McKenzie J, Parry LJ, Page B, Goldsworthy SD. 2005. Estimation of pregnancy rates and reproductive failure in New Zealand fur seal (*Arctocephalus forsteri*). *Journal of Mammology*. 86:1237-1246.
76. Mitchell BS, Stauber VV. 1990. Morphological, histochemical and immunohistological studies of the paracervical ganglion in prepuberal, pregnant and adult, non-pregnant guinea pig. *Journal of Anatomy*. 172:177-189.
77. Mitchell BS, Ahmed E, Stauber W. 1996. Projections of the guinea pig paracervical ganglion to pelvic viscera. *Histochemical Journal*. 25:51-56.
78. Molina R. 2006. Hallazgos digestivos en crías de lobo fino austral (*Arctocephalus australis*, ZIMMERMAN, 1783) muertos en Isla Guafo, X Región, Chile. Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile.
79. Morgades D, Katz H, Castro O, Capellino D, Casas L, Benitez G, Venzal JM, Moraña A. Fauna parasitaria del lobo fino *Arctocephalus australis* y del león marino *Otaria flavescens* (Mammalia, Otariidae) en la costa uruguaya. Menafrá R Rodríguez-Gallego L Scarabino F & D Conde (eds) 2006 Bases para conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo.
80. Motta PM, Hafez ESE. 1980. Biology of the ovary. Martinus Nijhoff Publishers. The Hague.
81. Mülling C, Christian B, Budras KD. 1998. Subsurface crypts and interstitial cells in the ovary of the seal (*Phoca vitulina vitulina*): light and electron microscopic findings. *Italian Journal of Anatomy and Embriology*. 103:167-181.
82. Murray MK. 1995. Epithelial Lining Of The Sheep Ampulla Oviduct Undergoes Pregnancy-Associated Morphological Changes In Secretory Status And Cell Height. *Biology of Reproduction*. 53:653-663.



83. Naya DE, Arim M, Vargas R. 2002. Diet of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) in Isla de Lobos, Uruguay. *Marine Mammal Science*. 18:734-745.
84. Nomina Histologica Veterinaria (NHV). 1992. International Committee on Veterinary Histological Nomenclature (I.C.V.H.N.). Revised 2nd Ed. I.C.V.H.N., Zurich and Ithaca, New York.
85. Odendaal PN. 2000. Seasonal changes in the ovarian structure of the cape fur seal (*Arctocephalus pusillus pusillus*). Disertación de tesis de Maestría. Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Pretoria. Sudáfrica.
86. Olsen OW, Lyons ET. 1962. Life Cycle of the Hookworm, *Uncinaria lucasi* Stiles, of the Northern Fur Seals *Callorhinus ursinus*, on the Pribilof Island in the Bering Sea. *The Journal of Parasitology*. 48: 42-43.
87. Osipova EA. 1976. Histology and histochemistry of the seal ovaries and the age-related changes in the ovaries of the Greenland seal. *Arkhiv Anatomii, Gistologii i Émbriologii*. 70: 29.37.
88. Ouellete J, Ronald K. 1985. Histology of reproduction in harp and grey seals during pregnancy, postparturition and estrus. *Canadian Journal of Zoology*. 3:1778-1796.
89. Páez E. 2000. Utilización de Bootstrap y análisis de poder en estimaciones de abundancia de cachorros de *Arctocephalus australis* Rey, M & Amestoy, F (eds). Pp. 55-70. En: Sinopsis de la biología y ecología de las poblaciones de lobos finos y leones marinos de Uruguay. pp. 55-70. Pautas para su manejo y administración. Proyecto URU/92/003. INAPE, Montevideo.
90. Páez E. Situación de la administración del recurso lobos y leones marinos en Uruguay. Menafrá R Rodríguez-Gallego L Scarabino F & D Conde (eds) 2006 Bases para conservación y el manejo de la costa uruguaya. VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo. I+xiv+668pp .
91. Pearson AK, Enders RK. 1951. Further observations on the reproduction of the Alaskan fur seal. *Anatomical Record*. 111:695-711.
92. Pérez W, Katz H, Lima M. 2008. Gross heart anatomy of *Arctocephalus australis* (Zimmerman, 1783). *Anatomical Science International*. 83: 6–10.
93. Ponce de León A. 1983. Aspectos de la reproducción, crecimiento intrauterino y desarrollo postnatal del lobo de dos pelos sudamericano *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) en islas de la República Oriental del Uruguay. Tesis licenciatura en Oceanografía Biológica, Universidad de la República, Facultad de Humanidades y Ciencias. Montevideo, Uruguay. 93p.



- 94.** Ponce de León A. 1983b. Crecimiento intrauterino y postnatal del lobo de dos pelos sudamericano, *Arctocephalus australis* (Zimmerman, 1783), en islas de Uruguay. Actas del VIII Simposio Latinoamericano de Oceanografía Biológica.
- 95.** Ponce de León A. 1984. Lactancia y composición cuantitativa de leche de lobo fino sudamericano *Arctocephalus australis* (Zimmerman, 1783). ILPE. Anales. Montevideo, Uruguay.
- 96.** Ponce de León A. 2003. DINARA-MGAP. Fichas Técnicas. www.dinara.gub.uy
- 97.** Rand RW. 1954. Reproduction in the female cape fur seal, *Arctocephalus pusillus* (Schreber). Proceedings of the Zoological Society of London. 124: 717-740.
- 98.** Reenfre MB, Shaw G. 2000. Diapause. Annual Review of Physiology. 62:353-375.
- 99.** Reidember J. 2007. Anatomical adaptations of aquatic mammals. The Anatomical Record. 290:507-513.
- 100.** Reynaud K, Gicquel C, Thoumire S, Chebrout M, Ficheux C, Bestandji M, Chastant-Maillard S. 2009. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. Reproduction in Domestic Animals. 44:174-9.
- 101.** Riet Sapriza RG, Franco-Trecu V, Costa DP, Chilvers L, Hückstadt LA. 2010. ¿Existe plasticidad en el comportamiento de buceo en hembras lactantes del lobo fino sudamericano *Arctocephalus australis* de Isla de Lobos, Uruguay?. XIII Congreso SOLAMAC. Florianópolis, Brasil. Octubre 2010. (libro de resúmenes).
- 102.** Rubianes E. 2001. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. Fisiología de la Reproducción. R. Ungerfeld. Facultad de Veterinaria.
- 103.** Russo F, Vittoria A. 2006. Neuroendocrine cells in the vestibular glands of the genital tract of cows and pigs. Acta Histochemica. 108: 351-355.
- 104.** Sanchez GC, Ocampo MB. 1998. Follicular dynamics in upgraded indigenous Philippine goat. 35th. Annual Convention of the Philippine Society of Animal Science, Manila. Philippines.
- 105.** Sawyer HR, Olson PN, Gorell TA. 1984. Effects of progesterone on the oviductal epithelium in estrogen-primed prepubertal beagles: Light and electron microscopic observations. American Journal of Anatomy. 169:75–87.
- 106.** Schnitzler JG, Siebert U, Jepson P, Beineke A, Jauniaux T, Bouquegneau JM, Das K. 2008. Harbor porpoise thyroids: histologic investigation and potential interactions with environmental factors. Journal of Wildlife Diseases. 44:888-901.
- 107.** Schmidt B. 2006. Histologische Untersuchung and der Cervix der Hündin während der Ingravidität und intra partum. Inaugural-dissertation zur Erlangung



des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.

108. Schofield BM. 1952. The Innervation of the cervix and cornu uteri in the rabbit. *Journal of Physiology*. 117:317-328.

109. Skinner JD, Westlin-Van Aarde LM. 1989. Aspects of reproduction in female Ross seals (*Ommatophoca rossii*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 87:67-72.

110. Sowicz KW, Majewski M, Łakomy M. 1998. Distribution of neurons innervating the uterus of the pig. *Journal of the Autonomic Nervous System*. Vol. 74. 25:13-22.

111. Steinhauer N, Boos A, Günzel-Apel AR. 2004. Morphological changes and proliferative activity in the oviductal epithelium during hormonally defined stages of the oestrous cycle in the bitch. *Reproduction of Domestic Animals*. 39:110-9.

112. Stennett AK, Khalil RA. 2006. Neurovascular mechanisms of hypertension in pregnancy. *Current Neurovascular Research*. 3:131-48.

113. Songsasen N, Fickes A, Pukazhenthil BS, Wildt DE. 2009. Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 Supplements. 2:65-70.

114. Soto, K.H., Trites A, Arias-Schreiber, M. 2004. The effects of prey availability on pup mortality and the timing of birth of South American sea lions (*Otaria flavescens*) in Peru. *Journal of Zoology*. 264: 419–428.

115. Tedman RA. 1991. The female reproductive tract of the Australian Sea Lion, *Neophoca cinerea* (Peron, 1816) (Carnivora: Otariidae). *Australian Journal of Zoology*, 39: 351-372.

116. Telfer E, Gosden RG. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 81:137-47.

117. Trites AW, Donnelly CP. 2003. The decline of Steller sea lion *Eumetopia jubatus* in Alaska: a review of the nutritional stress hypothesis. *Mammal Reviews*. 33:3-28.

118. Trillmich F, Lindberg D. 1985. Drastic effects of El Nino on Galapagos pinnipeds. *Oecologia*, 67: 19-22

119. Van Orden DE, Farley DB, Clancey CJ. 1983. Effect of parasympathetic decentralization and paracervical ganglion excision on reproduction function in the rat. *Biology of Reproduction*. 28:910-916.

120. Van Voorhis BJ. 1999. Follicular development. *Encyclopedia of Reproduction*. Vol 2. Pp.376-388.



-
- 121.** Vaz Ferreira R. 1976a. *Arctocephalus australis* (Zimmermann) South American fur seal. Advisory Committee on Marine Resources Research: 1-13.
- 122.** Vaz-Ferreira, R. 1979. South American Sea Lion. En: Mammals in the Seas, volume II: pinniped species summaries and report on sirenians. FAO Fisheries Series No. 5, Vol II, pp. 9-12.
- 123.** Vaz Ferreira R. 1982a. *Arctocephalus australis* Zimmermann, South American fur seal. Food and Agriculture Organization, Fisheries Service, No. 5. Vol. IV (UN/FAO//ACMRR Ad Hoc III/20): 497.508.
- 124.** Vaz Ferreira R, Ponce de León A. 1987. South American fur seal, *Arctocephalus australis*, in Uruguay. Status, biology and ecology of fur seals. In: Croxall JP, Gentry RL eds. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Technical Report. National Marine Fisheries Service (NMFS) 51, Montevideo, 29-32.
- 125.** Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD (2000) Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Critical Reviews in Toxicology. 30:71-133.
- 126.** Warner TF, Tomic S, Chang CK. 1996. Neuroendocrine cell-axonal complexes in the minor vestibular gland. Journal of Reproductive Medicine. 41:397-402.
- 127.** Wrobel KH, Kujat R. 1993. The bovine tubouterine junction: general innervation pattern and distribution of adrenergic, cholinergic, and peptidergic nerve fibers. Cell, Tissue and Research. 274:493-501.
- 128.** York, A., Lima, M. Ponce De León A., Malek, A. & Paez, E. 1998. First description of diving female South American fur seals in Uruguay. Abstract Volume. WMMSC, Monaco, January 1998.
- 129.** Žitný J, Massányi P, Trakovická A, Rafaj J, Toman R. 2004. Quantification of The ovarian follicular growth in rabbits. Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy. 48:37-40.
- 130.** Zukerman S, Mandl AM, Eckstein P. 1962. The ovary. Vol. 1. Academic Press, New York, London.



ANEXOS

ANEXO 1

CLASIFICACIÓN SUBJETIVA DEL GRADO DE DESCOMPOSICIÓN DE LOS ANIMALES

°1= muerte reciente, se vio morir al animal o se tiene estimada la muerte cuando son cedidos por la ONG.

°2= en *rigor mortis* o aspecto fresco por brillo en ojos/córnea y aspecto del tejido muscular.

°3= descomposición media, abdomen distendido, ojos hundidos, córnea opaca, pelo se desprende con facilidad.

°4= descomposición avanzada, carcasa casi sin pelo, cambios en la coloración de músculos y órganos internos, deterioro general.

ANEXO 2

HISTOLOGÍA CUANTITATIVA DE OVARIOS

1.- Diámetro folicular

Se evaluaron cortes de folículos en los que se evidenció claramente el núcleo y nucléolo del ovocito. Se realizaron mediciones a los aumentos correspondientes de acuerdo a la estructura a medir en los diferentes tipos foliculares (tipo 1 a 5); se registraron y promediaron dos diámetros transversales en la región más ancha del corte de cada uno de los folículos descritos por Grimes y col (1987).

2.- Espesor de la granulosa.

Se midieron desde la luz folicular hasta la lámina basal de las células de la granulosa, en 8 puntos alrededor del folículo en forma aproximadamente equidistante.

3.- Espesor de la teca.

Se midió desde la lámina basal folicular hasta el límite de la teca con las células de la granulosa, en 8 puntos alrededor del folículo en forma aproximadamente equidistante.

4.- Diámetro del ovocito.

Se registraron y promediaron dos diámetros transversales en la región más ancha del corte de ovocitos pertenecientes a cada una de las categorías establecidas por Grimes y col (1987).



5.- Diámetro del núcleo del ovocito.

Se registraron y promediaron dos diámetros transversales en la región más ancha del corte de los núcleos de ovocitos pertenecientes a cada una de las categorías establecidas por Grimes y col (1987).

6.- Clasificación de folículos preantrales y antrales en sanos o grados de atresia.

Se clasificó los folículos preantrales, antrales y en atresia en tres categorías como lo describe Grimes y col., 1987.

7.- Profundidad media de ubicación de los folículos primordiales y primarios.

Se midió la profundidad de los folículos de cada tipo como la distancia entre el la zona basal del epitelio germinativo del ovario y el punto de la superficie folicular más próximo a dicho epitelio.

ANEXO 3

CLASIFICACIÓN DE FOLÍCULOS OVÁRICOS.

1) Clasificación de folículos en desarrollo. Lundy y col. (1999) clasificó los folículos ováricos de ovinos de acuerdo a mediciones de diámetro folicular, número de capas de células de la granulosa, y presencia o ausencia de teca interna en la sección más ancha y/o Sección a través del Nucléolo del Ovocito (SNO).

- tipo 1 (primordiales): lámina simple de células de la granulosa planas alrededor del ovocito.
- tipo 1-a: contienen una mezcla de células de la granulosa cuboidales y planas en una lámina simple de células de la granulosa alrededor del ovocito.
- tipo 2 (primario): contienen una a menos de dos láminas completas de células granulosas cuboides con una teca interna evidente en una proporción (35%) del folículo.
- tipo 3 (preantral pequeño): tiene de dos a menos de cuatro láminas de células granulosas, con una teca interna evidente en todos los folículos.
- tipo 4 (preantral grande): tiene de cuatro a ocho láminas de células granulosas con una teca interna prominente pero sin cavidad antral.
- tipo 5 antrales pequeños y grandes: posee pequeños espacios llenos de fluido entre las células de la granulosa y una teca interna prominente hasta la



formación de una cavidad antral bien definida.

Los folículos tipo 5 también fueron clasificados de acuerdo a su diámetro máximo de membrana basal a membrana basal. Varios folículos no fueron clasificados porque la disponibilidad de cortes seriados no incluyó SNO ni su diámetro máximo. Los folículos que tenían signos de degeneración fueron excluidos de este estudio.

2) Clasificación de folículos en atresia

Grimes y col. (1987) clasifican los folículos bovinos basados en criterios morfológicos y número de capas de la granulosa:

1.- folículos sanos o no atrésicos (NA) que tienen al menos 7 láminas de células granulosas, una membrana basal intacta y pocos núcleos picnóticos;

2.- folículos atrésicos tempranos (AT), folículos secundarios que poseen de dos a seis láminas de células granulosas, numerosos núcleos picnóticos y plegamiento/desprendimiento de membrana basal con separación de células de la granulosa;

3.- folículos con atresia avanzada (AAV), folículos secundarios con menos de dos láminas de células granulosas, una disrupción completa de la integridad de la membrana basal.

ANEXO 4

LISTADO DE ESPECIES Y SUS NOMBRES COMUNES

1. *Arctocephalus australis*: lobo marino o lobo fino sudamericano,
2. *Arctocephalus pusillus*: lobo marino o lobo fino sudafricano, del cabo o australiano (*A. pusillus pusillus*, *A. pusillus doriferus*)
3. *Arctocephalus forsterii*: lobo marino de Nueva Zelanda
4. *Arctocephalus tropicalis*: lobo marino subantártico
5. *Callorhinus ursinus*: lobo marino del norte o ártico
6. *Otaria flavescens* o *byronia*: leon marino sudamericano
7. *Neophoca cinerea*: león marino australiano
8. *Zalophus californianus*: león marino californiano
9. *Halichoerus grypus*: foca gris
10. *Pagophilus groenlandicus* (antes *Phoca groenladica*): foca arpa
11. *Pusa hispida* (antes *Phoca hispida*): foca anillada
12. *Phoca vitulina*: foca del puerto o foca común



13. *Leptonychotes weddellii*: foca de Weddell
14. *Ommatophoca rossii*: foca de Ross
15. *Lobodon carcinophagus*: foca cangrejera
16. *Mirounga leonina*: elefante marino del sur
17. *Odobenus rosmarus*: morsa
18. *Monachus schauinslandi*: foca monje de Hawai

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

- Tabla 1. Clasificación de la condición corporal en cachorras de *A. australis*.
Tabla 2. Clasificación del estado corporal de cachorras por rango de edades.
Tabla 3. Datos morfométricos de cachorras de *A. australis* por categoría.
Tabla 4. Peso promedio de los ovarios por rango de edad en cachorras de *A. australis*.
Tabla 5. Características morfométricas generales de folículos ováricos en cachorras de *A. australis*.
Tabla 6. Características de la pared folicular de los folículos tipo 3, 4 y 5.
Tabla 7. Ubicación de los diferentes tipos foliculares en el espesor de la corteza ovárica en cachorras de *A. australis*

FIGURAS

- 1.- Esquema del aparato genital de de pinnípedo. Tomado y adaptado de Atkinson, 1997.
- 2.- Cachorro de *A. australis*. Isla de Lobos, Uruguay
- 3.- Mapa de distribución del lobo fino sudamericano de *A. australis*. Tomado y adaptado de www.ucin-redlist.org.
- 4a.- Fotografía aérea de Isla de Cabo Polonio, Rocha. Uruguay. Msc. Valentina Franco.
- 4b.- Fotografía aérea de Isla de Lobos, Maldonado. Uruguay. Tomada de la tesis de Maestría de la Msc. Micaela Trimble.
- 5.- Ciclo reproductivo de *A. australis* con la probable duración de las diferentes etapas de diapausa, implantación embrionaria y gestación activa, así como de la lactación y destete de las crías. Tomado y adaptado del ciclo de *A. forsteri* por McKenzie y col, 2005.
- 6.- Esquema simplificado del ciclo reproductivo de *A. australis*. Si bien existen datos sobre los periodos entre parto y la cópula, aún no se ha registrado en forma precisa el período de diapausa e implantación embrionaria en *A. australis* en Uruguay.
- 7.- Disección de tracto reproductor de cachorra de *A. australis*.
- 8.- Fijación del tracto reproductor por inmersión.
- 9.- N° de hembras y condición corporal para cada rango de edad en cachorras de *A. australis*.
- 10.- Aspecto macroscópico del ovario de cachorras de *A. australis*
- 11.- Corteza externa del ovario de cachorra de *A. australis*. Se observa un folículo antral tipo 5 rodeado por abundantes células intersticiales; debajo de la cápsula se ubican los folículos primordiales asociados a las criptas subcapsulares. HE. 200x.
- 12.- Mosaico de la zona cortico-medular y médula ovárica. En la corteza profunda se observan pequeños grupos de células intersticiales rodeados de células intersticiales dispersas. En el estroma medular se observa un grupo compacto de CI, numerosos cortes de vasos sanguíneos
- 13.- Corteza ovárica. Se observan las bandas de tejido conjuntivo del estroma ovárico donde transcurren los vasos sanguíneos. Entre los delgados tabique se ubican las CI. Van Giesson. 40x.
- 14.- Cápsula del ovario: epitelio simple apoyado en la albugínea cuyas fibras corren paralelas a la superficie y rodean a las criptas subcapsulares. Las CS pueden ser simples (a, a', b) o muy ramificadas (b') asociadas a folículos primordiales. En a', las caras de la CS presentan epitelio de diferente altura. Flecha blanca: abertura superficial de una cripta. a y a': Van Giesson. 400x; b y b': HE. 40x.



- 15.-** Folículo Tipo 1 o primordial debajo de la albugínea y en estrecho contacto con una CS. HE. 400x.
- 16.-** Grupo de folículos Tipo 1 ubicados en el espesor de la corteza ovárica a diferentes profundidades. CS: cripta subcapsular. HE. 40x.
- 17.-** Folículo Tipo 2 o primario unilaminar rodeado por una capa simple de células foliculares cúbicas. HE. 400x.
- 18.-** Folículos tipo 3 o preantrales con diferentes aspecto y ubicación en la corteza. A: ovocito rodeado por dos capas de células de la granulosa. HE- 400x; B: folículo rodeado por bandas de tejido conjuntivo derivado de la albugínea. HE- 200x; C: ovocito envuelto por la zona pelúcida PAS+. PAS-H- 400x.
- 19.-** Folículo tipo 4 o preantral. **a:** ovocito grande rodeado por varias capas de células de la granulosa y externamente una delgada capa de células tecaes. 200x. **b:** se observa con más detalle la zona pelúcida evidente y el inicio de la formación de la cavidad folicular. 400x. HE.
- 20.-** Folículo tipo 5 con 2 ovocitos ubicado en la corteza superficial. Los ovocitos presentan una membrana pelúcida bien definida y están envueltos por la corona radiada. La capa granulosa está formada por varios estratos celulares que se van reduciendo hacia una de las caras del folículo. H-E. 200x
- 21.-** Folículos tipo 5 o antrales. **a:** distribución variable de folículos en la corteza. Van Giesson. 40x; **b, c y c:** espesor variable de la granulosa. Capas tecaes poco diferenciadas del estroma intersticial donde se observan numerosas células intersticiales con abundante citoplasma eosinófilo. **e:** detalle de la granulosa de espesor variable y capas tecaes poco diferenciadas; en la periferia, CI grandes de citoplasma eosinófilo y aspecto espumoso. HE. 400x.
- 22.-** Folículos antrales en diferente estadio de atresia y a diferente profundidad de la corteza. HE. 40x.
- 23.-** Folículos en diferente estadio de atresia. Atresia temprana, se observan alteraciones del ovocito, la membrana pelúcida se mantiene, células de la granulosa desprendidas hacia la cavidad antral; atresia avanzada, se observan grupos compactos de células con núcleo heterocromático y en el centro células de núcleo eucromático y citoplasma eosinófilo. HE. 200x
- 24.-** Folículo en atresia avanzada. La membrana pellúcida presenta aspecto irregular; externa e internamente se observan células de aspecto fibroblástico y numerosos macrófagos. HE. 400x.
- 25.- a:** CI organizadas en pequeños nidos en la corteza profunda. H-E- 400x. **b:** CI organizadas en cordones o irregularmente en la corteza. Van Giesson- 400x. Entre ellas se ubican delgados tabiques de tejido conjuntivo y pequeños capilares. En B se observa un folículo en atresia avanzada con los diferentes tipos celulares.
- 26.-** Diagrama de rangos del espesor de la granulosa de folículos tipo 3, 4 y 5 expresado en porcentaje
- 27.-** Diagrama de rangos del espesor de la teca de folículos tipo 3, 4 y 5 expresado en porcentaje.

Tuba uterina

- 28.-** Vista macroscópica de la tuba uterina y mesosálpinx envolviendo completamente al ovario. Flechas: negra: infundíbulo; amarilla: ampolla; roja: istmo
- 29.- Infundíbulo. a:** en la mucosa se observan las fimbrias extensas y delgadas; muscular muy delgada HE. 40x. **b:** sector periférico de la pared tubárica donde se observa la serosa con grandes vasos sanguíneos. HE. 200x. **c:** detalle de la mucosa infundibular, se observan células cúbicas y células cilíndricas. HE. 400x.
- 30.- Infundíbulo.** Porción de una fimbria infundibular, las células epiteliales están apoyadas sobre un corion con vasos sanguíneos distendidos. HE. 200x.
- 31.- a:** vista panorámica de ampolla tubárica. HE. 40x. **b:** Porción de la pared medial. HE. 200x. **c:** Sector medial. Mesosálpinx donde se observan cortes de fibras nerviosas. HE. 200x. **d:** Detalle de un sector de mesosálpinx o serosa en el sector mesometrial con adipocitos e infiltrado linfocitario. HE. 400x
- 32.- Istmo. a:** Fimbrias cortas, pared muscular mas ancha que en los otros sectores. HE. 40x. **b. Istmo.** Pared muscular con numerosos vasos sanguíneos provenientes de la serosa. HE.200x. **c:** Epitelio de revestimiento con células cúbicas y cilíndricas. HE. 400x.

Útero

- 33.- a:** vista macroscópica exterior del tracto reproductor de cachorra de A. australis; **b:** Vista macroscópica interior de la porción distal del tracto reproductor.
- 34.-** Cuerno uterino, vista panorámica. HE. 40x.



- 35.- Endometrio revestido por epitelio simple, glándula endometrial y numerosos capilares en el estroma HE. 400x.
- 36.- Pared uterina. Sector mesometrial y lateral; muscular interna ancha atravesada por grandes vasos y nervios del estrato vascular, la muscular externa en esta zona deriva una gruesa capa de fibras hacia el ligamento mesometrial. Van Giesson. 40x.
- 37.- Miometrio y sector profundo del endometrio, se observan grandes vasos sanguíneos y nervio en el estrato vascular y vasos sanguíneos que atraviesan la muscular interna desde el endometrio. HE. 200x.
- 38.- Mosaico de una porción de cuerno uterino, cara lateral y mesometrial. HE. 200x.
- 39.- Esquema de cuerno uterino, vista transversal.
- 40.- Esquema del sector de transición, vista transversal
- 41.- Mosaico del sector de transición de los cuernos uterinos. Imagen de la región medial con un eje de vasos sanguíneos limitados por las capas musculares internas de cada cuerno. El sector más ancho corresponde a la cara ventral. HE. 200x.
- 42.- Transición. Mucosa revestida por epitelio cilíndrico simple apoyado sobre el corion laxo. HE. 400x.
- 43.- Transición. Porción dorso-lateral de la pared muscular donde se observa las dos capas de la muscular externa separadas por un grueso tabique de tejido conjuntivo por donde corren grandes vasos y nervios a modo de un segundo estrato vascular. HE. 40x.
- 44.- Transición. Capa muscular donde se observa el corte de dos fibras nerviosas entre la circular interna y otra en longitudinal externa. HE. 200x.
- 45.- Cuerpo uterino. Mucosa; se observa el epitelio endometrial biestratificado apoyado en un corion de TCL carente de glándulas endometriales. HE. 400x.
- 46.- Cuerpo uterino. Capa muscular y serosa donde se disponen los ganglios y fibras nerviosas del PFH. HE. 40x.
- 47.- Cuerpo uterino. Serosa, vista magnificada de los ganglios y nervios del PFH donde se observa a los nervios ubicados en el espesor de la muscular interna. HE. 200x.
- 48.- Cuerpo uterino. Detalle de un ganglio y la salida de sus fibras nerviosas junto a dos vasos sanguíneos en la serosa. HE. 200x.
- 49.- Cuerpo uterino. Detalle de un ganglio del PFH donde se observan neuronas de cuerpo grande y otras más pequeñas. 400x.
- 50.- **a.** Tracto reproductor, corte lateral. **b.** Esquema del cérvix, porción vaginal.
- 51.- Cérvix. Mucosa revestida por epitelio estratificado con 2-3 capas celulares. HE. 400x.
- 52.- Cérvix. **a:** Mucosa: epitelio estratificado apoyado en un corion laxo con abundantes fibras colágenas ordenadas paralelas a la superficie; se observan numerosos cortes de capilares. Van Giesson. 400x. **b:** Pliegue de la mucosa del cérvix donde se observa el estroma de TCL con abundancia de fibras colágenas de tonalidad rojiza ordenadas siguiendo la dirección del pliegue. Entre ellas se ubican vasos sanguíneos. Van Giesson. 40x.
- 53.- Cérvix. Mosaico menor aumento. Estructura de la pared de la zona más craneal, con gruesos haces musculares circulares que forman un grueso anillo. Desde la serosa ingresan vasos sanguíneos y nervios. Se observa el corte de un enorme ganglio con somas neuronales grandes y fibras nerviosas derivadas del mismo.
- 54.- Cérvix. Mosaico menor aumento. Estructura de la pared de la zona más caudal donde se destaca una porción del pliegue dorsal y central con una serie de pliegues secundarios del cérvix abriéndose hacia la luz vaginal.
- 55.- Cérvix. Capa muscular ancha, las bandas de fibras musculares se intercalan con bandas conjuntivas. Van Giesson. 40x.
- Cérvix. Pliegue de la mucosa donde se observa el estroma de TCL con abundancia de fibras colágenas de tonalidad rojiza ordenadas siguiendo la dirección del pliegue. Entre ellas se ubican vasos sanguíneos. Van Giesson. 40x.
- 56.- Cérvix. Serosa conteniendo vasos sanguíneos, nervios y ganglios nerviosos. Van Giesson. 200x.
- 57.- Cérvix. Detalle de una porción de un ganglio donde se observan grandes cuerpos celulares de las neuronas. Van Giesson. 400x.
- 58.- Aspecto macroscópico del útero de un otárido prepuberal. Tomado y adaptado de Tedman, 1991.

Vagina

- 59.- **a:** Vista macroscópica de tracto reproductor inferior de *A. australis* adulta. **b:** vista macroscópica del atrio y sus límites anatómicos (adulta).
- 60.- Vagina. Sector craneal y ventral. HE. 40x.



- 61.- Vagina. Detalle de la mucosa superficial del sector craneal. HE. 400x.
- 62.- Vagina. Sector craneal y dorsal. Pared muscular externa ancha junto a serosa con grandes vasos y nervios. HE. 40x.
- 63.- Vagina. Sector caudal. Mucosa con epitelio estratificado, papilas e infiltrado linfocitario. HE. 40x. a) epitelio estratificado y corion con abundantes plasmocitos y macrófago; b) acumulo linfocitario en corion subepitelial, capilares con eritrocitos y vena. HE. 400x.
- 64.- Vagina. Sector caudal. Se observa el corion profundo de la mucosa, bandas de FML circulares y FME en sentido circular y longitudinal. Externamente la adventicia. HE. 200x.
- 65.- Vagina, sector craneal. Corte de numerosos nervios del PFH ubicados en el la serosa. HE. 200x
- 66.- Vagina. Sector de la mucosa craneal y dorsal con dos grupos de adenómeros y conducto excretor en el estroma conjuntivo. HE. 200x. a: detalle de las glándulas. HE. 400x.
- 67.- Uretra. Mucosa revestida por epitelio de transición. HE. 400x.

Vestíbulo

- 68.- Vestíbulo. Sector craneal. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano apoyado en un corion laxo y periféricamente más denso con abundantes vasos sanguíneos. HE. 40x.
- 69.- Vestíbulo. Sector caudal. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano apoyado en un corion laxo y periféricamente más denso con abundantes vasos sanguíneos. HE. 200x.
- 70.- Vestíbulo. Sector craneal. Mucosa del sector craneal. Epitelio estratificado plano, 6-7 capas. Por debajo corion con abundantes plasmocitos. HE. 400x.
- 71.- Vestíbulo. Mucosa del sector caudal. Epitelio estratificado plano, 11-12 capas. Célula de citoplasma pálido que podría corresponder a una célula de Langerhans. HE. 400x.
- 72.- Vestíbulo. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano y acumulo linfocitario en corion subepitelial. Corion con abundantes fibras colágenas muy ordenadas y entre ellas numerosos vasos sanguíneos. Van Giesson. 40x.
- 73.- Vestíbulo. Detalle del corion con venas dispuestas ordenadamente entre las fibras colágenas. HE. 400x.
- 74.- Vestíbulo. Muscular. Capa interna y externa con FML y una intermedia de FME separadas por gruesos tabiques de TC con vasos y nervios en su espesor. En la periferia la adventicia. HE. 40x.
- 76.- Vestíbulo. Haces de FME separadas por tabiques conjuntivos y entre ellos vasos sanguíneos. HE. 400x.
- 77.- Vestíbulo. Haces de FME con su estriación transversal y en la periferia fibras colágenas del estroma. HE. 400x.

Anexos de la pared vestibular

- 78.- Esquema simplificado del corte de la pared vestibular. Se detallan las siguientes estructuras: luz vestibular; lóbulo adiposo; glándulas de Bartholin y conducto excretor; haces de FML; haces de FME; adventicia. No dibujado a escala.
- 79.- Mosaico de las Glándulas de Bartholin. Grupos de alvéolos limitados por bandas de fibras colágenas, varios conductos excretores. Hacia la periferia haces de fibras musculares y externamente la adventicia. Van Giesson. 200x.
- 80.- Pared vestibular y Glándulas de Bartholin. Grupos de alvéolos en la profundidad de la mucosa. Periféricamente la capa muscular y externamente la adventicia. HE. 40x.
- 81.- Glándulas de Bartholin. Detalle de la pared alveolar junto a conducto excretor separados por haces de fibras colágenas. Van Giesson. 400x.
- 82.- Mosaico donde se observa la estructura general del lóbulo adiposo: porción periférica con el "colchón" de adipocitos y la central con un plexo vascular en continuación con vasos del corion de la mucosa que están ubicados hacia la luz del vestíbulo. Van Giesson. 40x.
- 83.- Lóbulo adiposo. Cápsula y sector periférico con adipocitos entre los que transcurren vasos sanguíneos. HE. 40x.
- 84.- Lóbulo adiposo. Sector central con numerosas venas separadas por tabiques de tejido conjuntivo. HE. 40x. a: detalle a mayor aumento de venas limitadas por parte de un tabique conjuntivo. HE. 400x
- 85.- Detalle correspondiente al estroma periférico del lóbulo adiposo con el corte de una delgada fibra nerviosa. HE. 400x.
- 86.- Sector periférico del lóbulo adiposo, se destaca el estroma con fibras colágenas que forman la cápsula y envía tabique al interior; en la periferia se observan vasos sanguíneos y nervios de gran calibre. Van Giesson. 40x.
- 87.- Detalle de un tabique conjuntivo que contiene dos fibras nerviosas en la vecindad de una arteriola junto a los adipocitos. HE. 400x.



Clítoris

88.- Clítoris. Esquema del corte medial. No a escala.

89.- Clítoris. Sector superficial. Epitelio de revestimiento, con melanocitos en el estrato basal; corion con numerosos vasos sanguíneos; porción central con tejido mesenquimático. HE. 40x.

90.- Clítoris. Sector profundo. Corion con numerosos vasos sanguíneos y terminaciones sensitivas. HE. 200x.

91.- Clítoris. Porción profundo del estroma. Detalle de dos fibras nerviosas y terminación sensitiva. HE. 400x.

92.- Clítoris. Adenómeros de las glándulas vestibulares menores en la profundidad del corion. HE. 200x.

93.- Clítoris. Sector anterior, mucosa revestida por epitelio estratificado plano, pigmentado; el pliegue anterior que lo acompaña contiene anexos cutáneos. HE. 40x.

94.- Clítoris. Unidades apopilosebáceas. Folículos pilosos; glándulas sebáceas. HE. 200x.

Atrio

95.- Atrio. Vista panorámica. Mucosa revestida por epitelio estratificado plano queratinizado; corion con unidades apopilosebáceas y fibras pilosas desembocando en la superficie; glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos; grupos de glándulas sudoríparas. HE. 40x. **a:** detalle de terminación nerviosa junto a glándulas sudoríparas. **b:** glándulas sebáceas y conducto excretor de glándula sudorípara. **c:** detalle de glándulas sudoríparas en la profundidad del corion. **a, b y c,** HE. 400x.

96.- Atrio. Vista panorámica. Epitelio de revestimiento fuertemente pigmentado; corion con glándulas sudoríparas y sebáceas. En la profundidad, delgados haces de FME de la capa muscular separadas por bandas de conjuntivo y adipocitos. HE. 40x. **a:** detalle del epitelio estratificado con capa superficial cornificada. **b:** melanocitos entre los queratinocitos del estrato basal. **c:** epitelio de revestimiento pigmentado, melanocitos en el estrato basal y en el tejido conjuntivo subepitelial. **a, b y c:** HE. 400x.