

Tesis Doctoral

Citogenética molecular y reproducción de la tribu Euphractini Winge, 1923 (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia) de Argentina

Luaces, Juan Pablo

2011-12-12

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Luaces, Juan Pablo. (2011-12-12). Citogenética molecular y reproducción de la tribu Euphractini Winge, 1923 (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia) de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Luaces, Juan Pablo. "Citogenética molecular y reproducción de la tribu Euphractini Winge, 1923 (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia) de Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011-12-12.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Citogenética molecular y reproducción de la tribu Euphractini
Winge, 1923 (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia) de Argentina.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Juan Pablo Luaces

Director: Prof. Dra. María Susana Merani
Consejero de estudios: Prof. Dra. Lidia Poggio

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Cromosómica, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires.

Ciudad de Autónoma de Buenos Aires, Argentina 2011.

Agradecimientos

- A la Universidad de Buenos Aires y en particular, a la Facultad de Medicina que me brindó el espacio de trabajo posibilitando mi formación doctoral.
- Al CONICET, Institución Nacional que mediante al subsidio PIP 0204 concedido a mi directora de tesis y las becas internas de post-grado tipo I y II a mi concedidas posibilitaron la concreción de este trabajo.
- A la ANPCyT, que financió y posibilitó, mediante el subsidio PICT38013, la mayor parte de la tarea de campo de esta tesis.
- Al Prof. Dr. A.J. Solari, por ser fuente de consulta e inspiración permanente
- A la Prof. Dra. M.D. Mudry
- A la Prof. Dra. M.I. Pigozzi
- A la Prof. Dra. S. Garagna
- Al Prof. Dr. M. Zuccotti
- Al Lic. L. Rossi
- Al Prof. Dr. HA Marcos
- Al Prof. Dr. P Cética
- A la Dra. R.B. Sciurano
- Al Dr. A. Abba
- A la Dra. A. Faletti
- A la Dra. V. Merico
- A la Dra. P. Rebuzzini
- A la Dra. E. Steinberg
- A la Dra. I. Larripa
- A Fredi Carlini
- A la Lic. C. Yovanovich

- A los estudiantes, E. Romero, C. Meyer y V. Baldomá
- Al Lic. C. Martinez Olivarez
- Al Dr. J. Correa
- A las Lic. M. Belli y G. Vigone
- A Mario Zannoni
- A la Lic. Cristina Deparci
- A Lida
- A Jorge Austin
- A Ana María Andreta
- Al Lic. de Elias
- A José
- A mis amigos
- A mi familia grande (A mi tía Mari)
- A mi Mamá, a mi Papá y a Nati.
- A Luz

“Y por supuesto a los armadillos”

Citogenética molecular y reproducción de la tribu Euphractini, Winge, 1923 (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia), de Argentina.

Los armadillos de la tribu Euphractini son un grupo de mamíferos xenartros, que se encuentran clasificados en 5 especies cuya distribución ocurre principalmente en la Argentina (salvo *Euphractus sexcinctus*). Por su condición filogenética basal en placentados, su biología requiere ser cuidadosamente revisada y estudiada. Se caracterizó citogenéticamente y desde el punto de vista reproductivo a Euphractini, para poder esclarecer posibles mecanismos de aislamiento reproductivo (MAR) acontecidos durante su historia evolutiva:

1). MAR post-cigóticos: mediante la caracterización citogenético-molecular de: 223 ejemplares (131 machos y 92 hembras) de *Chaetophractus villosus*, $2n=60$ y $NF=88$; 103 ejemplares de *Chaetophractus vellerosus*, en sus dos distribuciones disyuntas, $2n=62$ y $NF=88-90$ [48 ejemplares (28 machos y 20 hembras) de la distribución principal, incluyendo los márgenes de la misma, y 55 ejemplares (28 machos y 27 hembras) de la distribución secundaria]; 14 ejemplares (4 machos y 10 hembras) de *Zaedyus pichiy*, $2n=62$ y $NF=98$; y 7 ejemplares (4 machos y 3 hembras) de *E. sexcinctus*, $2n=58$ y $NF=106$.

2). MAR precigóticos: con el estudio de la morfología del tracto genital masculino en machos de *Ch. villosus*, y de la fisiología reproductiva, con estudio del ciclo reproductivo en machos de *Ch. villosus* y en hembras de *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*.

Palabras clave: Armadillos, Citogenética Molecular, Reproducción, Ciclo Reproductivo

**Molecular cytogenetics and reproduction of the tribe Euphractini
Winge, 1923 (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia) from Argentina.**

The armadillos of the tribe Euphractini are a group of xenarthrous mammals, which divided in five species, are mainly distributed in Argentina (except for *Euphractus sexcinctus*). Due to its basal phylogenetic position within placentals, its biology has to be carefully analysed. Cytogenetic and reproductive characterization of Euphractini were carried out in order to bound reproductive isolation mechanisms (RIM) that occurred during its evolutive history:

- 1). Post-mating RIM: throughout a molecular cytogenetic study of the group in: 223 individuals (131 males and 92 females) of *Chaetophractus villosus*, $2n = 60$ and $NF = 88$; 103 individuals of *Chaetophractus vellerosus* in its two disjunct distributions, $2n = 62$ and $NF = 88-90$ [48 specimens (28 males and 20 females) of the main distribution, including its margins, and 55 specimens (28 males and 27 females) of the secondary distribution]; 14 individuals (4 males and 10 females) *Zaedyus pichiy*, $2n = 62$; and $NF = 98$ and 7 specimens (4 males and 3 females) *E. sexcinctus*, $2n = 58$ and $NF = 106$.
- 2). Pre-mating RIM: throughout the study of the reproductive morphology, of the male genital tract in *Ch. villosus* and physiology, with the study of the reproductive cycle in males of *Ch. villosus* and in females of *Ch. villosus* and *Ch. vellerosus*.

Keywords: Armadillos, Molecular Cytogenetics, Reproduction, Reproductive Cycle

Introducción.....	2
1. El superorden Xenarthra	2
1.1. De los edentados a los Xenarthra	3
1.2. Biología de Xenarthra	6
1.2.1. La vértebra xenartra	6
1.2.2. Temperatura corporal y metabolismo.....	6
1.2.3. Poliembrionía y retraso de implantación	6
1.2.4. Morfología espermática	7
1.2.5. Estado de conservación	7
1.2.6. Enfermedades y parásitos:	8
1.2.7. Extracción de sangre en armadillos	9
1.3. Los armadillos (orden Cingulata)	10
1.4. Los armadillos eufractinos (tribu Euphractini)	11
1.4.1. <i>Chaetophractus villosus</i> Desmarest, 1804	11
1.4.2. <i>Chaetophractus vellerosus</i> Gray, 1865	12
1.4.3. <i>Chaetophratus nationi</i> Thomas, 1894.....	14
1.4.5. <i>Euphractus sexcinctus</i> Linnaeus, 1758	16
2. Citogenética	18
2.1. Rearreglos cromosómicos y especiación	18
2.2. Cariotipo y especiación.....	19
2.4. Antecedentes Citogenéticos en Dasypodidae y en Xenarthra.....	20
3. Reproducción.....	22
3.1. Estudios anatómicos e histológicos	23
3.1.1. Morfología del tracto reproductor masculino en Euphractini	23
3.1.2. Morfología del tracto reproductor femenino en Euphractini	25
3.2. Estudios fisiológicos	25
3.2.1. Estudio del ciclo reproductivo en los machos	26
3.2.2. Estudio del ciclo reproductivo de las hembras	27
4. Objetivos e hipótesis de trabajo.....	28
4.1. Objetivos generales.....	28
4.2. Objetivos particulares	28
4.3. Hipótesis de trabajo	29
Materiales y métodos.....	31
1. Citogenética	31
1.1. Línea somática	31
1.1.1. Obtención de material	31
1.1.2. Extracción de sangre	32
1.1.3. Cultivo de sangre	33
1.1.4. Sacrificio del cultivo	34
1.1.5. Preparación de los extendidos.....	34
1.1.6. Observación y selección de las metafases	35
1.1.7. Bandas G.....	35
1.1.8. Técnicas de Bando C.....	35
1.1.9. Técnica para la detección y ubicación del NOR	36
1.1.10. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de campo claro.....	36
1.1.11. Medidas y confección del ideograma	36
1.1.12. Hibridación in-situ fluorescente (FISH).....	38
1.2. Línea germinal	38
1.2.1. Obtención del material	38
1.2.2. Obtención de los preparados meióticos.....	39
1.2.3. Microextendidos de complejos sinaptonémicos.....	40
1.2.4. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de fluorescencia	41
2. Biología Reproductiva	41
2.1. Estudios de morfología del tracto reproductor	41
2.2. Estudio del ciclo reproductivo en machos	42
2.2.1. Obtención del material	42

2.2.2. Recuento de espermatozoides	43
2.3. Estudio del ciclo reproductivo en hembras	43
2.3.1. Obtención del material y puesta a punto de la metodología	43
2.3.2. Análisis hormonal	45
2.3.3. Análisis de datos	46
Resultados	48
1. Extracción de sangre	48
2. Citogenética	51
2.1. <i>Chaetophractus villosus</i>	51
2.1.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie	51
2.1.2. Línea somática - reordenamientos cromosómicos en <i>Ch. villosus</i>	56
2.1.3. Línea germinal - Evans	57
2.1.4. Línea germinal – técnica de complejo sinaptonémico	58
2.2. <i>Chaetophractus vellerosus</i>	61
2.2.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie en sus dos distribuciones	61
2.2.2. Línea germinal - Evans	67
2.2.2. Línea germinal – Técnica de complejo sinaptonémico	68
2.3. <i>Zaedyus pichiy</i>	70
2.3.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie	70
2.3.2. Línea germinal - Evans	74
2.3.3. Línea germinal – técnica de complejo sinaptonémico	75
2.4. <i>Euphractus sexcinctus</i>	77
2.4.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie	77
2.4.2. Línea germinal - Evans	82
2.4.2. Línea germinal – técnica de complejo sinaptonémico	83
2.5. Detección de secuencias teloméricas en <i>Euphractini</i>	84
3. Reproducción	85
3.1. Morfología del tracto reproductor	85
3.1.1. Estudios anatómo-histológicos del tracto reproductor masculino de <i>Ch. villosus</i>	85
3.1.2. Histología y estructura fina del epitelio seminífero de <i>Ch. villosus</i> -caracterización del ciclo del epitelio seminífero	90
3.2. Fisiología reproductiva	96
3.2.1. Ciclo reproductivo en machos de <i>Ch. villosus</i>	96
Tabla 5: Estado reproductivo de machos de <i>Ch. villosus</i>	100
3.2.2. Ciclo reproductivo en hembras de <i>Ch. villosus</i> y <i>Ch. vellerosus</i>	101
Discusión.....	105
1. La posición filogenética de Xenarthra	105
2. Citogenética	108
3. Reproducción	114
3.1 Morfología de tracto reproductor en machos de <i>Ch. villosus</i>	114
3.2 Fisiología de la reproducción:	116
3.2.1. Ciclo reproductivo en machos de <i>Ch. villosus</i>	116
3.2.1. Ciclo reproductivo en hembras de <i>Ch. villosus</i> y <i>Ch. vellerosus</i>	118
Bibliografía.....	124
Anexo	142
1. Soluciones	142

Introducción

Introducción

1. El superorden Xenarthra

El superorden Xenarthra se encuentra actualmente representado por 31 especies divididas en dos órdenes: Cingulata con los armadillos (familia Dasypodidae) y Pilosa con dos subórdenes: Phyllophaga (los perezosos, con las familias Bradypodidae y Megalonychidae) y Vermilingua (los osos hormigueros, con las familias Myrmecophagidae y Cyclopedidae, Wetzel 1985a, Vizcaíno 1995, Anderson y Handley 2001, ver figura 1).

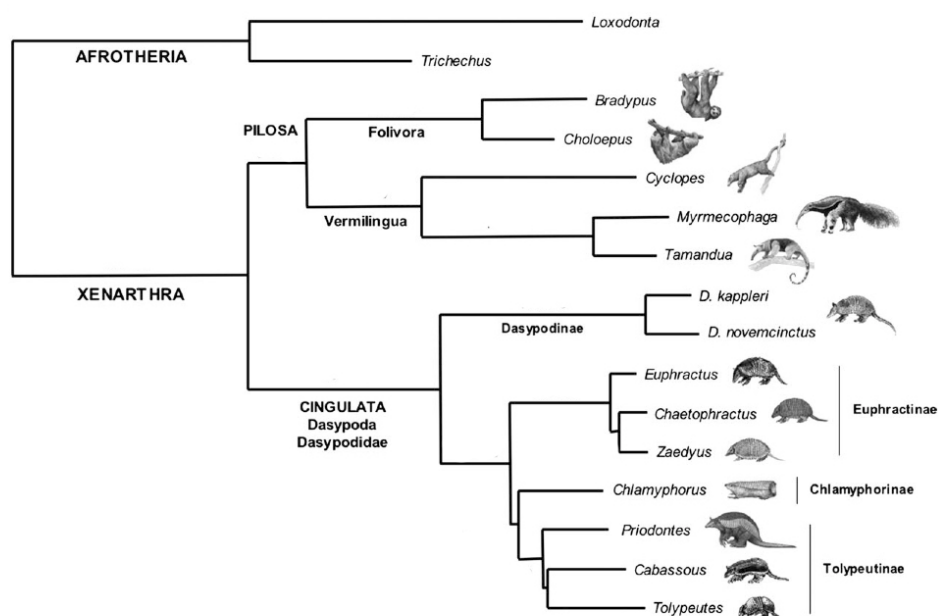


Figura 1: Filogenia molecular de Xenarthra obtenida de Moller-Krull et al. (2008) donde pueden verse los principales linajes del grupo.

1.1. De los edentados a los Xenarthra

Entender la posición filogenética de los Xenarthra resulta casi fundamental para explicar la diversidad y peculiaridad de su biología.

Cuando Linneaus (1758) organizó los mamíferos en ocho órdenes, los osos hormigueros y meleros y los perezosos se encontraban junto con elefantes y pangolines en el Orden Bruta. Los armadillos, cerdos hormigueros, comadrejas y algunos insectívoros en el orden Bestiae. El primero que utilizó Edentata como orden fue Cuvier (1798), aunque el término Edentati fue utilizado previamente por Vicq D'Azur (1772). Edentata contenía a los perezosos, los osos hormigueros y meleros, los armadillos, los pangolines y los cerdos hormigueros. En 1872 Huxley retiró a los pangolines y a los cerdos hormigueros del orden y a partir del siglo dieciocho, a raíz de la profundización en el estudio de los fósiles, se realizaron nuevas incorporaciones al grupo: como los perezosos terrestres, agregados en 1796, y los gliptodontes, en 1838 (Simpson 1945).

Si bien la palabra “xenarthra” fue utilizada por Gill en 1872 como un adjetivo, el primero en utilizar Xenarthra como un taxón formal es Cope en 1889. En 1918 Matthew agrega a los Palaenodonta y el grupo queda así compuesto por: palaenodontos, armadillos, gliptodontes, perezosos arborícolas, perezosos terrestres y osos hormigueros y meleros. Simpson (1945) coincide con la descripción de Scott (1937) en dividir el orden en dos subórdenes: Palaenodonta y Xenarthra, designando dos infraórdenes para Xenarthra: Pilosa (cubiertos de pelos) y Cingulata (con caparazón). En 1970, Emry, en su descripción de un pangolín del Oligoceno, argumenta que los palaenodontos son más recientes que los más antiguos Xenarthra; y asevera que sus similitudes son debidas a fenómenos de convergencia, concluyendo

que Palaenodonta debía ser considerado ancestral a los pangolines y no a los xenartros. Así los palaenodontos (familias: Metacheiromyidae, Epoicotheriidae y Manidae) pasaron a formar parte del orden Pholidota.

En 1985, Glass propone que todos los edentados vivientes y fósiles están caracterizados por una vértebra xenartra; por un isquion articulado con la columna vertebral; y por una escápula con procesos coracoides y acromio extraordinariamente desarrollados. Por lo tanto, dada la homogeneidad taxonómica, la restricción zoogeográfica, el hábitat esencialmente neotropical y la disponibilidad de este nombre válido en función de una única característica esquelética, se propuso la utilización de *Xenarthra* como nombre ordinal (Glass 1985).

El primero que sustentó la monofilia de *Xenarthra* mediante un análisis filogenético fue Engelmann (1985); que *a posteriori* fue profundizado con la inclusión de nuevos caracteres (Gaudin 1995, 1999, 2004, Gaudin et al. 1996, McDonald 2003a,b, Rose et al. 2005).

Con el advenimiento de los estudios de filogenia molecular, nuevas evidencias se sumaron a las anteriores, sosteniendo la existencia de un ancestro común para el grupo, y una posición basal para los *Xenarthra* dentro de los mamíferos euterios (de Jong et al. 1985, Sarich 1985, Madsen et al. 2001, Murphy et al. 2001, Delsuc 2001, 2003,). De Jong et al. (1985), mediante el aislamiento y secuenciación de los aminoácidos de la proteína α -cristalina del cristalino, propusieron un origen monofilético para los perezosos y los osos hormigueros asignándole también una posición basal al orden dentro de Eutheria. Sarich (1985), midiendo distancias inmunológicas, observó que la albúmina de los perezosos, osos hormigueros y armadillos era muy diferente entre ellos, sugiriendo una separación de 75 a 80 millones de años entre los linajes principales de xenartros vivientes. Ya en 2001,

Murphy et al., secuenciando dieciocho genes de 64 especies, ampliaron el estudio filogenético molecular y lograron definir 4 grandes clados para los Eutheria (i.e. mamíferos placentados): Afrotheria, Euarchontoglires, Laurasiatheria y Xenarthra. Quedando abierta la discusión acerca de cual es el grupo basal de los mamíferos placentarios: si es Afrotheria, Xenarthra o ambos formando un clado hermano a Eutheria denominado Paratheria. Las relaciones dentro del orden, fueron estudiadas por Delsuc et al. (2001), mediante el secuenciamiento de regiones nucleares y mitocondriales, demostrando que la divergencia entre Pilosa y Cingulata acaeció hace 63 millones de años. A su vez estimaron la divergencia de los Xenarthra respecto de otros placentarios en aproximadamente 106 millones de años y para Cingulata, distinguieron tres subfamilias: Dasypodinae, Tolypeutinae y Euphractinae. En 2004, Delsuc et al. redefinieron las relaciones entre las subfamilias de dasipodidos e indicaron además, que los ordenes Xenarthra y Afrotheria podrían tener un antecesor común al final del Cretácico, cuando África, América del Sur, Antártida y Australia formaban un antiguo supercontinente denominado Gondwana. A partir de estas nuevas relaciones filogenético-moleculares, Gardner en el año 2005, elevó el *status* taxonómico de Xenarthra a superorden, y de esta forma Pilosa y Cingulata adquirieron el *status* de orden.

Como fue mencionado al principio del capítulo: actualmente, el superorden Xenarthra se encuentra representado por 31 especies divididas en dos órdenes: Cingulata con los armadillos (Familia Dasypodidae) y Pilosa con los osos hormigueros (Familias Myrmecophagidae y Cyclopedidae) y los perezosos (Bradypodidae y Megalonychidae) (Wetzel 1985a, Vizcaíno 1995, Anderson y Handley 2001).

1.2. Biología de Xenarthra

1.2.1. La vértebra xenartra

El carácter más conspicuo que agrupa a los Xenarthra es la presencia de articulaciones xenartrales intervertebrales (Engelmann 1985, Patterson et al. 1992, Gaudin 1999) y es el que da origen a su nombre (xenos= extraño, y arthros= articulación).

1.2.2. Temperatura corporal y metabolismo

Los xenartros poseen bajos niveles de metabolismo basal, alta conductividad térmica y una temperatura corporal que varía entre 34,1 °C y 35,5 °C, (Roig 1971, McNab, 1985). Una posible explicación para este hecho es que los armadillos pueden almacenar abundantes reservas de grasa (McNab, 1985). Esto está relacionado con el consumo de alimentos con bajo contenido calórico como hojas, hormigas y termitas (McNab, 1985) dado sus hábitos fosoriales (armadillos) y arborícolas (perezosos y osos hormigueros). De todas las especies de xenartros vivientes, los armadillos son los únicos que se encuentran representados en ambientes de climas rigurosos como los del sur de América del Sur y centro-sur de América del Norte (Nowak 1999). Mientras que los osos hormigueros y perezosos, arborícolas, se encuentran limitados a regiones tropicales de América (Nowak 1999).

1.2.3. Poliembrionía y retraso de implantación

Hace más de un siglo, los estudios de un argentino, Miguel Fernández (1909), describieron el mecanismo de poliembrionía monocigótica en la mulita, *Dasypus*

hybridus. La misma consiste en la formación de 4 a 12 crías genéticamente idénticas a partir de un solo óvulo. Esta línea de estudios fue continuada muchos años después por autores norteamericanos en la mulita de nueve bandas, *Dasyopus novemcinctus* (Galbreath 1985, Prodöhl et al. 1998).

A su vez estos autores describieron otro fenómeno interesante en *D. novemcinctus*, el retraso de implantación, donde el embrión puede quedar en estado latente hasta dos años en el útero materno (Talmage y Buchanan 1954, Weir 1973, Galbreath 1985, Storrs 1989, Prodöhl et al. 1998).

1.2.4. Morfología espermática

El espermatozoide, una célula extremadamente especializada, presenta variaciones morfológicas entre los distintos taxa de mamíferos. El patrón propuesto como el tipo básico ancestral, en la mayoría de las especies, presenta una cabeza oval y un largo promedio de 70 μm . Formas derivadas se encuentran principalmente en roedores aunque una importante diversificación evolutiva, ha sido recientemente descrita en los espermatozoides de armadillos. Presentando peculiares morfologías, de cabezas muy grandes y extremadamente finas con forma de cuchara, únicas en Mammalia (Cetica et al. 1993, 1997, 1998).

1.2.5. Estado de conservación

Dada la degradación de hábitat que actualmente ocurre en forma corriente en Sudamérica, muchas especies de mamíferos encuentran comprometida su supervivencia. No hacen excepción los Xenarthra, cuyos principales representantes se encuentran en su mayoría amenazados. Con especies que recibieron un estado de

conservación vulnerable según la IUCN (“International Union for Conservation of Nature” o “Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza”) como el oso hormiguero (*Myrmecophaga tridactyla*, Miranda y Medri 2011), el quirquincho andino (*Chaetophractus nationi*) o el tatu carreta (*Priodontes maximus*, Superina et al. 2010).

Actualmente los armadillos son cazados como recurso alimenticio, atropellados por vehículos y perseguidos por ser considerados plagas (Abba et al., 2007, Abba, 2008; Abba y Superina, 2010), por lo que en muchas regiones de América del Sur sus poblaciones se encuentran sobreexplotadas (como recurso alimenticio) y corren riesgo de extinciones locales.

Algunas especies de armadillos como el mataco bola (*Tolypeutes matacus*) o el oso melero (*Tamandua tetradactyla*) son utilizadas como fuente de proteínas por poblaciones indígenas que se alimentan de carne de monte (Abba y Superina 2010). Otras especies como el armadillo *Ch. nationi* son utilizadas para la realización de elementos artesanales y musicales, en el noroeste Argentino y en Bolivia (Abba y Superina 2010).

El peludo (*Chaetophractus villosus*) es cazado en zonas rurales aledañas a la ciudad de Buenos Aires para su venta en ferias ilegales. Constituye así, un modo de subsistencia a cazadores contratados en campos donde, dada las pérdidas económicas que ocasiona, es considerado vulgarmente plaga (Massoia 1970).

1.2.6. Enfermedades y parásitos:

Los xenartros son susceptibles a numerosas enfermedades y, como otros animales de vida libre, pueden ser y son reservorios de agentes patógenos para los humanos, convirtiéndose en interesantes modelos experimentales en la investigación biomédica.

Son hospedadores de algunos protozoarios hemoflagelados como *Leishmania sp.* (Shaw 1985) (agente etiológico de la leishmaniasis, enfermedad que se caracteriza por ocasionar lesiones viscerales y cutáneas) y *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas, caracterizada por provocar lesiones en el músculo cardíaco) (Shaw 1985, Yeo et al. 2005). Los armadillos del género *Dasypus*, constituyen el único modelo experimental para el estudio de la infección causada por el bacilo de Hansen (*Mycobacterium leprae*, McDonough 1997). En *Ch. villosus* se detectó la presencia de *Brucella sp.*, agente etiológico de la brucelosis, la cual según la especie, produce abortos en bovinos (*Brucella abortus*) y caprinos (*Brucella melitensis*) en el último tercio de la gestación (Kin 2010).

D. novemcinctus es hospedador y/o reservorios natural de algunos hongos patógenos dermatofitos, como por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis* (agente etiológico de la Paracoccidiomicosis o Blastomicosis sudamericana, micosis sistémica, que afecta principalmente los órganos linfáticos y los pulmones), siendo este armadillo el único modelo biomédico donde se consigue el aislamiento de este hongo (Bagagli et al. 1998, Corredor et al. 2004).

1.2.7. Extracción de sangre en armadillos

Algunos aspectos de la peculiar anatomía de los armadillos, relacionada en parte con sus hábitos fosoriales, determinan que la toma de muestras de sangre a campo sea sumamente dificultosa. Si bien han sido descriptas técnicas de obtención de sangre en *D. novemcinctus*, las mismas se realizaron en condiciones de cautiverio y en algunos casos utilizando sedación (Herbst y Webb 1988). Para realizar estudios citogenéticos, la calidad de la muestra de sangre es determinante, siendo condicionada por: 1- La gran diversidad de tamaños entre las especies de armadillos y la estrecha correlación

entre el volumen máximo de extracción, el tamaño de los vasos sanguíneos y el peso del animal. 2- Factores necróticos y contaminantes biológicos como así también preservación de la morfología y viabilidad celular, de vital importancia en estudios como el cultivo celular. 3- El uso de anestésicos y su posible interferencia en la utilización experimental de la sangre.

1.3. Los armadillos (orden Cingulata)

Los Cingulata, comprenden tres grandes grupos: los armadillos (vivientes y fósiles), los gliptodontes y los pampaterios (ambos extintos). En el orden se distinguen dos superfamilias, Dasypodidea (con Dasypodidae y Peltephilidae) y Gliptodontidea (con Gliptodontidae y Pampateridae). Los Dasypodidae, comprenden a los únicos cingulados vivientes, que se encuentran agrupados en 8 géneros y 21 especies (Wetzel 1985a, Nowak 1999, Parera 2002), pocas en relación al gran registro fósil de la familia que evidencia una diversidad mucho mayor (Scillato-Yané 1980, Mones 1986, McKenna y Bell 1997). A su vez, los formas vivientes se encuentran subdivididas en: 3 subfamilias, Dasypodinae, Euphratinae y Tolypeutinae (McKenna y Bell 1997); y en 5 tribus (Dasypodini, Euphractini, Tolypeutini, Priodontini y Chlamiphorini); sustentadas por numerosos caracteres morfológicos (Wetzel 1985, McKenna y Bell 1997), moleculares (Möller-Krull 2007) y citológicos (como la morfología espermática, Cetica et al., 1993, 1997, 1998).

1.4. Los armadillos eufRACTINOS (tribu Euphractini)

Los representantes vivientes de la tribu Euphractini, se encuentran bien representados dentro del territorio argentino y la mayoría de sus especies son casi exclusivas del mismo, se encuentran organizados en 3 géneros y 5 especies: El género *Chaetophractus* que comprende a las especies *Ch. villosus*, *Ch. vellerosus* y *Ch. nationi*; el género *Zaedyus* con un único representante *Z. pichiy* y el género *Euphractus* que comprende a *E. sexcinctus* (Wetzel 1985a)

1.4.1. Chaetophractus villosus Desmarest, 1804

El peludo o quirquincho grande *Chaetophractus villosus* (Fig. 2), posee una de las distribuciones más amplias de los armadillos vivientes (Fig. 7a, Wetzel 1982, Nowak 1991, Redford y Eisenberg 1992, Wilson y Reeder 1993), que se extiende desde el Gran Chaco de Bolivia y Paraguay hasta el sur de la provincia de Santa Cruz en Argentina y, las provincias de Bío Bío y Magallanes, en Chile (Fig. 7a, Wetzel 1985, Tamayo 1973, Azize Atallah 1975, Wilson y Reeder 1993). El límite austral de su distribución fue recientemente extendido al registrar su presencia en el norte de la Isla Grande de Tierra del Fuego (Fig. 7a, Poljak et al. 2007). Su estado de conservación es de “preocupación menor” de acuerdo a lo establecido por la IUCN (Abba y Superina 2010).

Ch. villosus habita una gran variedad de ambientes con climas y recursos alimenticios diversos. Sus hábitos fosoriales le permiten afrontar fluctuaciones de temperatura ambiental (Mc Nab 1979, 1985), y su dieta poco especializada (Redford 1985), le confieren una notable capacidad adaptativa a diferentes eco-regiones.



Figura 2: Ejemplar de *Ch. villosus* macho de la localidad de Magdalena, pcia. de Buenos Aires.

1.4.2. *Chaetophractus vellerosus* Gray, 1865

El piche llorón *Chaetophractus vellerosus* (Fig. 3), posee una amplia distribución desde el centro y sur de Bolivia, oeste de Paraguay (Wetzel 1982) hasta las provincias de La Pampa y Buenos Aires en Argentina (Fig. 7b, Crespo 1974, Carlini y Vizcaíno 1987, Abba et al. 2007, Abba & Cassini 2010). La distribución de *Ch. vellerosus* es discontinua, ya que además de la mencionada distribución que se extiende por el Gran Chaco y el centro de la Argentina (que en adelante llamaremos “**principal**”) posee una distribución secundaria (que en adelante llamaremos “**secundaria**”) que se extiende en la región costera de la provincia de Buenos Aires a la altura de la Bahía de San Borombón. Por lo tanto, *Ch. vellerosus* presenta dos distribuciones disyuntas separadas entre sí por mas de 500 km (Crespo 1974, Carlini y Vizcaíno, 1987). Esta distribución discontinua puede ser entendida como un relictos de una paleodistribución

(Soibelzon et al. 2006), que comprendía el actual territorio de la provincia de Buenos Aires durante fines del Pleistoceno y parte del Holoceno. Según la IUCN, el estado de conservación de este armadillo es de “preocupación menor”, aunque se supone que la caza indiscriminada y la degradación de hábitat amenaza sus poblaciones pudiendo ameritar una categoría de conservación mas rigurosa (Abba y Superina 2010b).

En general, *Ch. vellerosus* tiene una dieta carnívora-omnívora (Redford 1985) con variaciones estacionales en la composición de acuerdo a la disponibilidad de los diferentes recursos alimentarios (Soibelzon et al. 2007). Al igual que el peludo, el piche llorón presenta un cambio estacional en su período de actividad entre el invierno y el verano, siendo diurno durante el primero y nocturno durante el segundo (Greggor 1974, 1980b, 1985).



Figura 3: Ejemplar de *Ch. vellerosus* macho de la localidad de Magdalena, pcia. de Buenos Aires.

1.4.3. *Chaetophractus nationi* Thomas, 1894

El quirquincho andino *Chaetophractus nationi* (Fig. 4) es el único armadillo que habita zonas frías a gran altitud (Mc Nab 1980). En Argentina, los datos de distribución son insuficientes (Vizcaíno et al. 2006), siendo considerada como endémica de la Puna, con una distribución que abarca áreas puneñas de Bolivia (Anderson 1997), norte de Argentina (Carrizo et al. 2005; Vizcaíno et al. 2006) y norte de Chile (Abba et al. 2008, Tamayo 2000). A escala mundial esta listada como “vulnerable” por la IUCN dado que sus poblaciones han declinado en más de 30% en los últimos 10 años, debido a la gran explotación de suelos y por estar sujeta a una fuerte presión de caza con fines culturales y artesanales, además de la destrucción de su hábitat (Superina y Abba 2010).

La identidad sistemática de la especie ha sido objeto de diferentes y numerosas conjeturas debido a la gran similitud que presenta con *Ch. vellerosus* y algunos autores, consideran ciertas características morfológicas como suficientes para separar las especies (Anderson 1997; Carrizo et al. 2005). *Ch. nationi* es una especie de tamaño intermedio entre *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus* que pesa alrededor de 1,4 a 2,0 kg y mide 375-420 mm con una cola de 110 a 130 mm (Anderson 1997; Carrizo et al. 2005).



Figura 4: Ejemplar de *Ch. nationi*. Foto obtenida de la tesis de Perez Zubieta (2008)

1.4.4. *Zaedyus pichiy* Desmarest, 1804

Zaedyus pichiy, conocido vulgarmente como pichi (Fig. 5), posee una distribución que se extiende hasta altitudes de 2500 mts. desde las provincias de Mendoza, San Luis y Buenos Aires, hasta el sur del río Santa Cruz en Argentina y el Estrecho de Magallanes en Chile (Meritt y Benirschke 1973, Wetzel 1985b) (Fig 7c). A nivel mundial su estatus de conservación de esta especie es “casi amenazado” debido a la gran presión de caza sobre sus poblaciones, presentando también extinciones locales (IUCN, Superina y Abba 2010b). Sus hábitats están caracterizados por ser áridos y con suelos arenosos, como los de la estepa patagónica en el sur de Mendoza, Neuquén y el monte del Chaco desierto en su extremo norte. *Z. pichiy* se caracteriza por ser pequeño y peludo, distinguiéndose de los demás eufractinos por sus orejas cortas y por una línea clara que se extiende desde la primera banda móvil hasta el extremo del escudo pélvico. Sus escudos, escapular y pélvico están separados por un promedio de siete bandas (rango de 6 a 9) y posee una banda móvil completa presente en el borde anterior del escudo escapular (Wetzel 1985a); en su caparazón, el color varía de amarillo pálido a casi negro.



Figura 5: Ejemplar de *Z. pichiy* hembra de Catriel, pcia. de Río Negro.

1.4.5. *Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758

Euphractus sexcinctus, conocido también como “gualacate mayor” (Fig. 6), se encuentra distribuido en las sabanas al sur de Surinam y las adyacentes de Pará (Perú), el Mato Grosso y las tierras altas de Brasil, Uruguay, Paraguay, sudeste de Bolivia y el norteste de Argentina (Wetzel 1982). Su estado de conservación según la IUCN es de “preocupación menor” (Medri y Superina 2010).

Es la especie de mayor porte entre los Euphractini, pudiendo medir mas de 40 cm (desde la cabeza hasta el cuerpo) y su masa corporal varia de 3,2 a 6,5 kg (Redford y Wetzel 1985). Posee una dieta omnívora que incluye desde materia vegetal, invertebrados y pequeños vertebrados (Redford 1985). Presenta una actividad principalmente diurna y ocasionalmente puede ser activo de noche.



Figura 6: Ejemplar de *E. sexcinctus* macho perteneciente al zoológico de Temaiken, pcia. de Buenos Aires que originalmente procede de la pcia. de Corrientes .

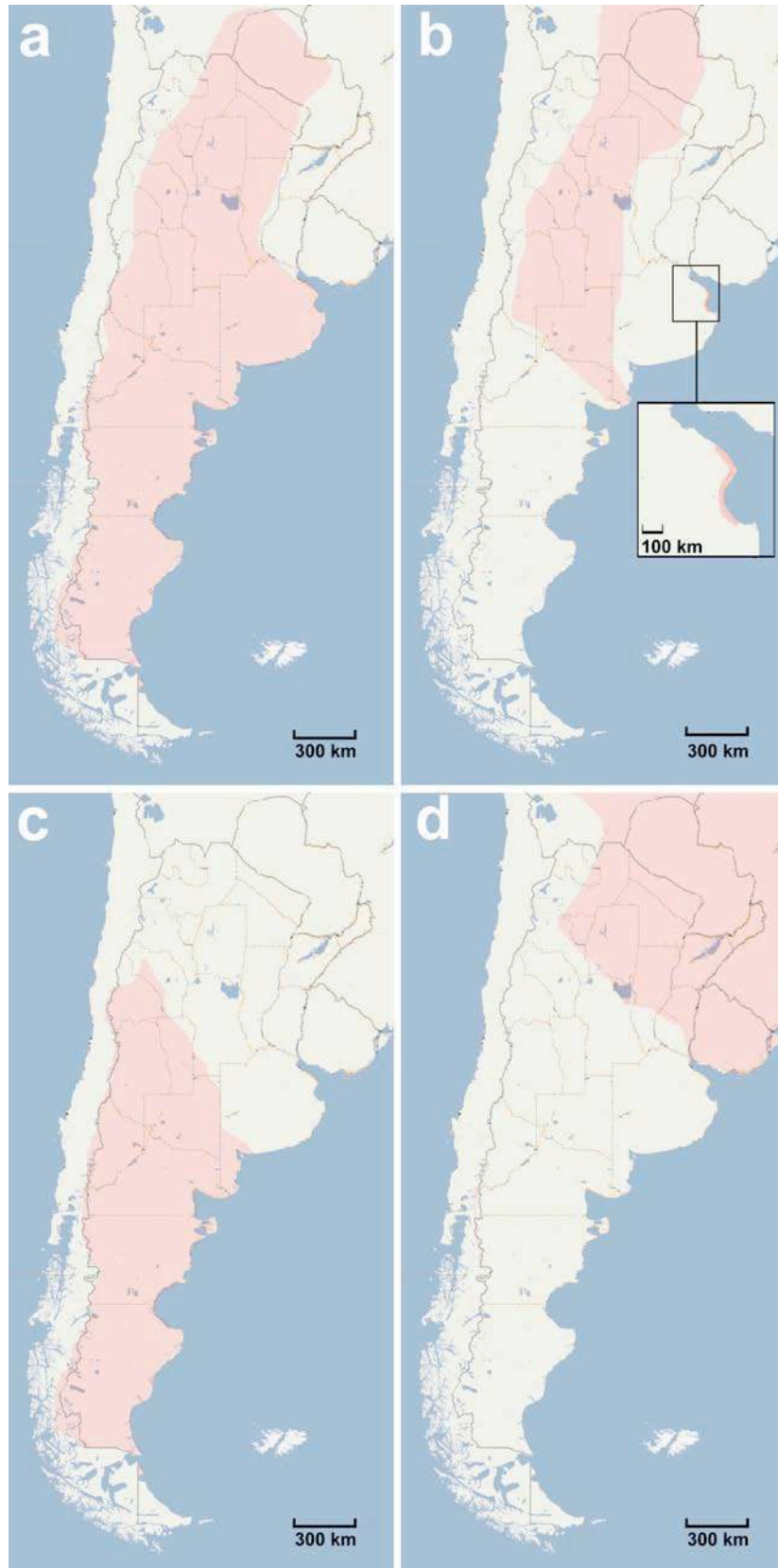


Figura 7: Distribución de los Euphractini estudiados en esta tesis: **a.** *Ch. villosus*; **b.** *Ch. vellerosus*; **c.** *Z. pichi*; **d.** *E. sexcinctus*. La distribución de *Ch. vellerosus* y *E. sexcinctus* se extiende más al norte fuera de los límites de la Argentina.

2. Citogenética

2.1. Rearreglos cromosómicos y especiación

Desde que Sutton (1902) y Boveri (1904) propusieron que los cromosomas son los portadores del material hereditario, numerosas evidencias han demostrado que el número, la estructura y la arquitectura cromosómica tienen un significado funcional en el mantenimiento de la integridad genómica y el aislamiento reproductivo de las especies (White 1977, Karlin y Nevo 1986, King 1993). Los rearrreglos cromosómicos (inversiones, translocaciones, fusiones y fisiones, entre otros) contribuyen a la reorganización del genoma de mamíferos, generando nuevas formas cromosómicas, fuente de variabilidad sobre la que puede actuar la selección natural (King 1993, Robinson y Ruíz Herrera 2010). Estos rearrreglos, involucran tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales, pudiendo o no tener efecto visible en el fenotipo y pudiendo o no ser especiogénicos.

Considerando el concepto biológico de especie (Mayr 1942), en ausencia de mecanismos precigóticos de aislamiento reproductivo (Reig 1984), las diferencias cromosómicas entre especies cercanas o subespecies podrían generar mecanismos de aislamiento reproductivo post-cigóticos debido a una disminución de la fertilidad de los híbridos cariotípicos (heterocigotas para un reordenamiento cromosómico). De los posibles cambios cromosómicos, sólo aquellos que causan efectos heteróticos negativos (es decir, que disminuyen el desempeño de los heterocigotos para estos arreglos) podrían tener un papel protagónico en el proceso especiogénico. Las traslocaciones recíprocas, inversiones pericéntricas y paracéntricas y los rearrreglos Robertsonianos (fusiones y fisiones céntricas) ilustran estas posibilidades (King 1987). Ya que los heterocigotas para inversiones, sean paracéntricas o pericéntricas, pueden presentar formación de bucles en la meiosis. Si esto ocurre, eventos de

recombinación dentro del bucle, serán resultado de cromatidas con duplicaciones y deleciones, y por consiguiente gametos desbalanceados. Sin embargo, si ocurre una segregación balanceada de los productos meióticos en los heterocigotas para estos reordenamientos, los mismos no constituirían un mecanismo de aislamiento reproductivo post-cigótico.

2.2. Cariotipo y especiación

Sólo a partir los años 60, el estudio de los cromosomas ha contribuido realmente a resolver los problemas evolutivos, permitiendo diferenciar poblaciones, razas y especies en vertebrados (White 1973). Ya que cuando la problemática en este campo fue revisada por Mathey en 1949 no existían, en vertebrados, claros estudios citogenético-poblacionales, los polimorfismos cromosómicos no habían sido seriamente estudiados y los rearrreglos no tenían el rol que luego les sería asignado para justificar la formación de razas y especies en vertebrados. A partir de los años 1950, el panorama cambió radicalmente y se describió el cariotipo en más de 1000 especies de mamíferos (aproximadamente un cuarto del total).

Las relaciones de los organismos pueden ser redefinidas a partir de la información brindada por los cromosomas, con la comparación detallada de los cariotipos de especies relacionadas entre sí (Reig, 1984). A su vez, la identificación precisa de los cromosomas enteros o de los segmentos cromosómicos que participan en los reordenamientos, resulta muy importante para definir especies o subespecies desde la citogenética.

Es importante distinguir entre dos tipos de variaciones cromosómicas en una especie: a). los polimorfismos cromosómicos intrapoblacionales, producto de

alteraciones o rearrreglos estructurales, que pueden existir en un estado “flotante” en las poblaciones, como heterocigotas y homocigotas; y b). Los híbridos ocurridos cuando se superponen dos poblaciones cariotípicamente diferentes, donde los rearrreglos cromosómicos, están ausentes en una población, pero se encuentran fuertemente fijados en otra, siendo los híbridos, heterocigotas para determinados rearrreglos.

2.3. Cariotipo y filogenia

En los últimos quince años, los datos cromosómicos han sido utilizados en distintas taxa como marcadores filogenéticos, ya que se heredan como caracteres mendelianos (Sankoff 2003, Dobigny et al. 2004, Stanyon et al. 2008). El patrón de bandas G revela una sucesión de bandas claras y oscuras a lo largo de los cromosomas que pueden variar en ancho e intensidad y son características de cada par de cromosomas homólogos (Bianchi et al. 1985). Así, la comparación de los patrones de bandas G entre los cariotipos de diferentes especies se puede utilizar para relacionar grupos hermanos entre las taxa (Bianchi et al. 1985). De esta forma, los cromosomas, como otro tipo de datos o caracteres, pueden ser analizados y comparados por tamaño, morfología y patrón de bandas, colaborando en resolver dudas entre cariotipos y ancestralidades (Dobigny et al. 2004).

2.4. Antecedentes Citogenéticos en Dasypodidae y en Xenarthra

El primer estudio citogenético en Xenarthra fue realizado, en la línea germinal, en *D. novemcinctus*, por Newman y Paterson (1910) y Newman (1912), quienes encontraron 31 cromosomas en la espermatogonia y 32 en la ovogonia, atribuyendo estos resultados a la existencia de un mecanismo de determinación sexual de tipo

XX/X0. Painter en 1925, encontró 60 cromosomas en las células somáticas de la misma especie, y no fue hasta 1962 cuando Beath et al. lograron cultivar los linfocitos de esta especie para establecer el número diploide en $2n=64$. En 1964 Saez et al. describieron el cariotipo de *D. hybridus* con un $2n=64$ con presencia de 32 bivalentes en la meiosis. Este estudio describió también, diferencias entre dos especies del género *Dasypus* (*D. hybridus* y *D. septemcinctus*), que involucraban pares metacéntricos medianos y acrocéntricos pequeños. En 1969, Benirschke (en su libro “Comparative Mammalian Cytogenetics”) informó el cariotipo de 5 especies de armadillos: *D. hybridus*, *D. novemcinctus* (ambos $2n=64$), *E. sexcinctus* ($2n=58$), *Ch. villosus* ($2n=60$) y *Cabassous centralis* ($2n=62$). También, en el mismo año, Corin Frederic describió en machos del perezoso *Choleopus hoffmani* ($2n=49$), una traslocación entre cromosomas sexuales (cromosoma Y) y autosómicos, y en hembras refirieron un mecanismo de determinación sexual de tipo X0. Posteriormente Merrit y Benirschke (1973) describieron los cariotipos de *T. matacus* y *Z. pichiy*, identificando a *T. matacus* como el xenartro de menor número cromosómico ($2n=38$). En 1977, Jorge et al. analizaron el cariotipo de *E. sexcinctus*, *Ch. villosus*, *D. novemcinctus*, *D. hybridus* y *Z. pichiy*.

En 2006, Sciurano et al. estudiando el apareamiento en paquitene de espermatozoides, describieron el complejo sinaptonémico de *Ch. villosus* y *D. hybridus*, lo que permitió medir certeramente el cariotipo meiótico e identificar los cromosomas portadores del organizador nucleolar; describiendo también una completa sinapsis entre los cromosomas X e Y, tal como fue informado previamente en *D. novemcinctus* (Scavone et al. 2000).

En los trabajos realizados para este grupo (Benirschke et al. 1969, Jorge et al. 1977), las inversiones pericéntricas, las duplicaciones, las deleciones y todas las

formas de traslocaciones, incluyendo fusiones cromosómicas (con decrecimiento del número diploide) y fisiones (con incremento del número diploide) no fueron detectadas. Esto probablemente puede deberse a que los reordenamientos, en este grupo, involucran pequeños segmentos cromosómicos y a que sus estudios fueron realizados en un número bajo de individuos, lo cual disminuye la probabilidad de poder detectarlos.

3. Reproducción

Los procesos reproductivos son diversos y difieren marcadamente entre especies. Estas diferencias, sean en la anatomía o la fisiología de la reproducción, entre subespecies o razas cariotípicas establecidas, puede traducirse con el tiempo, en barreras de aislamiento reproductivo precigótico.

Por ejemplo, se han encontrado soluciones de forma y función muy diferentes para poder llevar el ADN nuclear paterno hasta el óvulo. Esto se refleja claramente en la enorme diversidad de formas y tamaños presente en los gametos masculinos, aún en especies muy cercanas. Estos cambios en la forma, también involucran marcadas diferencias en otros componentes celulares, como las enzimas del acrosoma (gránulo secretor) que ayudarán al espermatozoide a interactuar con el óvulo (Roldan et al. 1992; Gomendio y Roldan 2008). El estudio del grado de esta especificidad, es de fundamental importancia para definir una especie biológica.

Algunas características distintivas de los sistemas reproductivos de los xenartros, tales como la poliembrionia monocigótica, la diapausa embrionaria y la morfología espermática fueron expuestas en el punto 1.2 (titulado “Biología de Xenarthra”). Dada la posible posición basal de Xenarthra en la filogenia de los mamíferos placentados (ver punto 1 “El superorden Xenarthra”), todo estudio biológico en este grupo, debe

ser encarado comprendiendo su temprana divergencia. Es así, que en xenartros, en los estudios de fisiología testicular se debe contemplar la posición intrabdominal de sus testículos (tal como sucede en los afroterios, Grassé 1955, Werdelin y Nilsson 1999) y en los de fisiología de la reproducción femenina la presencia de un seno urogenital (como sucede en marsupiales, Cética et al. 2005, Rossi et al. 2011). Sin ser la excepción, los armadillos de la tribu Euphractini presentan una biología reproductiva extraordinaria (Cética et al. 1993, 1997, 1998, 2005).

3.1. Estudios anatómicos e histológicos

Las diferencias morfológicas entre los espermatozoides son importantes consecuencias de la evolución de los sistemas reproductores. No obstante, la naturaleza del trayecto que los gametos masculinos deben recorrer, es determinante en la creación de barreras reproductivas. El espermatozoide debe realizar un largo recorrido que va desde el testículo, donde son producidos, hasta el sitio de la fecundación, donde podrán interactuar con el ovocito. Biológicamente hablando, este trayecto (i.e. tracto reproductor masculino y femenino), es por demás diverso entre especies, siendo fundamental su descripción morfológica para poder delimitar posibles mecanismos precigóticos de aislamiento reproductivo entre especies, razas cariotípicas o subespecies.

3.1.1. Morfología del tracto reproductor masculino en Euphractini

Los estudios acerca de la anatomía del tracto reproductor masculino se encuentran concentrados en la especie *D. novemcinctus*, cuya distribución se extiende hasta Norteamérica (Bedford and Millar 1978). La anatomía reproductiva de los armadillos

eufRACTINOS, distribuidos exclusivamente en América del Sur, solo fue abordada por antiguos estudios realizados por Kaudern (1914) o Grassé (1955) y los trabajos recientes son escasos y están focalizados en procesos neurofisiológicos (Affanni et al. 2000, Aldana Marcos 1996, 2005). Aún falta un trabajo, que integre los conocimientos básicos de anatomía, aportando la histología comparada, en Euphractini, como si ha sido realizado para las hembras (Cetica et al. 2005).

Por otro lado, si bien la morfología espermática ha sido bien caracterizada en el grupo (ver punto 1.2.4. “Morfología espermática”), aún nada se sabe del proceso de espermatogénesis que da origen a estos gametos de morfología extraordinaria. La cual puede estar asociada a procesos fisiológicos diferentes de aquellos estudiados en los modelos tradicionales como el ratón o la rata entre otros (Leblond y Clermont 1952, Oackberg 1956).

El proceso de espermatogénesis debería constituir, un campo de estudios para aquellos que hacen citogenética animal, especialmente los que se focalizan en citotaxonomía o citogenética poblacional. Ya que desde esta óptica, se visualiza el efecto que pueden causar los rearrreglos cromosómicos en la fertilidad (Redi y Capanna 1988). Lo mismo ocurre en el caso de la ovogénesis aunque, dado lo dificultoso que resulta estudiar dicho proceso, el desarrollo del gameto masculino es por lejos el mas estudiado.

La reducción de la fertilidad asociada a las traslocaciones Robertsonianas ha sido estudiada en profundidad en el ratón (*Mus musculus domesticus*) (Redi y Capanna 1988, Garagna et al. 1990). Así, los portadores de rearrreglos cromosómicos en heterocigosis (híbridos cariotipos), pueden presentar una reducción de la fertilidad reflejada en una baja del recuento espermático (ver punto 2.2. “Cariotipo y especiación”). Las principales alteraciones de la espermatogénesis, en los ratones

portadores de rearrreglos Robertsonianos en heterocigosis, se observan durante la meiosis de estos individuos. Estas provocan una desregulación del proceso, que genera la apoptosis de las células germinales, pudiendo deberse principalmente a: alteraciones en la actividad enzimática (Hotta y Chandley 1982, Redi et al. 1983), diferencias cualitativas en la estructura de proteínas específicas (Forejt 1982), un incremento en la duración del estadio de profase (Redi et al. 1983) y anomalías en el apareamiento de los autosomas y los cromosomas sexuales (Wallace et al. 2002).

Por lo previamente expuesto, comprender el proceso de espermatogénesis es importante para entender porque los estudios citogenéticos son fundamentales en la comprensión de los procesos de especiación y/o extinción de especies.

3.1.2. Morfología del tracto reproductor femenino en Euphractini

El tracto reproductor de las hembras de los eufractinos, ha sido ampliamente estudiado durante muchos años por el grupo al cual pertenezco, dando origen a comunicaciones y trabajos (Cetica et al. 2005, Rossi et al. 2011). En estos, han sido descritas características particulares no frecuentes en mamíferos, como la presencia de un ovario polarizado con folículos poliovulares y la presencia de un seno urogenital (Cetica et al. 2005). Estos datos preliminares ameritan a un profundo y moderno reestudio histo-fisiológico para conocer mejor su biología reproductiva.

3.2. Estudios fisiológicos

La diversidad morfológica está asociada a diversidad fisiológica, esta última, puede manifestarse como: diferencias en la existencia y duración del ciclo reproductivo, en los mecanismos de ovulación, en los procesos de activación del cuerpo lúteo, en la regulación del desarrollo embrionario temprano, o en los tiempos

de gestación. Es interesante entender como diferencias en estos parámetros pueden también constituir una forma de aislamiento reproductivo precigótico.

3.2.1. Estudio del ciclo reproductivo en los machos

En estudios iniciales de nuestro laboratorio se ha observado una interrupción en la producción de espermatozoides en *Ch. villosus* (Luaces et al. 2006). La interrupción del proceso de espermatogénesis puede deberse a factores tanto genéticos (ver punto 3.1.1. “Morfología del tracto reproductor masculino en Euphractini”) como ambientales. Los últimos, pueden deberse a procesos anómalos, dada la presencia de contaminantes (sustancias citotóxicas) en el ambiente (Sobarzo et al. 2009), o fisiológicos, dadas las fluctuaciones estacionales que son percibidas por los animales, que serían responsables de ciclos de actividad e inactividad en los sistemas reproductivos.

La espermatogénesis estacional es una estrategia reproductiva frecuente en muchos mamíferos como ciervos (*Capreolus capreolus*, Blottner et al. 1996, Schön et al. 2004), el zorros colorados (*Vulpes vulpes*, Berg et al. 2005), hamsters (*Phodopus sungorus*, Furuta et al. 1994, Sato et al. 2005), ardillas (*Citellus duricus*, Sheng 2008), mapaches (*Procyon lotor*, Kaneko 2009), monos (*Macaca mulatta* y *M. radiata*, Bansode et al. 2003), ratones (*Apodemus speciosus* Tamada et al. 2000) caballos (*Equus caballus*, Johnson 1991), topos (*Talpa europea* y *T. occidentalis*, Tähkä et al. 1989).

Este fenómeno, también fue observado en el eufractino *Z. pichiy*, en trabajos previos, donde una estacionalidad en los valores hormonales de testosterona (Superina y Jahn 2009), sugiere ciclos estacionales de actividad reproductiva. Sin embargo, resta aún conocer, los patrones anuales de actividad espermatogénica en los

armadillos eufractinos, que podrían explicar una detención en el proceso de producción de espermatozoides, mencionado para *Ch. villosus*.

3.2.2. Estudio del ciclo reproductivo de las hembras

Tal como fue descrito en el punto 1.2.3. (“Poliembrionía y retraso de implantación”), el género *Dasypus*, presenta un ciclo reproductivo por demás característico, demostrado en trabajos previos en hembras de *D. novemcinctus* (Peppler 2008). En Euphractini, trabajos actuales concuerdan en que existe un ciclo reproductivo estacional, para la mayoría de sus especies. Esto fue demostrado para *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus* (Luaces et al. 2011b) y *Z. pichiy* (Superina et al. 2009).

Como ya fue mencionado (ver punto 3.1.2. “Tracto reproductivo en la hembra”), los armadillos de la tribu Euphractini, a diferencia de otros grupos de mamíferos placentarios, no poseen una vagina verdadera (Cetica et al. 2005). Es así que, para estudiar el ciclo reproductivo en estos animales, no es aceptable valerse de la citología vaginal exfoliativa. Deben por lo tanto, utilizarse otras metodologías de las usadas comúnmente en otros animales como el perro, el ratón, u otros animales (Iodice 2010). Las determinaciones hormonales de esteroides en heces son un método apropiado para este tipo de estudios ya que no presentan las dificultades asociadas a la toma de muestra sanguínea o urinaria.

De esta manera, el estudio de los ciclos reproductivos constituye una herramienta que permite evaluar cuan similares o diversas resultan las especies en su fisiología reproductiva. Diferencias que pueden ser traducidas en mecanismos de aislamiento precigótico entre especies relativamente cercanas.

4. Objetivos e hipótesis de trabajo.

4.1. Objetivos generales

Discutir a través de nuestra caracterización citogenética, la posición filogenética de Euphractini en el árbol de los mamíferos euterios. Asignar un rol (subfertilidad, infertilidad o normalidad), en los individuos portadores, a los rearrreglos cromosómicos en Euphractini y asociar su ocurrencia a un posible desbalance gamético mediante el estudio de la espermatogénesis. Estudiar la morfología (tracto genital) y fisiología (ciclos reproductivos) para vislumbrar barreras reproductivas pre-cigóticas que pudieron surgir entre las especies de esta tribu (ver punto 3 “Reproducción”).

4.2. Objetivos particulares

I. Citogenética clásica y molecular en Euphractini:

a. **Línea somática:** caracterizar a través de la citogenética clásica y molecular las especies argentinas de armadillos euphractinos, identificando además las variaciones cariotípicas para la distribución Argentina.

b. **Línea germinal:** determinar, mediante el estudio de la meiosis testicular, pequeños rearrreglos cromosómicos a nivel especie, estableciendo además la variabilidad genética intrínseca y la asociada a los reordenamientos cromosómicos en euphractinos.

II. Biología Reproductiva:

- a. **Tracto reproductivo:** Estudiar el aparato reproductor masculino en **Euphractini** mediante estudios anatómicos, histológicos y de estructura fina.
- b. **Ciclo reproductivo en machos:** Esclarecer, a través de estudios anatómo-histológicos, la existencia de ciclos testiculares en *Ch. villosus*, describiendo la variación en las poblaciones celulares del epitelio seminífero, cantidad de espermatozoides y el peso y dimensión testicular a lo largo del año.
- c. **Ciclo reproductivo en hembras:** Esclarecer través del estudio de los valores de hormonas esteroides en materia fecal, el ciclo reproductivo en hembras de *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*

4.3. Hipótesis de trabajo

La especiación en Xenarthra es prevalentemente cariotípica. Existen mecanismos cromosómicos de aislamiento postcigótico en los armadillos de las especies de Euphractini.

Dada la estrecha relación entre los espermatozoides y los tractos reproductivos de las especies de euphractinos, finos mecanismos moleculares de no reconocimiento entre gametas producirían el aislamiento precigótico estarían actuando entre estas especies.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Citogenética

1.1. Línea somática

1.1.1 Obtención de material

Un total de 347 especímenes de armadillos fueron capturados y estudiados en distintas localidades incluidas dentro de la distribución de cada una de las especies en Argentina (Fig. 7).

223 pertenecieron a la especie *Ch. villosus* (131 machos y 92 hembras), de los cuales se obtuvo muestras de sangre periférica, en condiciones de esterilidad. En 5 machos, se trabajó también, material testicular para el estudio de la meiosis (ver localidades en la tabla del Anexo).

103 ejemplares pertenecieron a *Ch. vellerosus* (56 machos y 47 hembras), 48 pertenecieron a la distribución principal (28 machos y 20 hembras) y 55 a la distribución secundaria (28 machos y 27 hembras, Fig. 7b), de los cuales se obtuvo muestras de sangre periférica en condiciones de esterilidad. En 4 machos, se trabajó también, material testicular para el estudio de la meiosis (ver localidades en la tabla del Anexo).

14 ejemplares de *Z. pichiy* (4 machos y 10 hembras), de los cuales se obtuvieron muestras de sangre periférica. En 1 macho, se trabajó también, material testicular para el estudio de la meiosis (ver localidades en la tabla del Anexo).

7 ejemplares de *E. sexcinctus* (4 machos y tres hembras), de los cuales se obtuvieron muestras de sangre periférica. En 2 machos, se trabajó también, material testicular para el estudio de la meiosis (ver localidades en la tabla del Anexo).

1.1.2 Extracción de sangre

Los animales fueron capturados e inmovilizados manualmente. Fue considerado correcto el nivel de sujeción, cuando la muestra extraída fue satisfactoria, no habiendo demorado más de 3 minutos y evitando así, el estrés excesivo del animal. La extracción de sangre periférica fue realizada a campo en condiciones de esterilidad, según normas ICLAS (International Council of Laboratory Animals) respetando los protocolos indicados en la guía para el cuidado y uso de animales experimentales (Canadian Council on Animal Care, Olfert et al. 1993). La metodología (lugar de punción, calibre de la aguja y cantidad de sangre) fue estudiada y estandarizada previamente para estas especies (Luaces et al. 2011a). La muestra fue rotulada asignando de manera secuencial un número que, por convención, fue par para las hembras e impar para los machos.

El transporte de las muestras al laboratorio fue realizado en todos los casos a por vía terrestre a 4°C, el cual no demoró más de 72 hs.

En el laboratorio, las muestras obtenidas se registraron individualmente en el protocolo experimental, adjuntando los datos georeferenciales, características ambientales de las localidades de proveniencia, el número dado al animal a campo y las condiciones del mismo (medidas, peso y estado reproductivo), datos de las condiciones en las cuales se realizó el cultivo y los laboratorios donde se derivaron las muestras para otro tipo de estudios (parasitológicos, virológicos y hormonales).

1.1.3. Cultivo de sangre

La obtención de cromosomas de la línea somática se realizó a través del cultivo de linfocitos de sangre periférica, siguiendo a Moorhead et al. (1960) con modificaciones para las especies en estudio. Dada la alta variabilidad en número y fórmula leucocitaria según la localidad de proveniencia, fue necesario establecer un número estándar de linfocitos a cultivar. Por esto, para cada individuo se realizó un recuento de linfocitos por mm^3 , utilizando una cámara de Neubauer y el cálculo de la fórmula leucocitaria en frotis de sangre. El número de leucocitos totales y el porcentaje de cada uno de los elementos blancos obtenidos fueron ingresados en un protocolo específico de hematología. Una vez contabilizada la cantidad de linfocitos por cada 100 células blancas, se procedió a calcular el valor de la cantidad de leucocitos necesarios a sembrar en el cultivo, concentrando o diluyendo de modo de obtener la concentración adecuada de linfocitos por ml de cultivo (i.e. dentro del rango $6 \cdot 10^5$ - $1,2 \cdot 10^6$ linfocitos/ml de cultivo).

Los cultivos se realizaron empleando los medios RPMI 1640 y MEM Gibco a pH 6,8-7, suplementados con suero fetal bovino Natocor o Bioser (10-15%), y antibiótico Roche (penicilina 10 UI /ml- estreptomina 10mg/ml), fitohemaglutinina Sigma (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y L-glutamina Sigma (30mg/ml). A este medio se le agregó el volumen de fracción blanca necesario para lograr la concentración adecuada de linfocitos y se incubó en estufa a 34 °C por 72-96 horas.

1.1.4. Sacrificio del cultivo

El tiempo para el sacrificio del cultivo fue determinado evaluando a las 48 hs el índice blástico (IB, i.e. cantidad de linfoblastos sobre el total de linfocitos) del cultivo. Cuando el IB alcanzó o fue superior a 50%, el cultivo fue sacrificado 24 hs mas tarde (72 hs de cultivo), de lo contrario se procedió al sacrificio a las 96 hs. Para el sacrificio, se trato con un antimicótico para detener el ciclo celular en estado de metafase, colchicina Sigma (concentración final 1 µg/ml de cultivo), y se continuó la incubación durante 2-3 horas a 34°C. Se centrifugó 5 minutos a 800 rpm, descartándose el sobrenadante. Al botón celular se le agregó, resuspendido sin burbujear, solución hipotónica de KCl 0,075 M a 34°C, y se mantuvo a la misma temperatura por espacio de 15-20 minutos. Para descartar la solución hipotónica, se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm, agregándose luego suavemente y por las paredes el fijador frío (3-metanol: 1-Ac. acético). Se dejó en hielo hasta el momento en el cual se alcanzó la fijación de todo el botón que se manifestó con el cambio de coloración del mismo. Por último fueron realizadas cinco o más series de lavados con fijador fresco y frío.

1.1.5. Preparación de los extendidos

Una vez finalizados los lavados, se tomaron portaobjetos previamente seleccionados y tratados (ver Anexo). Se colocaron sobre una capa de hielo durante unos minutos hasta que estuvieron totalmente empañados. Al retirar los portaobjetos del hielo, aprovechando el efecto de la pared fría que da la alta condensación de agua, utilizando una pipeta Pasteur se dejó caer de 3 a 5 gotas de suspensión sobre el portaobjetos, logrando que las mismas se abran y cubran la totalidad de la superficie.

A continuación se secaron al calor del mechero, sin pasar por la llama (Claussen et al. 2002) y se colorearon con carbol-fucsina (Carr y Walter 1961).

1.1.6. Observación y selección de las metafases

Las metafases fueron seleccionadas en un microscopio óptico (Leitz DM RB), con el objetivo de 10X. Una vez seleccionadas las metafases, fueron ingresadas sus coordenadas en protocolo, en 5 de ellas se dibujaron y se contaron sus cromosomas. Por cada número distinto encontrado, se agregó al recuento efectuado 5 metafases más hasta llegar a completar un máximo de 25 metafases, el número de mayor frecuencia fue asignando al individuo como número diploide.

1.1.7. Bandas G

Las bandas G fueron realizadas según Seabright (1971) modificado. Los preparados se incubaron 5 a 10 min. en PBS (phosphate saline buffer o tampón de fosfato salino) 1X a temperatura ambiente. Se trataron con tripsina Gibco al 0,1% en PBS 1X, durante el tiempo necesario, según el material a bandear. Se lavaron los preparados en PBS 1X para detener la acción de la tripsina y se colorearon en el colorante de Giemsa al 3% a pH 6,8. Fueron contadas y analizadas al menos 25 metafases por espécimen bandeado.

1.1.8. Técnicas de Bando C

Se utilizó la técnica de Sumner (1972) con modificaciones. Los preparados seleccionados por la morfología de sus metafases, fueron incubados 20 min. en HCl 0.2 N a temperatura ambiente. Posteriormente se trataron con una solución

sobresaturada de Ba(OH)₂ a 50°C durante 40-60 segundos y se incubaron durante una hora en una solución 2xSSC (solución salina concentrada, ver anexo) a 60 °C. Se colorearon en el colorante de Giemsa al 3% a pH 6,8 por un tiempo de 15 a 60 minutos.

1.1.9. Técnica para la detección y ubicación del NOR

Se utilizó la técnica de Howell and Black (1980) con modificaciones. Se colocaron sobre el preparado 3 gotas de gelatina Sigma y 2 de nitrato de plata Carlo Erba (30µl y 20µl respectivamente), sobre la gota así formada se colocó el cubreobjetos limpio. Se calentó el preparado sobre una placa caliente, sin sobrepasar los 40°C, controlando al microscopio hasta alcanzar la tinción deseada. Para levantar el cubreobjetos se sumergió el preparado en agua destilada.

1.1.10. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de campo claro

A partir de las metafases dibujadas, se seleccionaron las representativas en número y morfología y se fotografiaron 3 por cada individuo y 3 por cada sistema de bandeó. Para ello fue utilizado un microscopio Leitz DMRB y la cámara digital Leica DFC 300 FX.

1.1.11. Medidas y confección del ideograma

Individualizados los cromosomas y caracterizada su morfología, se procedió al armado del cariotipo. Según convención (Levan et al. 1964), se utilizó como criterio: primero el tamaño y luego la morfología, dada por la posición del centrómero. Para

comparar estandarizadamente los cariotipos de distintas especies o taxas en estudio, se utilizaron tres índices que permiten obtener información cariológica básica:

Índice centromérico (**IC**), posición del centrómero en relación al brazo “**p**”; la relación de brazos (**RB**), determinada a partir de la relación entre el brazo corto y el brazo largo; y la proporción del largo total del complemento haploide que corresponde a cada cromosoma (**%LT**), teniendo en cuenta o no según acuerdo, el cromosoma X y en ningún caso el cromosoma Y.

$$\mathbf{IC} = \mathbf{p} / \mathbf{C} \quad \mathbf{C} = \text{largo del cromosoma};$$

$$\mathbf{RB} = \mathbf{p} / \mathbf{q} \quad \mathbf{p} = \text{brazo corto};$$

$$\mathbf{q} = \text{brazo largo} \quad \mathbf{\%LT} = \mathbf{C} \times 100 / \mathbf{LT};$$

LT = largo total del complemento haploide

En base a los valores obtenidos para la relación de brazos e índice centromérico, se utilizaron como referentes para la asignación cromosómica de una determinada morfología los siguientes intervalos de valores específicos:

Morfología	IC
Metacéntrico (M)	0,5-0,375
Submetacéntrico (SM)	0,375-0,125
Acrocéntrico (A)	0,125-0,00

Tabla 1: Clasificación morfológica de los cromosomas según Levan et al. (1964)

La confección del ideograma se realizó a partir de cromosomas de la misma elongación y con la misma ampliación fotográfica en tres células por cada individuo seleccionado (5 machos y 5 hembras). Se midió el complemento haploide de cada una de las metafases con el programa Adobe Photoshop (CS3), se sumaron todos los

elementos de cada uno de los sets haploides autosómicos más el cromosoma X y se consideró esa medida el 100% del contenido total cromosómico. Mediante una regla de tres simple, se obtuvo el porcentaje de cada uno de los cromosomas en relación al complemento haploide, de la misma manera se obtuvo el porcentaje de cada uno de los brazos. Finalmente se promediaron los largos cromosómicos para cada elemento, con su desviación estándar, y esto fue trasladado sobre un gráfico donde el cero correspondió a la región centromérica.

2.1.12. Hibridación in-situ fluorescente (FISH)

Para la realización de estudios de las secuencias teloméricas, se utilizó sonda telomérica de tipo PNA (telómeros sintéticos en los que los grupos fosfato han sido reemplazados por una cadena de péptido/poliamida neutra) comercial (Telomere PNA FISH Kiy/Cy3, DAKO, Glostrup, Dinamarca). El procedimiento fue realizado de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante.

1.2. Línea germinal

1.2.1 Obtención del material

Se utilizaron muestras de biopsias testiculares de individuos de: *Ch. villosus*, provenientes Santo Domingo pcia. de Córdoba (n=1) y Loma Verde, pcia. de Buenos Aires (n=4); *Ch. vellerosus* provenientes de El Centenario (n=1) pcia. de San Luis, Pipinas (n=2) pcia. de Buenos Aires y Santo Domingo (n=1) pcia. de Córdoba; *Z. pichiy* proveniente de Puerto Deseado, (n=1) pcia de Santa Cruz y *E. sexcinctus* provenientes de la pcia. de Salta (n=1) y de la pcia. de Corrientes (n=1) (las

localidades de los individuos de *E. sexcinctus* no pudieron ser precisadas, dada su proveniencia de zoológicos). Las biopsias de animales vivos fueron realizadas por médicos veterinarios según las normas ICLAS, respetando los protocolos indicados en la guía para el cuidado y uso de animales experimentales (Canadian Council on Animal Care, Olfert et al. 1993).

1.2.2. Obtención de los preparados meióticos

Una vez obtenido el testículo o parte de éste, se obtuvieron cromosomas meióticos (metafases I y II) según la técnica de Evans et al. (1964) con modificaciones. Primero se eliminaron los restos de grasas y se lavó el testículo con citrato trisódico al 2,2% en un vaso de precipitado o placa de Petri, se extrajo la túnica de los testículos y se transfirieron los túbulos seminíferos a un vidrio de reloj pequeño con unas pocas gotas de citrato de sodio 2,2%. Los túbulos fueron macerados cuidadosamente con pinzas curvas, vaciando su contenido. Se agregó más citrato 2,2% hasta llegar a un volumen entre 2-3 ml y luego se pipeteó repetidamente sobre las células suspendidas y túbulos en un tubo de centrifuga de 10 ml. Se dejó sedimentar los detritus, extrayendo luego sólo la suspensión celular que fue centrifugada durante 5 minutos o más a 500 rpm aprox. Se descartó el sobrenadante y se agregó solución hipotónica KCl 0,44% durante 30 a 50 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió la suspensión a dos tubos de centrifuga y se agregó una cantidad de fijador igual a la cantidad solución hipotónica. Después de este proceso de prefijación se centrifugó para descartar el sobrenadante. Se agregó una cantidad de 1 ml de fijador lentamente, dando leves golpes al tubo a medida que se fue agregando el fijador para asegurar una fijación rápida. Uno de los dos tubos fue resuspendido inmediatamente para el

enriquecimiento de las MI, mientras que en el otro se dejó fijar durante una hora o más, sin resuspender, para la obtención de MII. Finalmente se procedió a la preparación de los extendidos.

1.2.3. Microextendidos de complejos sinaptonémicos

Se utilizó la técnica de drying-down según Peters et al. (1997). Las preparaciones se utilizaron inmediatamente o se guardaron para su conservación en freezer a -70°C para su posterior utilización con técnicas de inmunodetección.

Se realizó una técnica de inmunodetección doble con anticuerpos primarios de distinto origen. Se efectuó un bloqueo en PBT 10% realizando 3 lavados de 10 minutos cada uno, luego se procedió a la incubación con anticuerpos primarios a 37°C, durante toda la noche. Para detectar los ejes meióticos se incubó con un anticuerpo anti-elementos axiales del complejo sinaptonémico (SMC3) (Chemicon, Millipore), y simultáneamente con suero de pacientes con esclerodermia de tipo CREST (IFI), que contiene auto-anticuerpos para proteínas del cinetocoro y anti-MLH1 (que marca los sitios de recombinación). Los mismos fueron utilizados en una dilución de 1:1000 e incubados durante toda la noche. Posteriormente a la incubación se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS + 0,05% Tween. Se procedió a la incubación durante 2 hs con anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluorocromos: uno marcado con FITC (emisión de fluorescencia verde) y el otro marcado con TRITC (emisión de fluorescencia roja). Los anticuerpos fueron diluidos 1:50 y se utilizaron de manera simultánea. Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios se procedió a realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween 0,05%, y posterior coloración con DAPI (1:200 de una solución Stock 0,2 µg/ml) por 5 minutos. Después del último lavado con PBS - Tween 0,05% se procedió al montaje

en 4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) para retrasar el desvanecimiento de la fluorescencia.

1.2.4. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de fluorescencia

Las imágenes de la fluorescencia verde fueron realizadas con un filtro de isocianato de fluoresceína (FITC), que se excita con luz azul a 490nm y emite a 514nm, y las de fluorescencia roja, con un filtro de isocianato de tetrametil rodamina (TRITC), que se excita a 540nm y emite a 570nm. fueron obtenidas en un microscopio Leitz DM RB equipado con epifluorescencia y una cámara Leica DC 300. Las imágenes individuales se procesaron y acoplaron empleando el programa Adobe Photoshop (Cs3).

2. Biología Reproductiva

2.1. Estudios de morfología del tracto reproductor

Para realizar la descripción morfológica, se obtuvo el tracto reproductor completo de 15 individuos machos adultos de *Ch. villosus*. Primero se realizó la disección anatómica e identificación macroscópica bajo observación directa. Los dibujos y fotos necesarios fueron realizados en estas disecciones. Para los estudios histológicos, los tejidos fueron fijados en formol 10% y diferentes regiones fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Luego secciones de 5µm fueron teñidas con las siguientes técnicas: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y PAS.

Los testículos fueron fijados en Bouin durante 24 horas, y luego deshidratados en serie de alcoholes ascendente, para ser incluidos en parafina. Se cortaron en secciones de 5 micras. Las mismas fueron teñidas con la técnica de ácido periódico y Schiff (APS o en inglés PAS) y contracolorados con hematoxilina.

Antes de la fijación en Bouin, una pequeña fracción del parénquima testicular fue separada y fijada en Glutaraldehído 2,5% en 0,1 M buffer fosfato (pH 6,9) por dos horas y post-fijada en 1% OsO₄ para microscopia electrónica de transmisión. Otras partes fueron incluidas en Maraglas. También se realizaron secciones de cortes semifinos de 0,5 µm de espesor, los cuales fueron colocados sobre portaobjetos y teñidos con azul de toluidina alcalina a 60°C. Las secciones seriadas para microscopía electrónica (EM) fueron cortadas a 0,07 micras en un ultramicrotomo Porter-Blum, y fueron teñidas con solución saturada de acetato de uranilo y una solución de citrato de plomo (0,3%).

Las Microfotografías se obtuvieron con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I. Los cortes histológicos fueron fotografiados utilizando un microscopio Leitz DMRB y una cámara digital Leica DFC 300 FX. Las fotografías de las disecciones anatómicas fueron realizadas con una cámara Sony cybershot P73/p93.

2.2. Estudio del ciclo reproductivo en machos

2.2.1. Obtención del material

A partir de 35 ejemplares adultos de *Ch. villosus* capturados en la localidad de Loma Verde, pcia. de Buenos Aires, durante diferentes meses del año (desde abril de 2010 a septiembre de 2011), se obtuvo, mediante cirugía bajo anestesia y

hemicastración, el testículo izquierdo (ver punto 1.2.1.) El mismo fue pesado después de haber diseccionado y sacado el epidídimo.

2.2.2. Recuento de espermatozoides

De los epidídimos, se obtuvo una muestra de espermatozoides. Para lo cual, se pesó parte de la cola del epidídimo, luego se presionó o se maceró la misma, para obtener los espermatozoides, sobre una cantidad de 0.1 ml de citrato trisódico al 1%. Se llevó la mezcla a 1ml y se dejó sedimentar durante 1 minuto. Una gota de la suspensión fue colocada en cada una de las cámaras de un hemocitómetro de Neubauer, donde se procedió a realizar el recuento. Se contaron las cabezas de los espermatozoides en cuatro cuadrados grandes de las esquinas y un cuadrado grande central de la sección correspondiente a la del recuento de glóbulos rojos, y luego se sumó la cantidad de cabezas espermáticas en estos 5 cuadrados. En algunos casos se repitió en la otra cámara del hemocitómetro y de este modo se pudieron obtener dos estimaciones por ejemplar. Se promedió la media y se multiplicó x100, obteniendo de esta manera la cantidad de espermatozoides por gramo peso de la cola del epidídimo.

2.3. Estudio del ciclo reproductivo en hembras

2.3.1. Obtención del material y puesta a punto de la metodología

Mediante el dosaje de hormonas esteroideas en materia fecal se evaluó la condición reproductiva de hembras de *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*. Diferentes métodos para preservar las muestras de materia fecal fueron evaluados con el objetivo de encontrar uno adecuado para el dosaje de hormonas esteroides en materia fecal de

armadillos. Se utilizó una correlación con valores en suero para validar las metodologías.

Muestras de heces frescas que fueron obtenidas después de la defecación, fueron procesadas de dos modos: Unas fueron inmediatamente almacenadas a -20°C (en adelante “heces frescas”) y otras fueron desecadas a 33°C en un desecador marca Boekel previo a su almacenamiento a -20°C (en adelante “heces secas”). La desecación fue verificada pesando la muestra todos los días hasta llegar a peso constante, lo que usualmente ocurrió dentro de las 72 hs. Para cada muestra obtenida se contó también con una muestra de sangre que fue tomada en el mismo momento. Las primeras (heces frescas) fueron obtenidas de 7 hembras adultas de *Ch. villosus* (11 muestras de sangre y de materia fecal) y de 2 hembras adultas de *Ch. vellerosus* (14 muestras de sangre y de materia fecal). Las segundas (heces secas) de 11 hembras adultas de *Ch. villosus* (26 muestras de sangre y de materia fecal) y 3 de *Ch. vellerosus* (10 muestras de sangre y de materia fecal). Las muestras de sangre, obtenidas en jeringas heparinizadas, fueron centrifugadas a 1500-2000 g durante 10-15 minutos para separar el plasma el cual fue almacenado a -20 °C hasta el momento de realizar radioinmunoensayo (RIA).

Los perfiles hormonales anuales de armadillos, tanto de animales de cautiverio como de animales a campo, fueron estudiados en heces secas que se obtuvieron a partir de hembras en cautiverio de *Ch. villosus* (n=1) de dos años de edad (2,0 kg), y de *Ch. vellerosus* (n=1) de tres años de edad (0,9 kg). Las muestras fueron recolectadas durante un año o dos veces por semana, después de observar la defecación. Las mismas fueron desecadas antes de ser guardadas a -20 °C.

Además se obtuvieron un total de 49 muestras de heces de hembras de *Ch. villosus* capturadas a campo, durante el periodo de un año. Estas fueron obtenidas de:

Gral. Madariaga (37°S 57°W), Saladillo (35°S 59°W), Bahía Blanca (38°S 43°W) y Navarro (35°S 59°W), pcia. de Buenos Aires, y de General Acha (37°S 64°W), pcia. de La Pampa. En el mismo periodo, 16 muestras de heces de hembras *Ch. vellerosus* se obtuvieron en Taco Ralo (27°S 65°W), pcia. de Tucumán, Argentina. Las muestras obtenidas a partir de animales capturados y sexados a campo, las mismas transportadas rápidamente al laboratorio y disecadas antes de ser guardadas a -20 °C.

2.3.2. Análisis hormonal

Heces frescas y secas (0,2 g) fueron colocadas en tubos de ensayo de vidrio y se mezclaron con 2 ml de agua bi-destilada. Las hormonas se extrajeron en 2 ml de éter dietílico anhidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se agitaron durante 10 min por tres veces. El sobrenadante de éter fue decantado en tubos de vidrio y evaporado a seco bajo N₂ atmosférico a temperatura ambiente. Los residuos se almacenaron a -70°C hasta que se realizaron las determinaciones por radioinmunoensayo. Para determinar las concentraciones de progesterona y las concentraciones de estradiol en materia fecal se utilizó la técnica de Roman et al. (2005) para radioinmunoanálisis. Las hormonas marcadas [1, 2, 6, 7-³H]-progesterona y [2, 4, 6, 7-³H]-17β-estradiol fueron obtenidas de NEN-Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Migliore Laclaustra SRL, Buenos Aires, Argentina). Los antisueros utilizados fueron provistos generosamente por el Dr. GD Niswender (Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, CO, EE.UU.).

Las diluciones seriadas de los extractos fecales proporcionaron curvas paralelas a las curvas standard. La sensibilidad de ambos ensayos fue de 15 pg/ml. La reacción cruzada para antisuero anti-estradiol de 1% para progesterona y testosterona, 5 % para estradiol y 10 % estrona. El reacción cruzada para el antisuero anti-progesterona fue

<2.0% para 20 α -dihydro-progesterona y deoxy-corticosterona y <1.0% para otros esteroides plasmáticos. El coeficiente de variación de los intra e interensayos fue <10% y <12% respectivamente para todas la hormonas. La eficiencia de la extracción fue de 71,9% y 73,0% para la progesterona y estradiol, respectivamente. Los resultados fueron expresados como ng/g de heces secas o frescas.

2.3.3. *Análisis de datos*

Para la obtención de la correlación entre plasma y concentración de hormonas sexuales en heces secas o frescas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Los picos hormonales fueron determinados mediante un proceso iterativo, los valores que superaron la media más dos desviaciones estándar (DS) fueron excluidos del análisis para luego recalculó la media y eliminar los valores bajo el mismo criterio, hasta que no se registraron valores por encima de la media mas 2 DS. Así, la **concentración basal media**, fue determinada como la media una vez excluidos todos los valores altos. El valor más alto dentro de un grupo de concentraciones altas fue considerado como pico.

Para establecer los picos hormonales para las muestras de materia fecal obtenidas a campo, se consideró el valor más bajo de los picos obtenidos en las muestras de animales en cautiverio como **valor límite**. Todos los valores por encima de este valor se interpretaron como picos hormonales. El grado de significación fue $P < 0.05$. Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Statistix 9.0.

Resultados

Resultados

1. Extracción de sangre

Para realizar una correcta extracción de sangre en armadillos a campo fue de vital importancia considerar los siguientes aspectos: El bienestar animal, considerando las normas ICLAS a las cuales el laboratorio adhiere, y la aptitud de la muestra obtenida para estudios citogenéticos (i.e. en condiciones de esterilidad y con linfocitos viables para cultivo de células, lo cual no permitió utilizar anestésicos en estas especies). Fue así desarrollada, una metodología para la especie *Ch. vellerosus* que fue descrita en trabajos previos (Luaces et al. 2011a). Dado que el presente estudio contempla especies de porte mediano y grande, considerando a *Ch. vellerosus* como una especie de porte pequeño, es que se debió poner a punto las condiciones necesarias para su correcto sangrado. Los individuos de *Z. pichiy*, de acuerdo a su localidad de captura y considerando la longitud de su cuerpo, resultaron chicos (menores a 25 cm) (individuos de Catriel, pcia. Río Negro) o medianos (entre 25 y 30 cm) (individuos de Portezuelo y Puerto Deseado, pcia. de Santa Cruz), los individuos de *Ch. villosus* resultaron medianos a grandes (mayores a 30 cm) en todos los casos y los individuos de *E. sexcinctus* resultaron siempre grandes. A fin de encontrar las vías de extracción sanguínea adecuadas en estos animales, se realizaron disecciones anatómicas y estudios histológicos. El estudio histológico de las secciones transversales de la cola de los armadillos evidenció la presencia de una *rete mirabile* en todos los animales estudiados (Fig. 8). La *rete mirabile* está constituida por arterias y venas de medianocalibre alrededor de una arteria central más grande (la arteria mayor de la *rete mirabile*, AMR). Se observaron , dos venas de ubicación lateral-dorsal (Fig. 8).

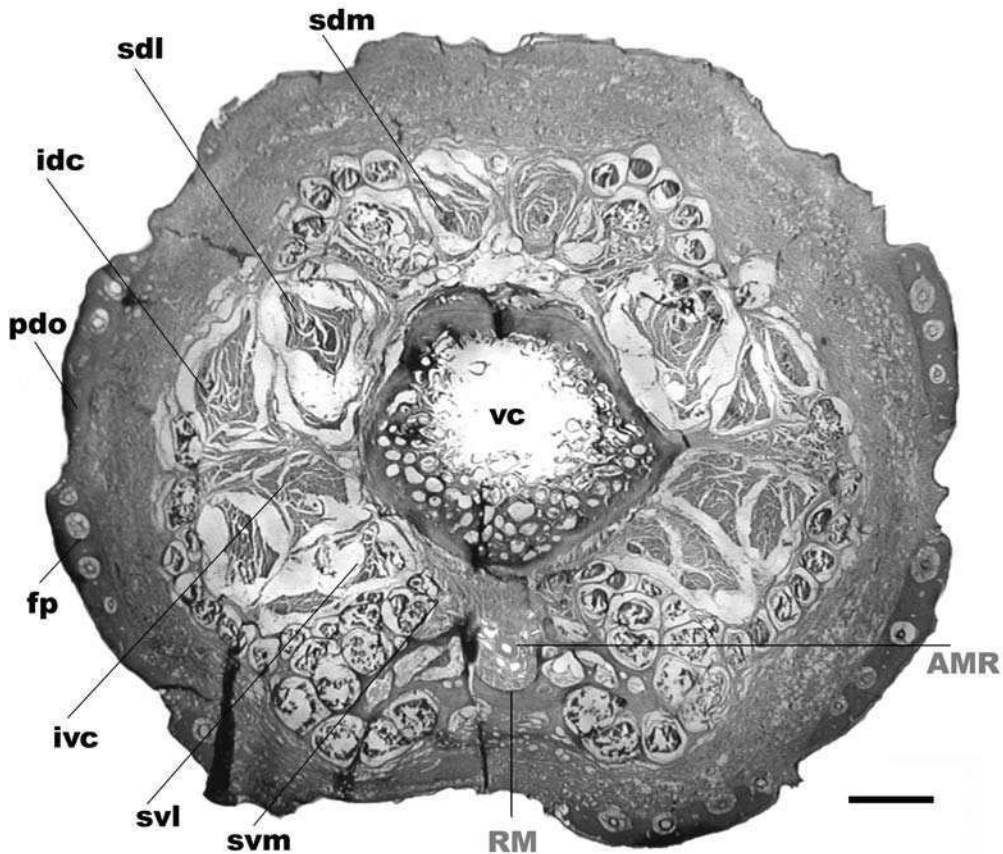


Figura 8: Corte transversal de cola de *Ch. villosus*. Tinción hematoxilina y eosina. RM: *rete mirabile* de la arteria coccígea media. AMR: arteria mayor de la *rete mirabile*; vc: vértebra coccígea; pdo: placa dérmica ósea; svm: músculo sacrocaudal ventral medio; svl: m. sacrocaudal ventral lateral; ivc: m. intertransverso ventral caudal; idc: m. intertransverso dorsal caudal; sdl: m. sacrocaudal dorsal lateral; sdm: m. sacrocaudal dorsal medial; fp: folículo piloso. Barra 2,5 mm.

Como fue previamente descrito (Luaces et al. 2011a), la inmovilización de los animales pequeños pudo realizarse utilizando inmovilizador o en su defecto inmovilizando al animal manualmente con la ayuda de otro operador calificado. En el caso de los animales medianos y grandes, dadas sus dimensiones anatómicas, los individuos fueron inmovilizados con la ayuda de otro operador. El animal fue sujetado con firmeza, con el abdomen hacia arriba (decubito dorsal), colocando los pulgares en la región ventro-lateral del abdomen y el resto de los dedos en el caparazón (Figura 9a). El operador que realizó la extracción, sujeto la cola con una mano y realizó la punción y extracción con la otra (Figura 9b). Debido a que, durante el procedimiento, es habitual que el animal defaque, a fin de evitar la posible

contaminación de la muestra, se bloqueó el ano con el dedo pulgar de la mano sostuvo la cola. Para una adecuada extracción fue importante tanto la pericia del operador que realizó la extracción como la del operador que sujetó el animal, debido a que, una presión continua debe ser ejercida durante todo el proceso. Y dado el aumento gradual de la resistencia y la agresividad del animal, la rapidez del procedimiento fue muy importante.

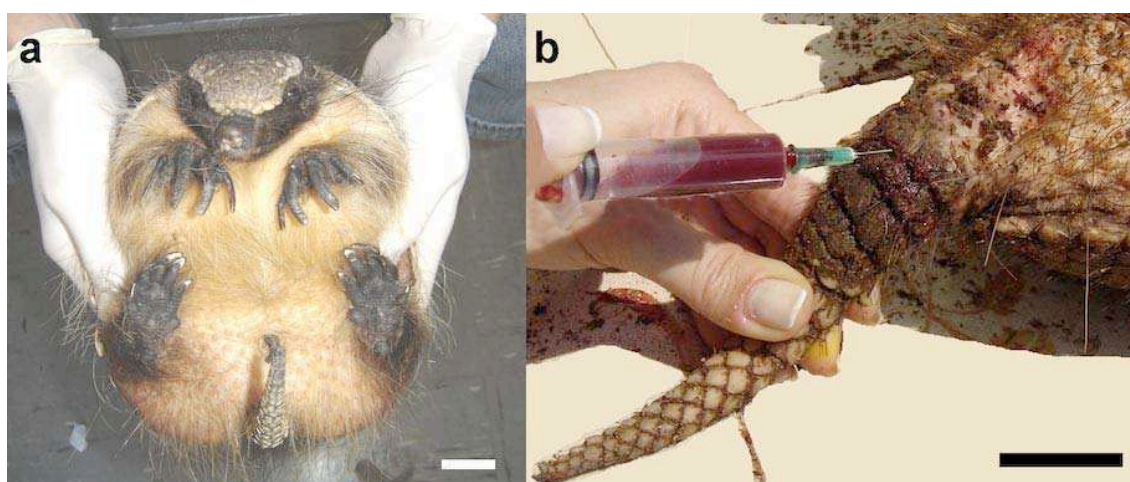


Figura 9: a. Método de inmovilización en *Z. pichiy* b. Extracción de sangre en *Ch. villosus* entre el primero y segundo anillo. Barra 3 cm.

La zona de extracción fue localizada en un punto medio entre el primero y segundo anillo de la cola, se limpió con etanol 70% y se punzó con una jeringa descartable con heparina estéril, ingresando con el bisel hacia arriba (Figura 9b). Debido a la presencia y la superposición de placas dérmicas óseas en todas las especies por nosotros estudiadas, fue necesario respetar un ángulo de punción de 25° cuando la cola se encontraba recta. Debido a la rápida coagulación de la sangre en armadillos (Casanave et al. 2006), una vez obtenida, la muestra se agitó suavemente con una mano, mientras que con la otra se ejerció una presión suave pero firme en la zona de punción, con el fin de causar hemostasia y evitar la generación de una hematoma. De acuerdo con la histología de la *rete mirabile*, la sangre puede obtenerse

de las arterias o las venas. En el primer caso, la jeringa se carga sin necesidad de jalar el émbolo. En este último caso, se requiere una lenta retracción del émbolo.

2. Citogenética

2.1. *Chaetophractus villosus*

2.1.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie

Se llevo a cabo la caracterización citogenética a nivel γ en los animales capturados y estudiados de la especie *Ch. villosus*, con un número diploide de $2n=60$ XX/XY; NF 84 (Fig. 10, NF: número fundamental). Los pares 1, 23 y 26 fueron metacéntricos (salvo el par 1 cuando se encontró reordenado, que resulto submetacéntrico), los pares 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 21 y el X fueron submetacéntricos, y todos los demás autosomas con el cromosoma Y resultaron acrocéntricos (Tabla 2). El cromosoma X resultó submetacéntrico mediano, correspondiendo al $4.25\pm 0.51\%$ del complemento total y el cromosoma Y resultó acrocéntrico, siendo el más pequeño ($0.90\pm 0.06\%$) del complemento. El patrón de bandas G (Fig. 11) permitió individualizar y homologar los elementos de cada par autosómico de manera segura e identificar el patrón de bandas de los cromosomas sexuales X e Y (Fig. 11). La longitud en relación al complemento haploide de los cromosomas de *Ch. villosus* se ilustra en el ideograma de la figura 12, donde también se encuentra representado el patrón de bandas G.

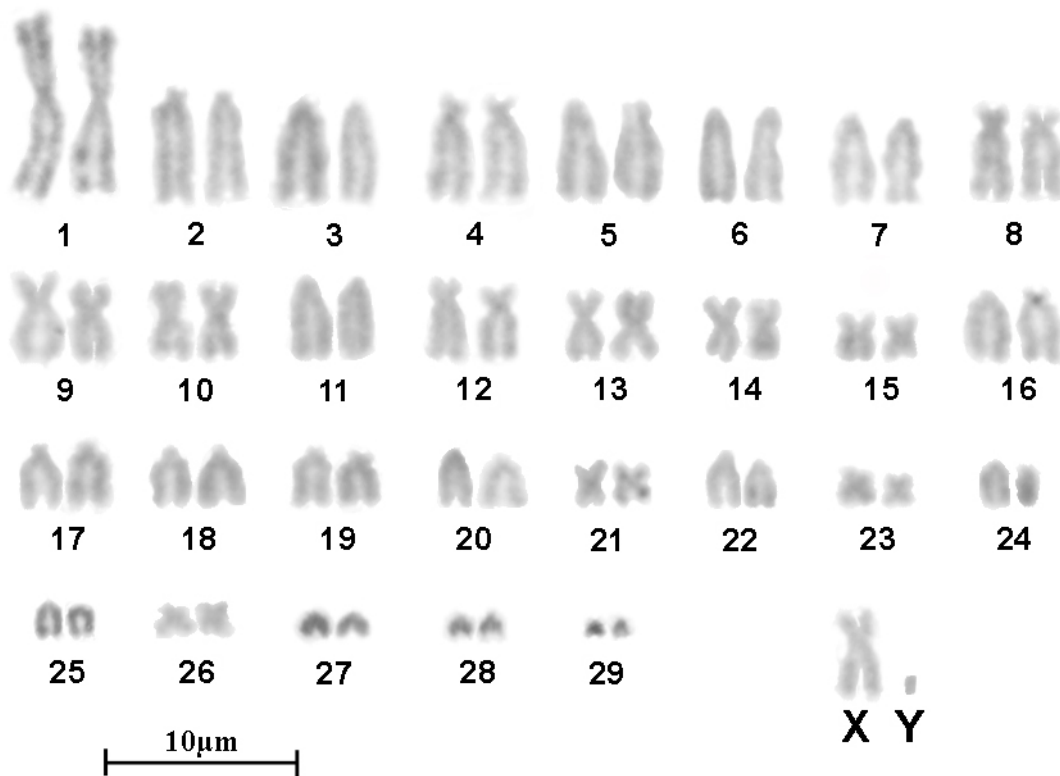


Figura 10: Cariotipo de un ejemplar macho de *Ch. villosus* (2n=60, XX/XY) de Pellegrini, pcia. de Buenos Aires. Tinción carbol fucsina.

Las bandas C evidenciaron heterocromatina repetitiva en las regiones pericentroméricas de la mayoría de los pares cromosómicos (Fig. 13). El Y pudo ser identificado ya que no presentó regiones C positivas (Fig. 13). Todos los cromosomas incluido el X evidenciaron bandas C centroméricas, en los pares 28 y 29 la región heterocromática fue mas notoria que en los demás (Fig. 13). Llamativamente, el brazo corto del par 1 se presentó constituido por una banda C positiva, aunque de menor intensidad que la observada para la región pericentromérica (Fig. 13). Los pares, 3, 11 y 16 presentaron además de la heterocromatina altamente repetitiva centromérica, al igual que el par 1 presentaron heterocromatina extensiva al brazo q (Fig. 13).

N° Cr	LT	p	q	RB	IC	
1.	8,60±0,53	3,79±0,55	4,81±0,65	0,78	0,44	M
2.	5,36±0,31					A
3.	5,08±0,34					A
4.	5,04±0,33	1,39±0,33	3,78±0,42	0,36	0,28	SM
5.	4,78±0,25	1,26±0,33	3,52±0,55	0,35	0,26	SM
6.	4,77±0,24					A
7.	4,46±0,21					A
8.	4,44±0,15	1,21±0,25	3,21±0,29	0,37	0,27	SM
9.	4,13±0,23	1,21±0,38	2,88±0,45	0,42	0,29	SM
10.	3,85±0,28	1,20±0,42	2,63±0,51	0,45	0,31	SM
11.	3,93±0,41					A
12.	3,78±0,21	1,05±0,29	2,73±0,38	0,35	0,28	SM
13.	3,61±0,27	1,19±0,24	2,40±0,31	0,45	0,33	SM
14.	3,38±0,22	1,11±0,32	2,26±0,21	0,49	0,33	SM
15.	3,09±0,22	0,99±0,31	2,06±0,31	0,48	0,32	SM
16.	3,50±0,23					A
17.	3,25±0,19					A
18.	3,04±0,17					A
19.	2,85±0,18					A
20.	2,60±0,22					A
21.	2,34±0,40	0,84±0,22	1,47±0,30	0,57	0,36	SM
22.	2,34±0,24					A
23.	1,96±0,36	0,74±0,18	1,22±0,27	0,60	0,38	M
24.	1,96±0,18					A
25.	1,83±0,19					A
26.	1,68±0,17	0,64±0,12	1,04±0,12	0,61	0,38	M
27.	1,59±0,18					A
28.	1,45±0,11					A
29.	1,21±0,19					A
X.	4,25±0,51	1,14±0,31	3,02±0,61	0,37	0,26	SM
Y.	0,90±0,06					A

Tabla 2: Proporción de los cromosomas de *Ch. villosus* respecto de largo total del complemento autosómico. LT=Largo total; p= brazo corto; q= Brazo largo; RB= Índice de brazos; IC= índice centromérico. Las medidas fueron realizadas en 3 células de 5 hembras y 5 machos

Con la técnica de tinción argéntica se localizaron los organizadores nucleolares en los pares: 6, 12 y 26 del cariotipo mitótico (Fig. 14), que fueron coincidentes con la ubicación de los mismos en el complejo sinaptonémico de espermatocitos en paquitene (Sciurano et al. 2006, Fig. 15).

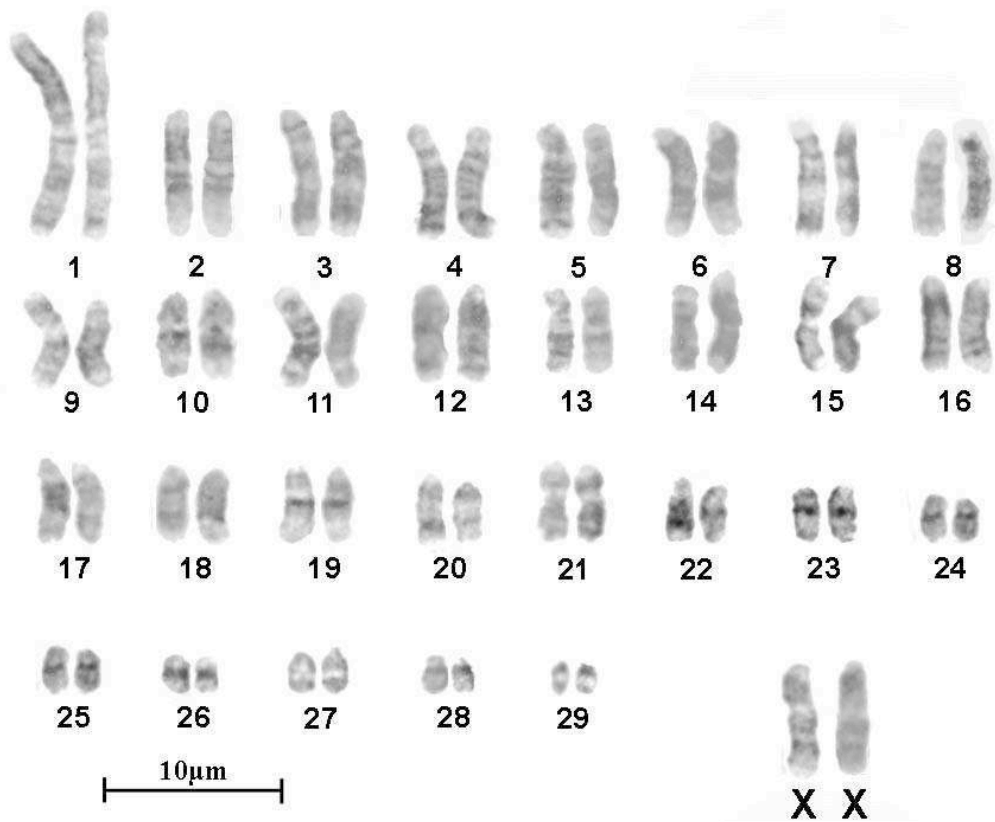


Figura 11: Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de un ejemplar hembra de *Ch. villosus* de Santo Domingo, pcia. de Córdoba.

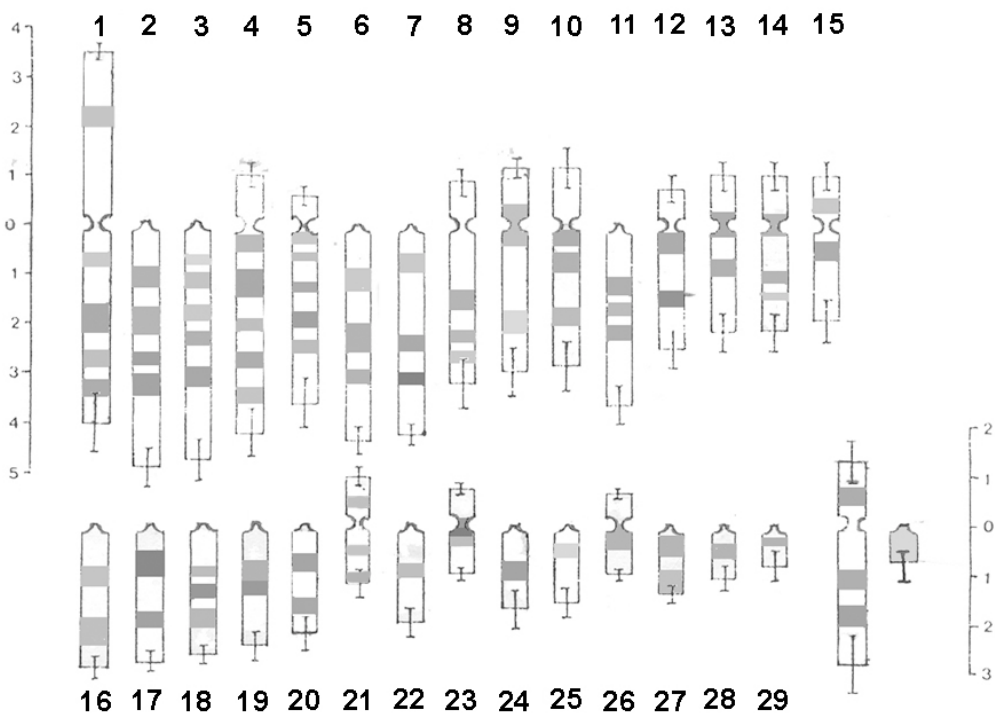


Figura 12: Ideograma representativo del cariotipo de *Ch. villosus* (mostrando el set haploide de cromosomas), indicando la proporción de cada cromosoma respecto del total del complemento autosómico. Las bandas G fueron situadas calculando la ubicación, sobre un total de diez cariotipos elongados.

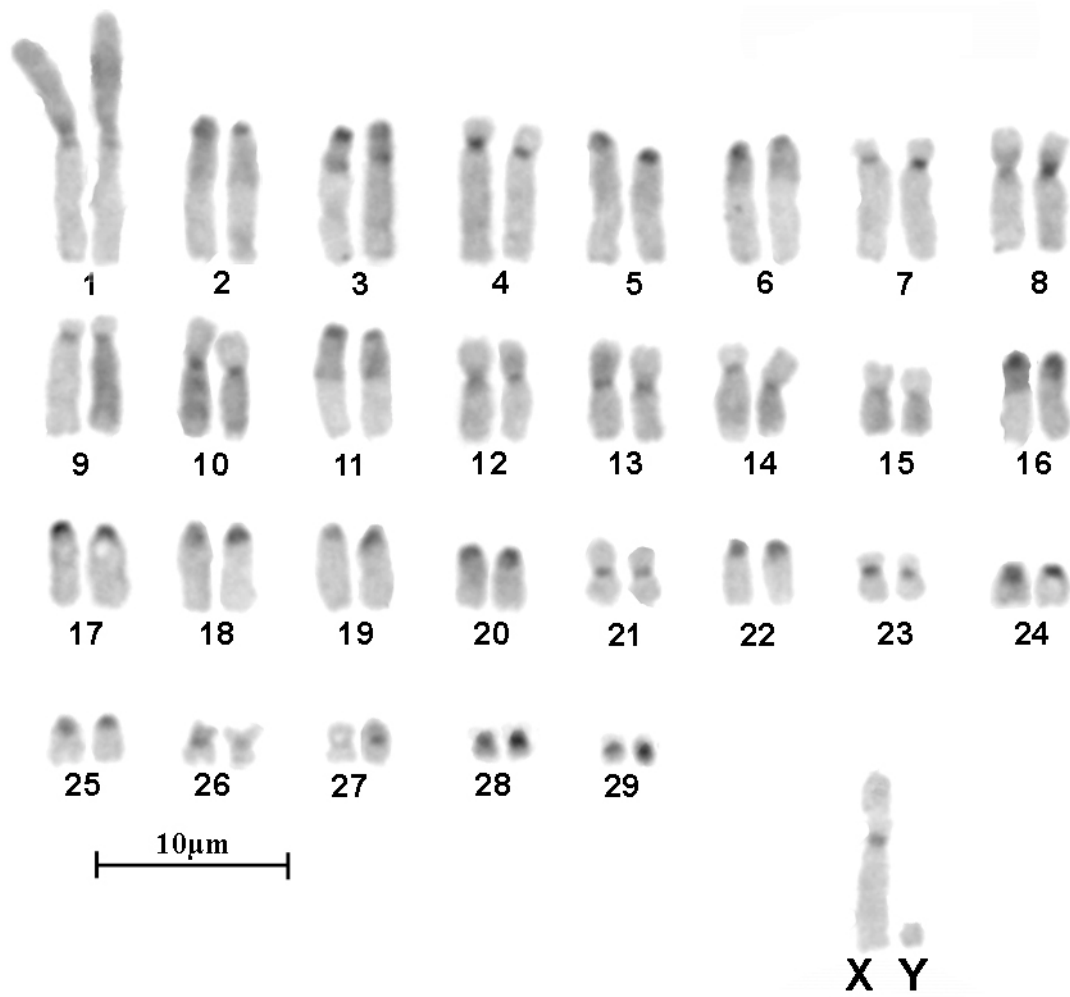


Figura 13: Cariotipo mostrando el patrón de bandas C de un ejemplar macho de *Ch. villosus* de Loma Verde, pcia. de Buenos Aires. El cromosoma Y no presenta cromatina apreciable por este método.

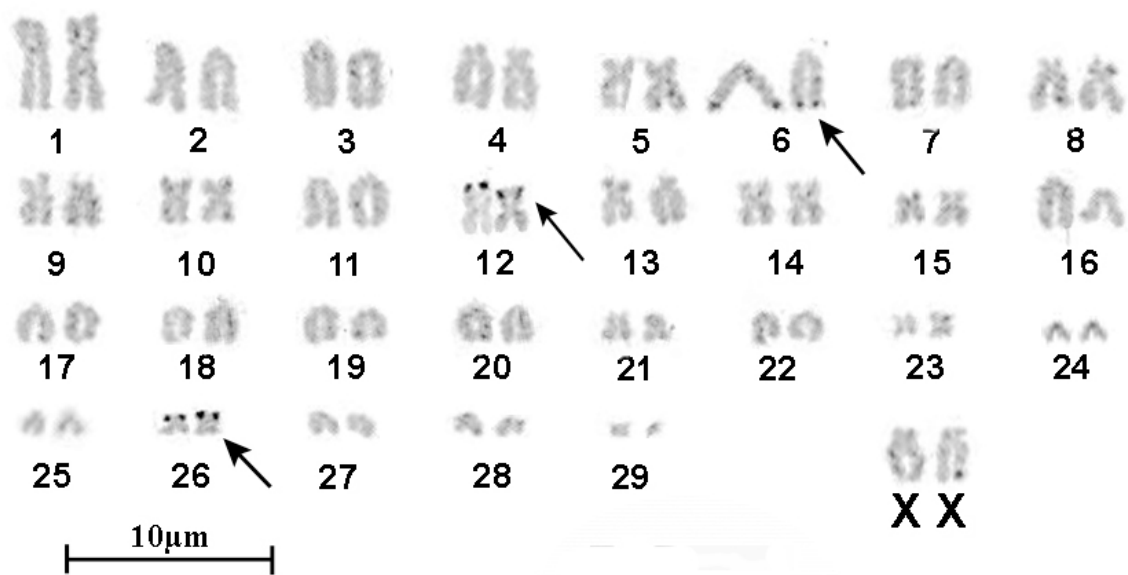


Figura 14: Cariotipo mostrando la localización de los organizadores nucleolares de un ejemplar hembra de *Ch. villosus* de Pipinas, pcia. de Buenos Aires. Tinción argéntica.

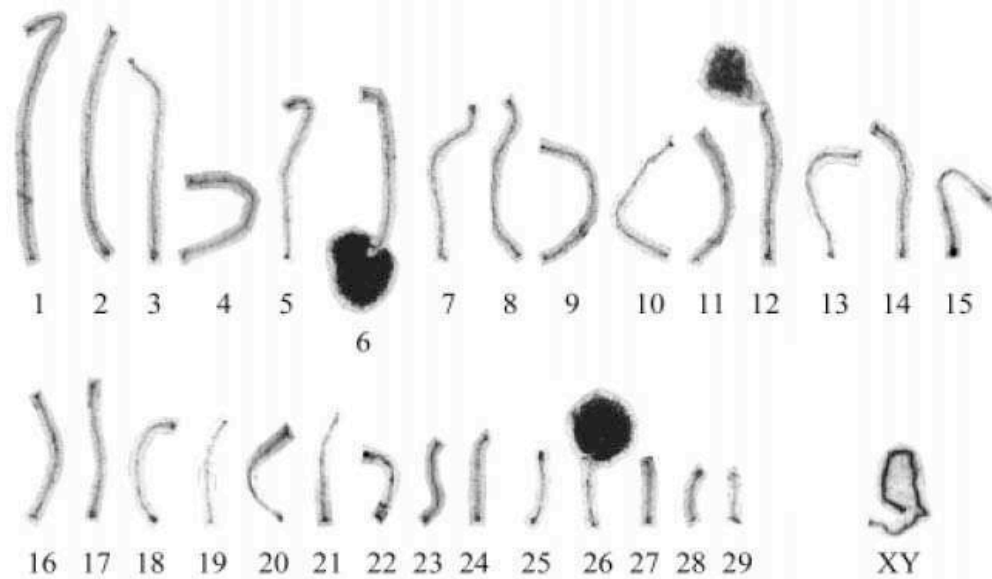


Figura 15: Cariotipo de complejo sinaptonémico de un ejemplar macho de *Ch. villosus* de Navarro, pcia. de Buenos Aires. Puede apreciarse la localización de los tres organizadores nucleolares. Tinción argéntica (obtenido de Sciurano et al. 2006).

2.1.2. Línea somática - reordenamientos cromosómicos en *Ch. villosus*

Se encontraron reordenamientos cromosómicos para el par 1, siempre en heterocigosis, en 13 ejemplares de *Ch. villosus*. Los mismos, consistieron en una inversión de tipo pericéntrica en uno de los elementos metacéntricos del par, dando lugar a un cromosoma submetacéntrico grande y como resultado un par heteromórfico (un cromosoma metacéntrico y otro submetacéntrico, Fig. 16). Este reordenamiento fue localizado exclusivamente en ejemplares pertenecientes a: Pellegrini (n=3) y General Madariaga (n=2) pcia. de Buenos Aires.

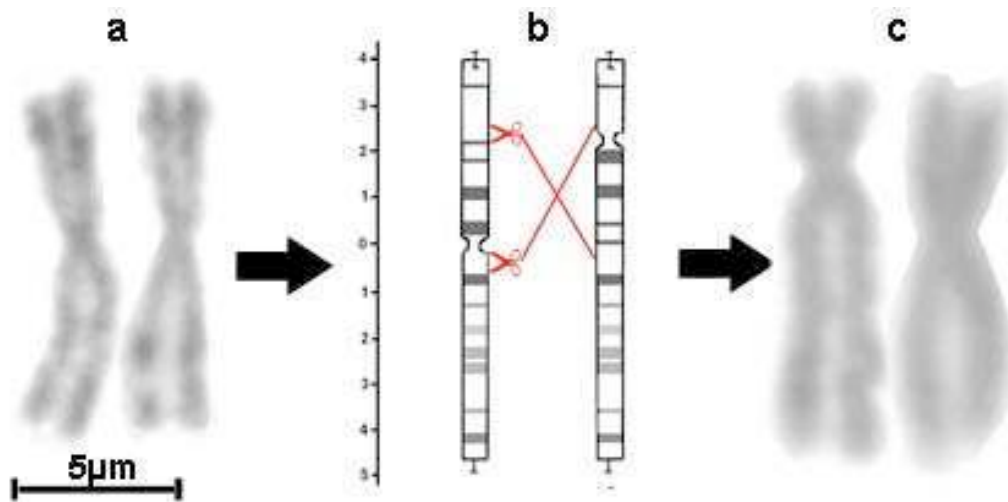


Figura 16: Reordenamientos del par 1 en *Ch. villosus*. a. par 1 normal (del individuo de la figura 10); b. ilustración de la inversión observada en este par; c. par 1 rearmado correspondiente a un ejemplar hembra de Madariaga, pcia. de La Pampa.

2.1.3. Línea germinal - Evans

Mediante la técnica de Evans et al. (1964) se estudió la segregación cromosómica en los estadios meióticos de diacinesis/metafase I (MI) y metafase II (MII, Fig. 17). En diacinesis/metafase I se observaron 29 bivalentes autosómicos y el bivalente sexual XY (Fig. 17). La MI, nos permitió, durante el apareamiento de los cromosomas, localizar el número y ubicación de los quiasmas por bivalente cromosómico. Los bivalentes que presentaron quiasmas observables fueron: 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 16, 21 (Fig. 17). La MII nos permitió estudiar la segregación meiotica. En MII: de 50 metafases pudimos observar que menos de un 3% tenían mala segregación y además que aproximadamente el 50% poseían el Y.

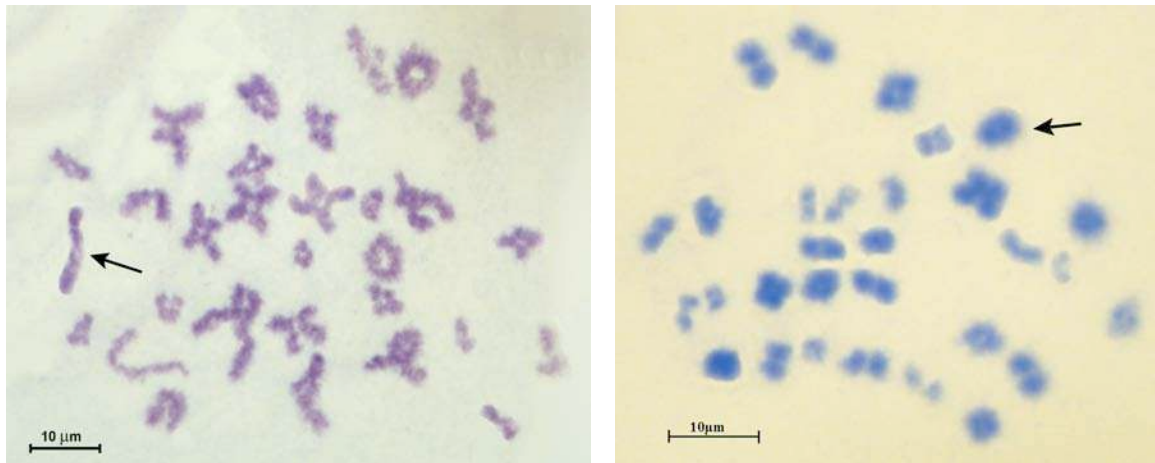


Figura 17: espermatocitos de *Ch. villosus* en: diacinesis/metafase I (izquierda), la flecha indica el bivalente sexual XY;y metafase II (derecha), la flecha indica el cromosoma X.

2.1.4. Línea germinal – técnica de complejo sinaptonémico

Se analizó un total de 100 núcleos de espermatocitos en paquitene, se observaron 29 bivalentes autosómicos completamente apareados y el cuerpo XY (Fig. 18). La localización de los centrómeros mostró 13 componentes bibraquiados autosómicos (3 metacéntricos y 10 submetacéntricos) y 16 acrocéntricos (Fig. 18). El bivalente 1 fue identificado como el más largo CS (con un cinetocoro medial), así como los dos bivalentes autosómicos más pequeños (27, 28 y 29), pudieron ser identificados fácilmente (Fig. 18). A partir del estudio meiótico de espermatocitos en paquitene, se corroboraron la morfología y el NF obtenido en los cariotipos mitóticos (Fig. 18).

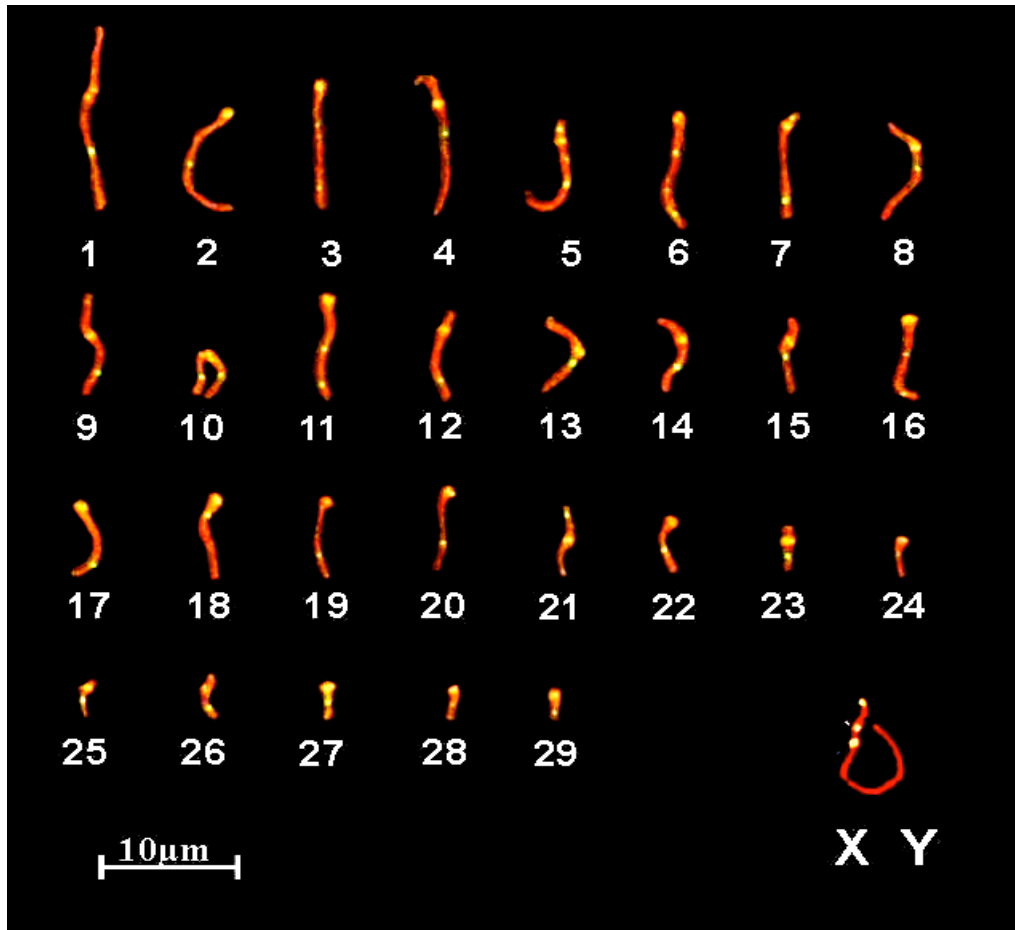


Figura 18: Cariotipo de complejo sinaptonémico de *Ch. villosus*. En rojo se marcan los ejes con anticuerpo anti-SMC3, superpuestos con la señal verde del anticuerpo que reconoce las proteínas del cinetocoro (suero CREST) y del anticuerpo que reconoce los nódulos de recombinación (anti-MLH-1).

En los espermatocitos en paquitene de *Ch. villosus* la posición de los cinetocoros de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY fueron claramente establecida, el eje del cromosoma Y es acrocéntrico y el X submetacéntrico (Fig. 19). Se observó un apareamiento total entre el cromosoma X y el cromosoma Y en *Ch. villosus* (Fig. 19).

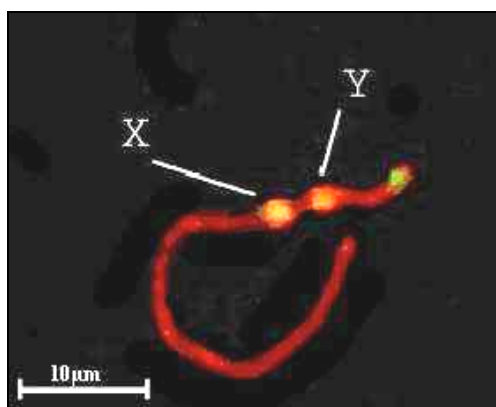


Figura 19: Par sexual XY apareado durante la meiosis I donde se observa la morfología de ambos cromosomas (X e Y). En rojo se marcan los ejes con un anticuerpo anti-SMC3, la misma fue superpuesta con la señal verde del anticuerpo que reconoce las proteínas del cinetocoro (suero CREST) y del anticuerpo que reconoce los nódulos de recombinación (anti-MLH-1). En verde puede observarse el nódulo de recombinación.

Se registraron en promedio un total de 41,5 focos de la proteína MLH1 por núcleo con un rango de 37 a 47 focos en *Ch. villosus* (Fig. 18). Los recuentos realizados no incluyeron el par sexual XY, debido a que, si bien siempre debería haber un evento de recombinación en el par sexual, la presencia de un foco es variable según el subestadío del paquitene. Siempre se observó, la presencia de al menos un foco por bivalente cromosómico, aunque en los bivalentes de mayor tamaño se observaron más de un foco en algunas ocasiones (Fig. 18). Los focos presentaron mayor frecuencia de distribución en posiciones intersticiales y distales a los centrómeros que en proximidad de estos (Fig. 17).

2.2. *Chaetophractus vellerosus*

2.2.1. *Línea somática - caracterización citogenética de la especie en sus dos distribuciones*

En los animales capturados y estudiados pudo determinarse el cariotipo en distintas localidades pertenecientes a cada una de las dos distribuciones disjuntas de *Ch. vellerosus* (Figs. 20 y 21, ver también fig. 7, mapa de las distribuciones), llevándose a cabo la caracterización citogenética a nivel γ para la especie. En todos los animales el número nodal fue $2n=62$ XX/XY (Figs. 20 y 21). Los pares 1, 5, 9, 10, 12, 16, 20, 22, 27 y 30 fueron metacéntricos, los pares 2, 4, 6, 7, 8, y el X fueron submetacéntricos, mientras que los demás cromosomas, incluido el Y resultaron acrocéntricos (Tabla 3). El cromosoma X resultó submetacéntrico mediano correspondiendo al $4,87 \pm 0,47\%$ del complemento, y el cromosoma Y acrocéntrico, siendo el más pequeño del complemento correspondiendo al $0,86 \pm 0,22\%$ (Figs. 20 y 21, tabla 3).

El número fundamental (NF), resultó variable entre los individuos estudiados. En los individuos pertenecientes a la distribución principal se determinó un NF=90, quienes presentaron un pequeño brazo en el cromosoma 7, condición de doble homocigosis (DH, Fig. 20). Mientras que en los individuos de la distribución secundaria se determinó un NF=88 condición de simple homocigosis (SH, Fig. 21)

Los pares 1 (metacéntrico de mayor tamaño) y 3 (acrocéntrico de mayor tamaño) pudieron ser identificados claramente por morfología y tamaño (Figs. 20 y 21).

El patrón de bandas G permitió homologar entre sí los elementos de cada par autosómico, y caracterizar el par XY; permitió además, caracterizar el par 7, para detectar la presencia o ausencia de un brazo polimórfico (Fig. 22).

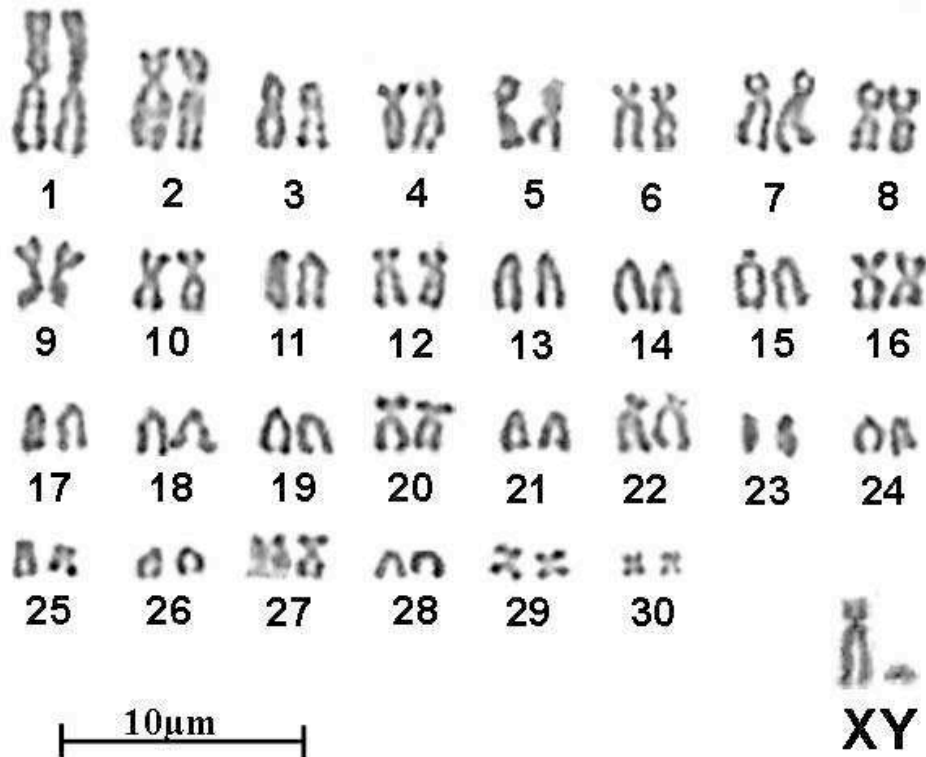


Figura 20: Cariotipo de ejemplar macho de *Ch. vellerosus* ($2n=62$, XX/XY, NF=90) de Santo Domingo, pcia. de Córdoba, dentro de la distribución principal de la especie. Tinción carbol fucsina.

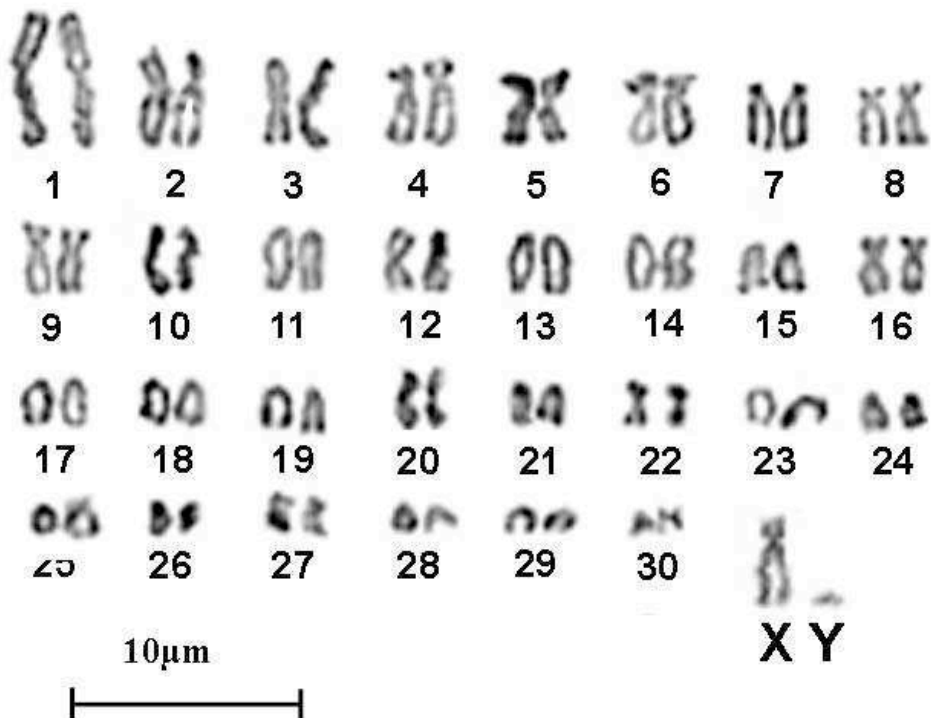


Figura 21: Cariotipo de una ejemplar macho de *Ch. vellerosus* ($2n=62$ XX/XY, NF=90) de Magdalena, pcia. de Buenos Aires, dentro de la distribución secundaria de la especie. Tinción carbol fucsina.

N°	LT	p	q	RB	IC	
1	9,23 ± 1,40	3,98 ± 0,54	4,65 ± 0,68	0,86	0,43	M
2	5,41 ± 0,51	1,57 ± 0,27	3,59 ± 0,54	0,44	0,29	SM
3	4,57 ± 0,41		4,57 ± 0,41			A
4	4,40 ± 0,34	1,25 ± 0,26	2,89 ± 0,21	0,43	0,28	SM
5	4,05 ± 0,23	1,75 ± 0,27	2,07 ± 0,21	0,85	0,43	M
6	3,82 ± 0,17	1,21 ± 0,28	2,50 ± 0,25	0,48	0,31	SM
7	3,82 ± 0,36		3,82 ± 0,36			A
7a	3,80 ± 0,36	0,60 ± 0,06	3,60 ± 0,16	0,16	0,15	SM
8	3,59 ± 0,12	1,07 ± 0,24	2,44 ± 0,18	0,44	0,29	SM
9	3,72 ± 0,22	1,55 ± 0,14	1,93 ± 0,22	0,80	0,41	M
10	3,55 ± 0,19	1,40 ± 0,24	1,92 ± 0,28	0,73	0,39	M
11	3,55 ± 0,22		3,55 ± 0,22			A
12	3,34 ± 0,17	1,08 ± 0,18	2,13 ± 0,36	0,51	0,32	SM
13	3,33 ± 0,20		3,33 ± 0,20			A
14	3,24 ± 0,19		3,24 ± 0,19			A
15	3,12 ± 0,18		3,12 ± 0,18			A
16	3,06 ± 0,21	1,15 ± 0,28	1,66 ± 0,30	0,69	0,37	M
17	2,93 ± 0,16		2,93 ± 0,16			A
18	2,73 ± 0,15		2,73 ± 0,15			A
19	2,60 ± 0,17		2,60 ± 0,17			A
20	2,67 ± 0,37	1,01 ± 0,20	1,37 ± 0,29	0,73	0,38	M
21	2,42 ± 0,21		2,42 ± 0,21			A
22	2,13 ± 0,42	0,92 ± 0,23	1,08 ± 0,24	0,85	0,43	M
23	2,26 ± 0,23		2,26 ± 0,23			A
24	2,21 ± 0,21		2,21 ± 0,21			A
25	2,10 ± 0,24		2,10 ± 0,24			A
26	1,98 ± 0,27		1,98 ± 0,27			A
27	1,76 ± 0,24	0,82 ± 0,17	0,90 ± 0,15	0,91	0,46	M
28	1,81 ± 0,22		1,81 ± 0,22			A
29	1,45 ± 0,30		1,45 ± 0,30			A
30	1,48 ± 0,34	0,61 ± 0,18	0,76 ± 0,20	0,80	0,41	M
X	4,87 ± 0,47	1,23 ± 0,23	3,28 ± 0,71	0,43	0,24	SM
Y	0,86 ± 0,22		0,86 ± 0,22			A

Tabla 3: Proporción de los cromosomas de *Ch. vellerosus* respecto de largo total del complemento autosómico. LT=Largo total; p= brazo corto; q= Brazo largo; RB= Índice de brazos; IC= índice centromérico. Las medidas fueron realizadas en 3 células de 5 hembras y 5 machos para cada una de las distribuciones. El par 7 (**resaltado en negrita**) presentó dos variantes: con un brazo pequeño (7a) y sin brazo (7).

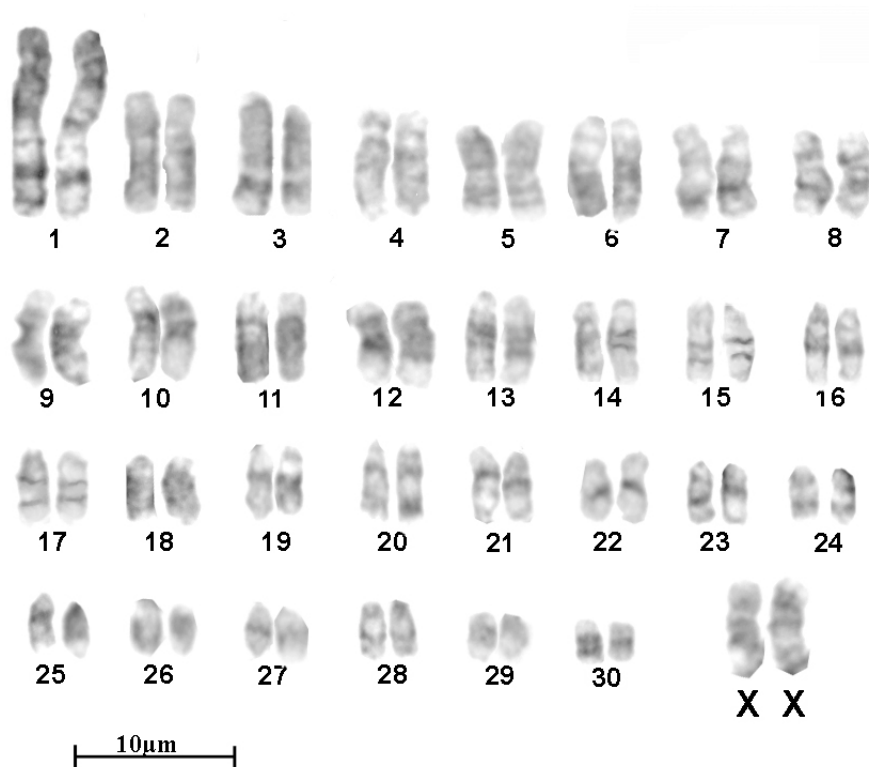


Figura 22: Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de un ejemplar hembra de *Ch. vellerosus* de Pipinas, pcia. de Buenos Aires, dentro de la distribución secundaria de la especie.

Las bandas C evidenciaron heterocromatina en las regiones pericentroméricas de la mayoría de los pares cromosómicos (Fig. 23). El cromosoma Y pudo ser identificado, ya que no evidenció heterocromatina altamente repetitiva detectable (Fig. 23). El cromosoma X y la mayoría de los cromosomas presentaron bandas C pericentroméricas pequeñas, en el par 27 la región heterocromática reveló una gran masa centromérica en parte del brazo p (Fig. 23). El par uno, al igual que en *Ch. villosus*, evidenció en su totalidad el brazo corto constituido por heterocromatina (Fig. 23).

La longitud en relación al complemento haploide de los cromosomas de *Ch. vellerosus* se ilustra en el ideograma de la figura 24, donde también se encuentra representado el patrón de bandas G y C.

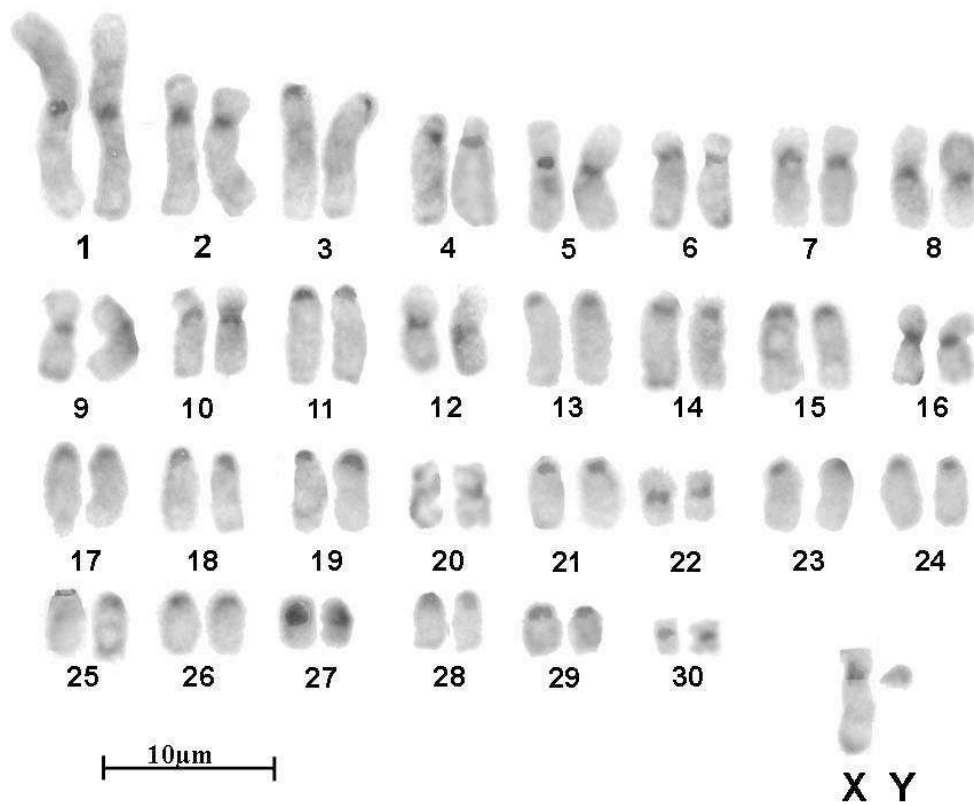


Figura 23: Cariotipo mostrando el patrón de bandas C de un ejemplar macho de *Ch. vellerosus* de Pipinas, pcia. de Buenos Aires, dentro de la distribución secundaria de la especie. El cromosoma Y no presenta cromatina apreciable por este método.

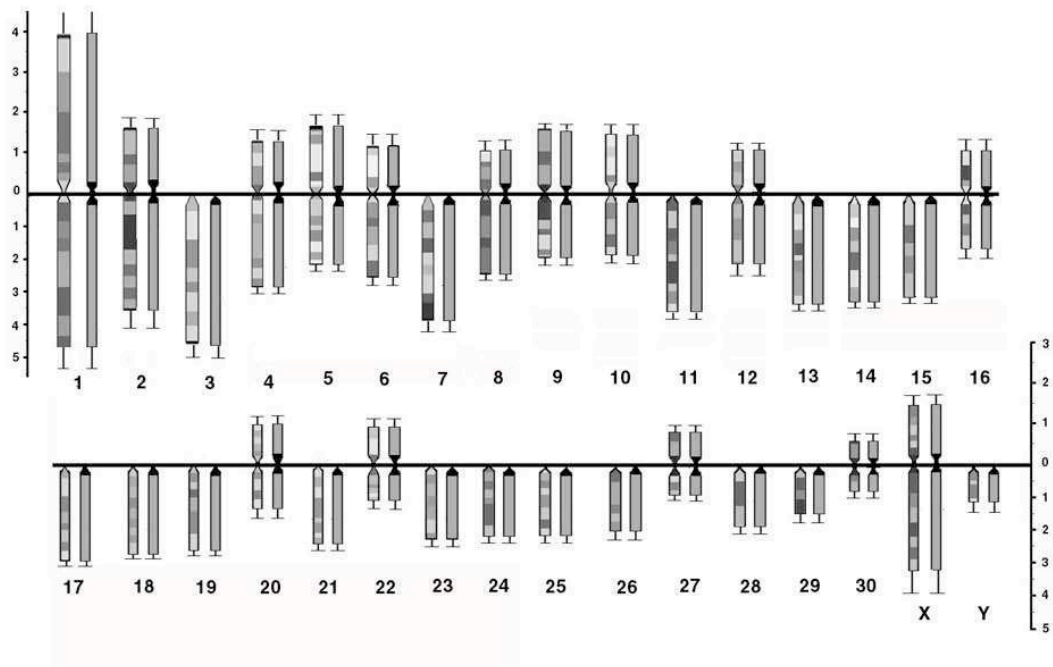


Figura 24: Ideograma representativo del cariotipo de *Ch. vellerosus* (mostrando el set haploide de cromosomas), indicando la proporción de cada cromosoma respecto del total del complemento autosómico. Las bandas G y C fueron situadas calculando la ubicación, sobre un total de diez cariotipos elongados. En esta representación gráfica, el cromosoma 7 presenta una morfología acrocéntrica, condición de simple homocigosis.

Con la técnica de tinción argéntica se localizaron los organizadores nucleolares: 4, 19 y 22 tanto en cromosomas mitóticos (Fig. 25) como en el complejo sinaptonémico de espermatoцитos en paquitene (Fig. 26).

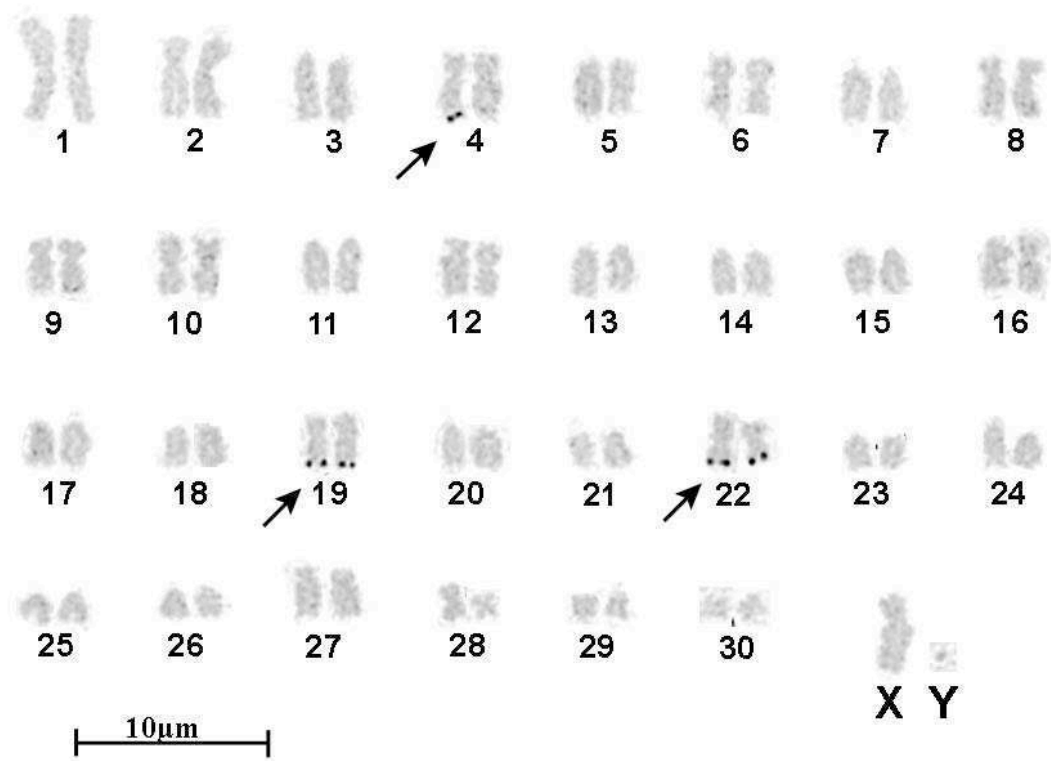


Figura 25: Cariotipo mostrando la localización de los organizadores nucleolares de un ejemplar macho de *Ch. vellerosus* de Pipinas, pcia. de Buenos Aires, dentro de la distribución secundaria de la especie. Tinción argéntica.

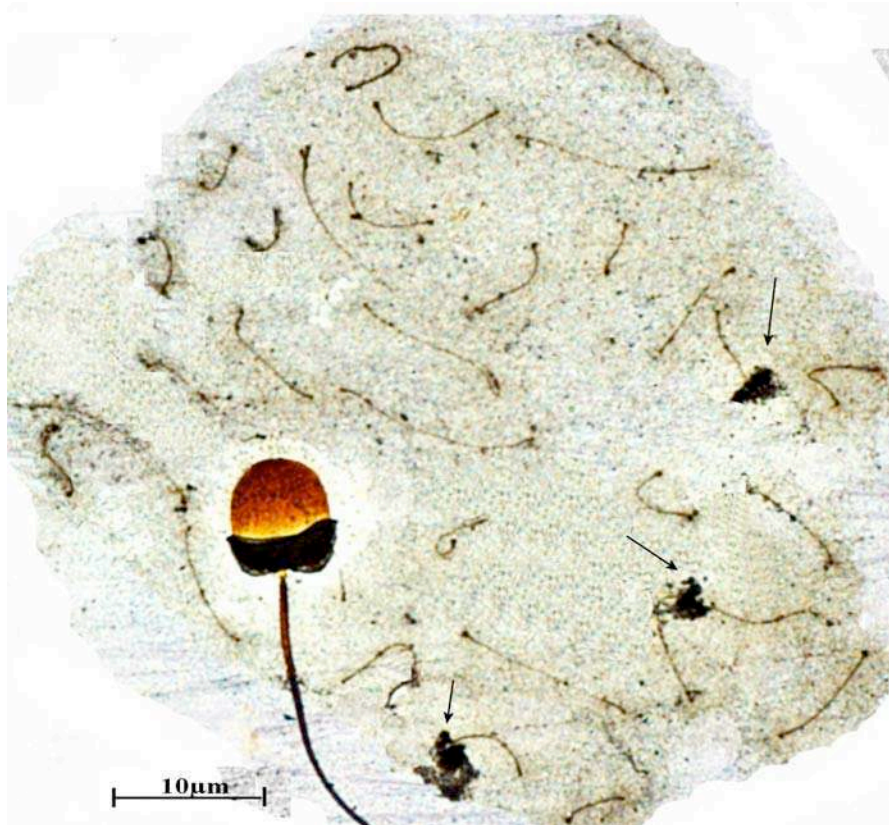


Figura 26: Espermatocito en paquitene *Ch. vellerosus* de pipinas, pcia. de Buenos Aires Puede apreciarse la localización de los organizadores nucleolares en los pares bibraquiados 4,19 y 22 (flechas). Tinción argéntica.

2.2.2. Línea germinal - Evans

Mediante la técnica de Evans se estudió la segregación cromosómica en los estadios meióticos de diacinesis/metafase I (MI) y metafase II (MII, Fig 27). En diacinesis/metafase I se observaron 30 bivalentes autosómicos y el bivalente sexual XY. La MI nos permitió durante el apareamiento de los cromosomas localizar el número y ubicación de los quiasmas por bivalente cromosómico. Los bivalentes que presentaron dos quiasmas observables fueron: 1, 3 5, 6, 8, 10, 12, 16, 19, 22, 27, 28 (Fig. 27). La MII nos permitió estudiar la segregación meiotica. En MII: de 50 metafases pudimos observar que menos de un 6 % tenían mala segregación y además que aproximadamente el 50% poseían el Y.

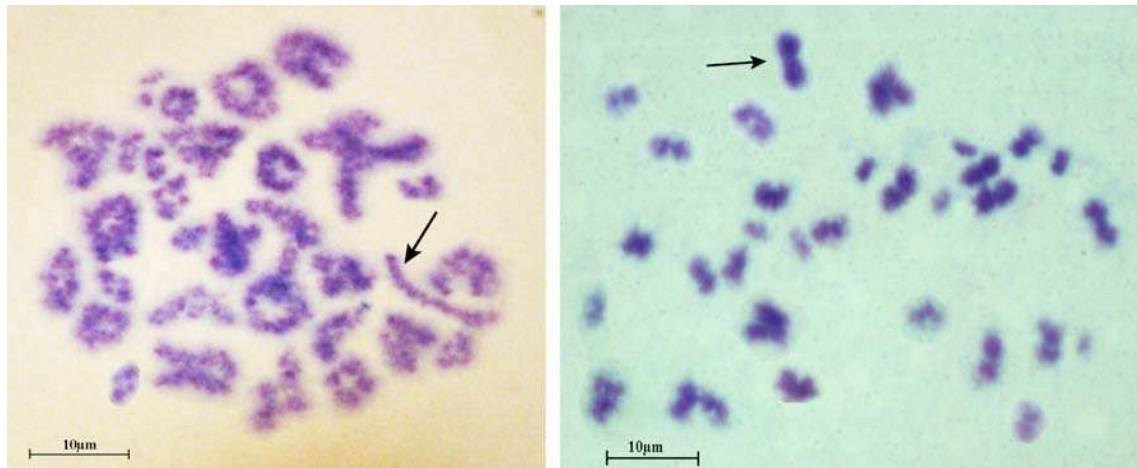


Figura 27: espermatocitos de *Ch. vellerosus* en: diacinesis/metafase I (izquierda), la flecha indica el bivalente sexual XY;y metafase II (derecha), la flecha indica el cromosoma X.

2.2.2. Línea germinal – Técnica de complejo sinaptonémico

En un total de 100 núcleos de espermatocitos en paquitene, se observaron 30 bivalentes autosómicos completamente apareados y el cuerpo XY (Fig. 28). La localización de los centrómeros exhibió 14 componentes bibraquiados autosómicos (10 metacentricos y 4 submetacentricos, y el cromosoma X) y 16 acrocéntricos mas el Y. El bivalente 1 fue identificado como el más largo CS (con un centrómero medial) (Fig. 28), así como los bivalentes autosómicos más pequeños con sus respectivas morfologías, pudieron ser identificados fácilmente (Fig. 28)

En los espermatocitos en paquitene de *Ch. vellerosus* la posición de los cinetocoros en los cromosomas sexuales fue claramente establecida, el eje del cromosoma Y es acrocéntrico y el X submetacentrico. A partir del estudio meiótico de espermátocitos en paquitene, se corroboró la morfología y el NF obtenido en los cariotipos mitóticos de las dos poblaciones (Fig. 28).

Se registraron en promedio del total $39,16 \pm 2,08$ focos de la proteína MLH1 por núcleo con un rango de 35 a 43 focos (Fig. 28). Los recuentos realizados no incluyeron el par sexual XY. En todos los casos fue observada la presencia de al

menos un foco por bivalente cromosómico, aunque acorde al largo de los brazos se pudo observar la presencia de 2 focos en los bivalentes 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 16. Los focos presentaron mayor frecuencia de distribución en posiciones intersticiales y distales a los centrómeros que en proximidad de estos (Fig. 28). También en esta especie se observó un apareamiento total entre el cromosoma X y el cromosoma Y (Fig. 28).

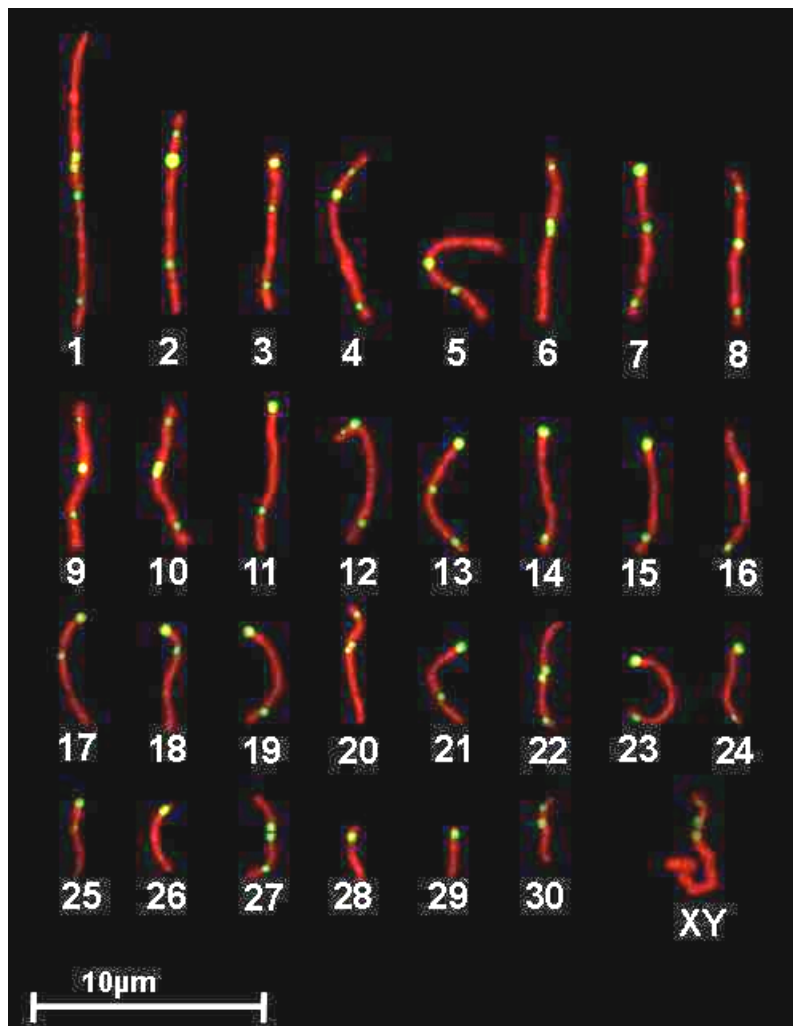


Figura 28: Cariotipo de complejo sinaptonémico de *Ch. vellerosus*. En rojo se marcan los ejes con anticuerpo anti-SMC3, superpuestos con la señal verde del anticuerpo que reconoce las proteínas del cinetocoro (suero CREST) y del anticuerpo que reconoce los nódulos de recombinación (anti-MLH-1).

2.3. *Zaedyus pichiy*

2.3.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie

Al igual que en las otras especies se llevo a cabo la caracterización citogenética a nivel γ , con técnicas de tinción diferencial de bandeado G, C, NOR, de *Z. pichiy*. El cariotipo presento un número modal de $2n= 62$ XX/XY y un NF de 98. Los pares cromosómicos 1, 6, 7, 9, 13, 14, 20, 24, 27 y 30 resultaron metacéntricos, los pares 2, 3, 5, 8, 10, 11 submetacéntricos y los pares 4, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 28 y 29 acrocéntricos (Tabla 4, Fig. 29). Con las medidas cromosómicas, en porcentaje del set haploide, se confeccionó el ideograma para la especie (Tabla 4, Fig. 30). El cromosoma X resultó submetacéntrico mediano con $2,82 \pm 0,25\%$ del complemento y el cromosoma Y acrocéntrico siendo el más pequeño con $0,56 \pm 0,15\%$ del complemento (Tabla 4, Fig. 30).

Las bandas G, permitieron homologar los elementos de cada par e individualizar de manera segura cada uno de los mismos (Fig. 31)

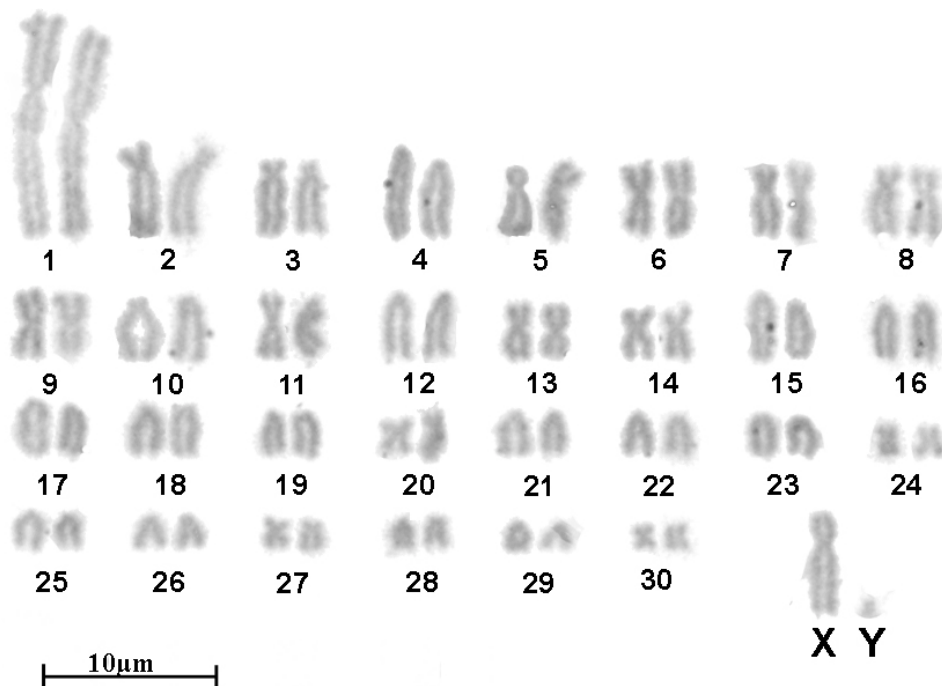


Figura 29: Cariotipo de ejemplar macho de *Z. pichiy* de Portezuelo, pcia. de Santa Cruz. Tinción carbol fucsina.

Nº	Lt	p	q	IC	RB	
1	4,35 ± 0,41	2,02 ± 0,21	2,33 ± 0,29	0,47	0,88	M
2	2,68 ± 0,38	0,73 ± 0,18	1,77 ± 0,11	0,28	0,42	SM
3	2,44 ± 0,18	0,67 ± 0,10	1,74 ± 0,18	0,27	0,38	SM
4	2,36 ± 0,20		2,36 ± 0,20	0,00	0,00	A
5	2,18 ± 0,37	0,65 ± 0,12	1,61 ± 0,17	0,31	0,39	SM
6	2,11 ± 0,20	0,97 ± 0,14	1,15 ± 0,12	0,46	0,84	M
7	2,05 ± 0,62	0,80 ± 0,26	1,23 ± 0,40	0,39	0,66	M
8	1,93 ± 0,15	0,54 ± 0,15	1,42 ± 0,32	0,25	0,34	SM
9	1,91 ± 0,19	0,96 ± 0,24	1,04 ± 0,10	0,51	0,92	M
10	1,86 ± 0,16	0,34 ± 0,06	1,50 ± 0,16	0,16	0,19	SM
11	1,83 ± 0,07	0,65 ± 0,11	1,15 ± 0,15	0,36	0,59	SM
12	1,80 ± 0,10		1,80 ± 0,10	0,00	0,00	A
13	1,78 ± 0,13	0,80 ± 0,25	1,00 ± 0,10	0,46	0,83	M
14	1,67 ± 0,11	0,65 ± 0,15	0,98 ± 0,08	0,38	0,66	M
15	1,61 ± 0,07	0,28 ± 0,07	1,50 ± 0,18	0,07	0,09	A
16	1,60 ± 0,08		1,60 ± 0,08	0,00	0,00	A
17	1,50 ± 0,07		1,49 ± 0,07	0,00	0,00	A
18	1,40 ± 0,08		1,40 ± 0,08	0,00	0,00	A
19	1,36 ± 0,06		1,36 ± 0,06	0,00	0,00	A
20	1,35 ± 0,20	0,52 ± 0,08	0,80 ± 0,22	0,39	0,69	M
21	1,31 ± 0,09		1,30 ± 0,09	0,00	0,00	A
22	1,25 ± 0,12		1,25 ± 0,12	0,00	0,00	A
23	1,21 ± 0,12		1,21 ± 0,12	0,00	0,00	A
24	1,13 ± 0,15	0,49 ± 0,07	0,61 ± 0,09	0,43	0,82	M
25	1,10 ± 0,12		1,10 ± 0,12	0,00	0,00	A
26	1,07 ± 0,11		1,07 ± 0,11	0,00	0,00	A
27	0,97 ± 0,16	0,44 ± 0,05	0,53 ± 0,09	0,43	0,76	M
28	0,96 ± 0,10		0,96 ± 0,10	0,00	0,00	A
29	0,92 ± 0,35		0,92 ± 0,35	0,00	0,00	A
30	0,71 ± 0,20	0,33 ± 0,09	0,37 ± 0,10	0,47	0,90	M
X	2,82 ± 0,25	0,83 ± 0,10	1,97 ± 0,19	0,29	0,42	SM
Y	0,56 ± 0,15		0,56 ± 0,15	0,39	0,68	A

Tabla 4: Proporción de los cromosomas de *Z. pichiy* respecto de largo total del complemento autosómico. LT=Largo total; p= brazo corto; q= brazo largo; RB= Índice de brazos; IC= Índice centromérico. Las medidas fueron realizadas en 3 células de 3 hembras y 3 machos.

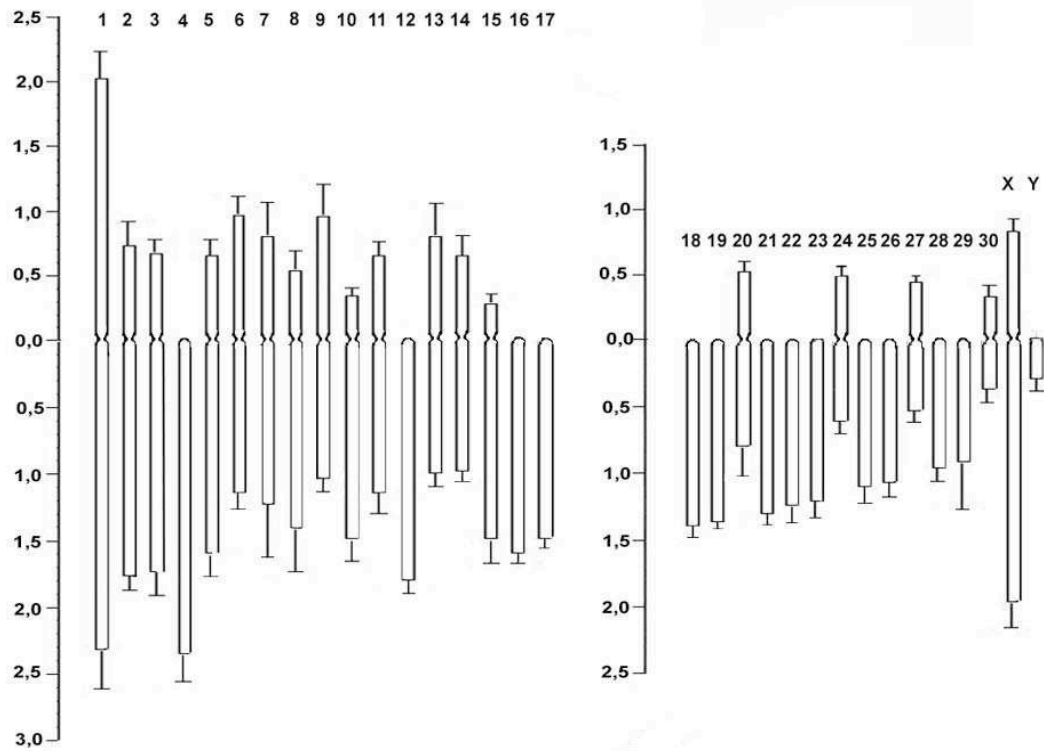


Figura 30: Ideograma representativo del cariotipo de *Z. pichiy* (mostrando el set haploide de cromosomas), indicando la proporción de cada cromosoma respecto del total del complemento autosómico.

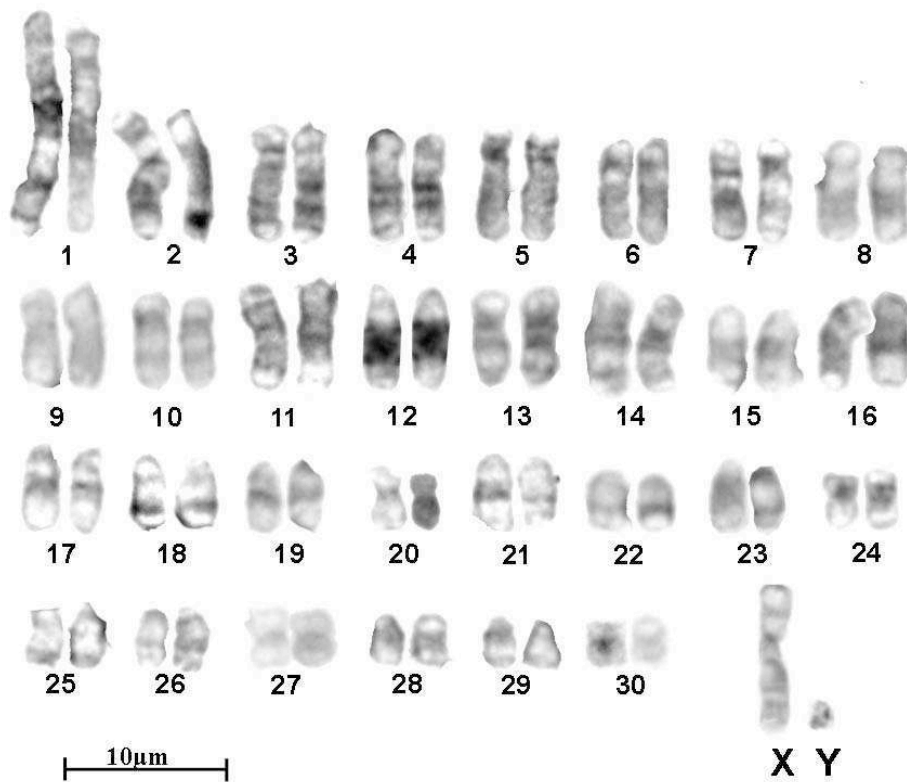


Figura 31: Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de *Z. pichiy* de Puerto Deseado, pcia. de Santa Cruz.

Las técnicas de bandas C revelaron regiones heterocromáticas pericentroméricas pequeñas en todos los cromosomas, y además zonas C positivas en regiones teloméricas e intersticiales en algunos de ellos: 3, 5, 9, 3, 23 (Fig. 32). El par 1 presentó la heterocromatina altamente repetitiva extensiva al brazo q y el cromosoma Y no presentó heterocromátina evidenciable por este método (Fig. 32).

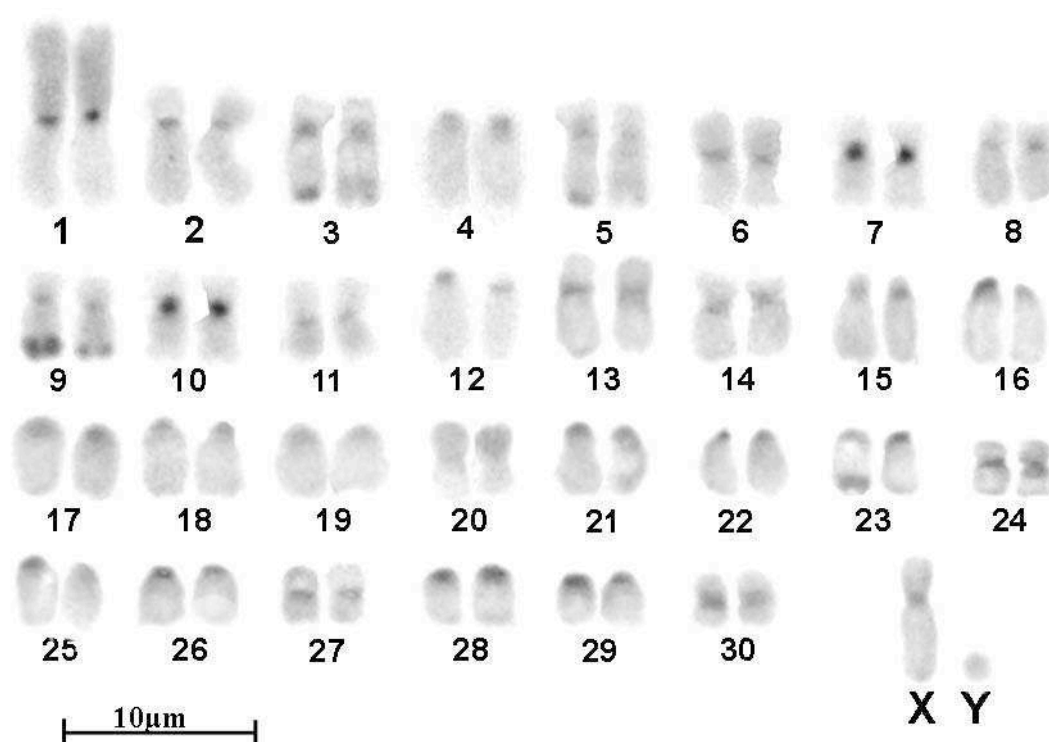


Figura 32: Cariotipo mostrando el patrón de bandas C de un ejemplar macho de *Z. pichiy* de Catriel pcia. de Río Negro. El cromosoma Y no presenta cromatina apreciable por este método.

Con la técnica de tinción argéntica se localizaron en cromosomas mitóticos y en cromosomas meioticos, los tres organizadores nucleolares de esta especie. Se ubicaron, en los pares: 2, 5 y 14 del complemento autosómico mitótico y en espermatoцитos en paquitene del complejos sinaptonémico (Figs. 33 y 34).

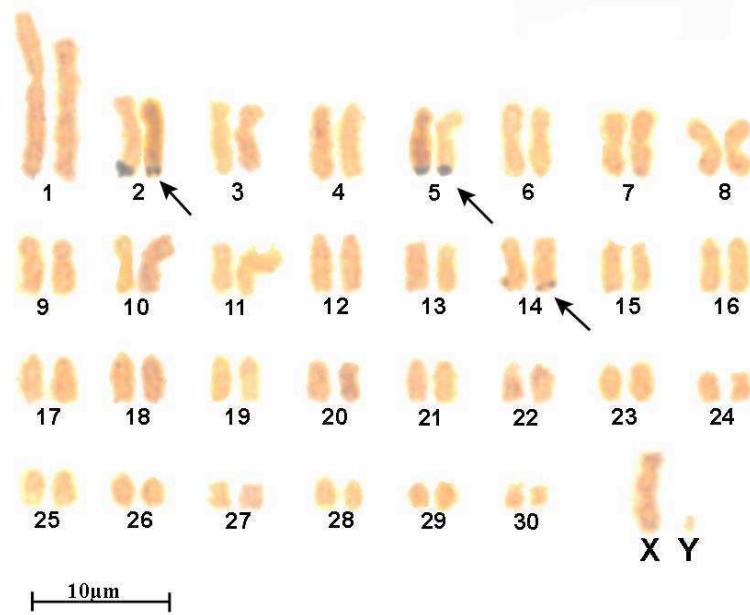


Figura 33: Cariotipo mostrando la localización de los organizadores nucleolares de un ejemplar macho de *Z. pichiy*, Catriel, pcia. de Río Negro. Tinción argéntica.

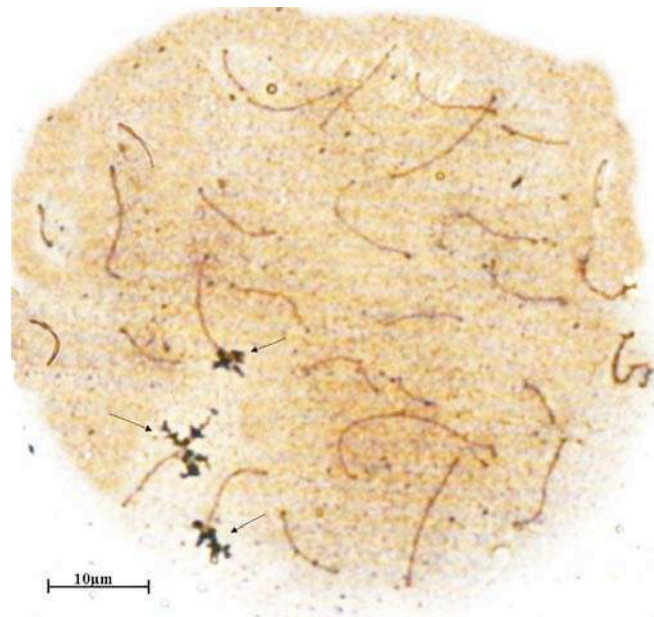


Figura 34: Espermatozoides en paquitene *Z. Pichiy* de Puerto Deseado, pcia. de Santa Cruz. Puede apreciarse la localización de los organizadores nucleolares en los pares bibraquiados 2, 5 y 14 (flechas). Tinción argéntica.

2.3.2. Línea germinal - Evans

Mediante la técnica de Evans et al. (1964) se estudió la segregación cromosómica en los estadios meióticos de diacinesis/metáfase I (MI) y metafase II (MII, Fig. 35).

En diacinesis/metafase I se observaron 30 bivalentes autosómicos y el bivalente sexual XY, confirmando así el sistema de determinación sexual observado previamente en los análisis mitóticos con el $2n=62$ XX/XY (Fig. 35). La MI nos permitió durante el apareamiento de los cromosomas localizar el número y ubicación de los quiasmas por cada bivalente cromosómico. Los bivalentes que presentaron quiasma observable fueron: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 20 (Fig. 35). La MII nos permitió estudiar la segregación meiótica. En MII: de 50 metafases pudimos observar que menos de un 4% tenían mala segregación y además que aproximadamente el 50% poseían el Y.

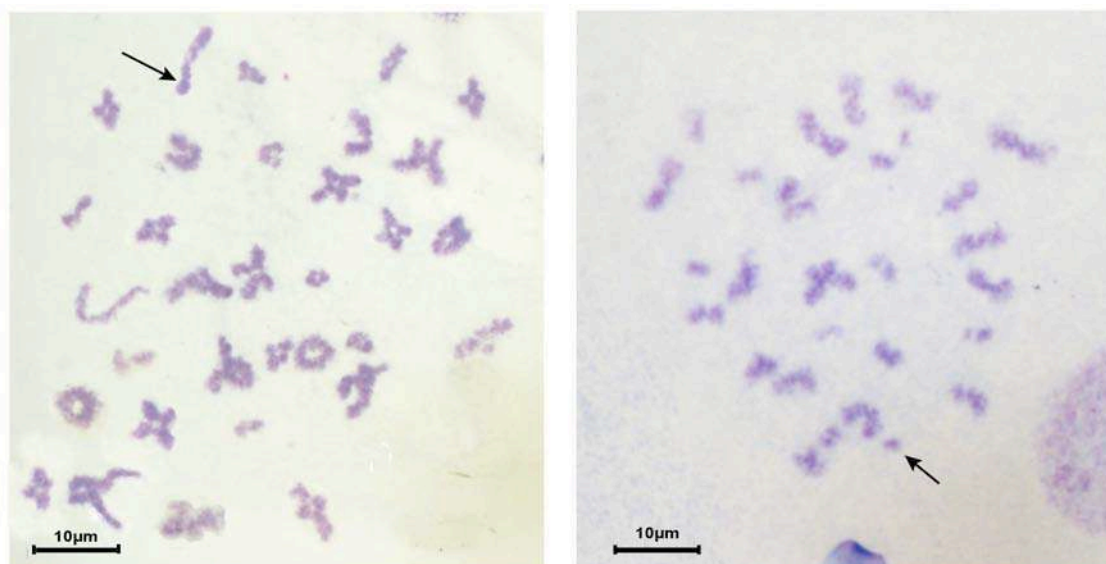


Figura 35: espermatocitos de *Z. pichi*. en: diacinesis/metafase I (izquierda), la flecha indica el bivalente sexual XY; y metafase II (derecha), la flecha indica el cromosoma Y.

2.3.3. Línea germinal – técnica de complejo sinaptonémico

Se analizó un total de 100 núcleos de espermatocitos en paquitene. Los núcleos mostraron 30 bivalentes autosómicos completamente apareados y el cuerpo XY. La localización de los centrómeros exhibió 17 componentes bibraquiados autosómicos

(10 metacentricos y 8 submetacentricos) y 13 acrocéntricos. El bivalente 1 fue identificado como el más largo CS (Fig. 36).

Los espermátocitos en paquitene de *Z. pichiy*, nos permitieron identificar los cinetocoros del cuerpo XY que fueron claramente establecidos. Resultando el X submetacentrico y el Y acrocéntrico (Fig. 36).

A partir del estudio meiótico de espermátocitos en paquitene, se corroboró la morfología y el NF obtenido en los cariotipos mitóticos de la especie (Fig. 36). Al igual que en las otras especies se observó un apareamiento total entre el cromosoma X y el cromosoma Y en *Z. pichiy* (Fig. 36).

Se registraron en promedio un total de $37,55 \pm 1,96$ focos de la proteína MLH1 por núcleo con un rango de 33 a 40 focos en *Z. pichiy* (Fig. 36). Los recuentos realizados no incluyeron el par sexual XY. Siempre se observó, la presencia de al menos un foco por bivalente cromosómico, aunque en los bivalentes de mayor tamaño 1, 2, 3, 4, 12, 16 se observaron mas de un foco en algunas ocasiones (Fig. 36). Los focos se distribuyeron mayormente en posiciones intersticiales y distales a los centrómeros (Fig. 36).

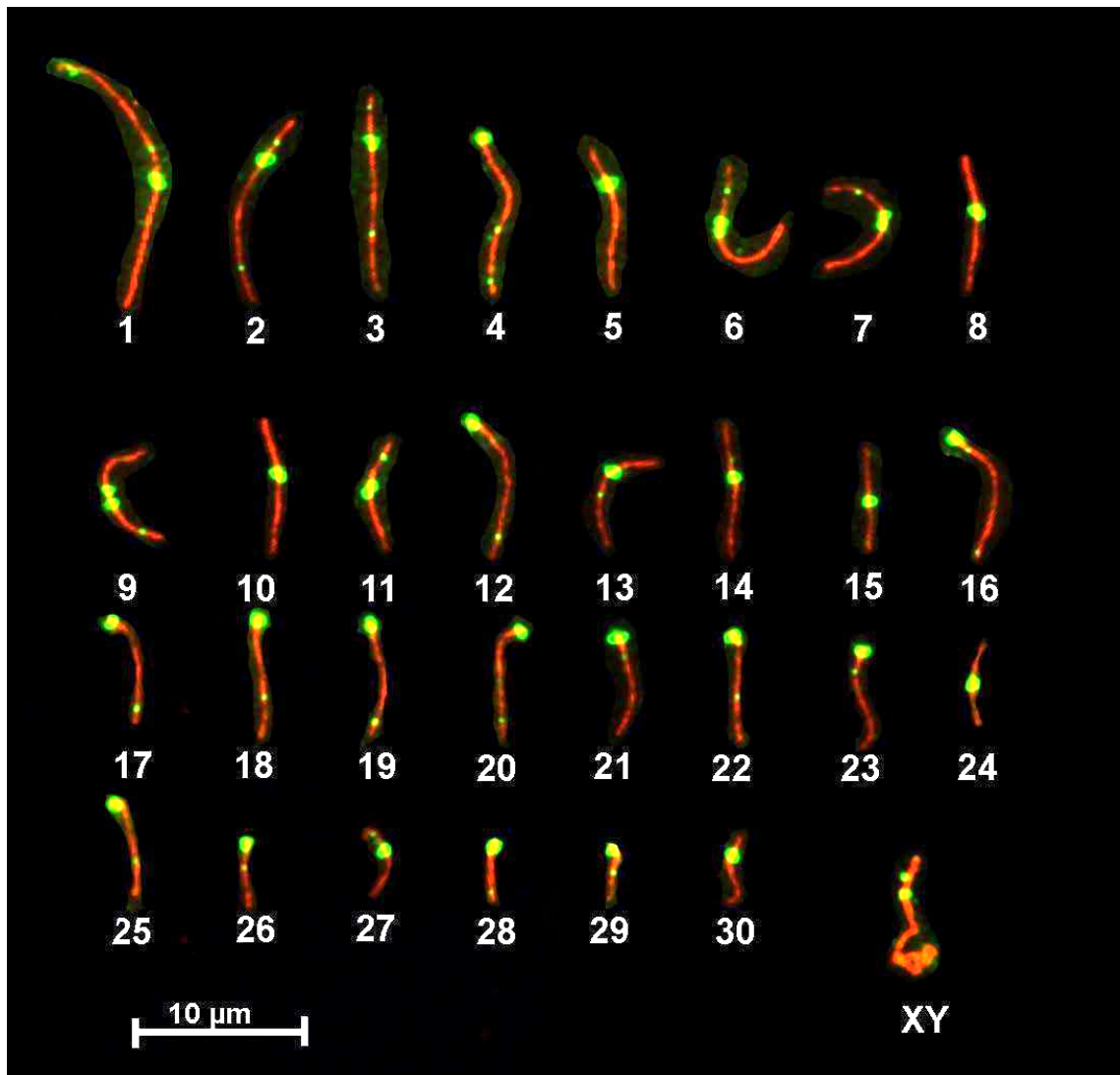


Figura 36: Cariotipo de complejo sinaptonémico de *Z. pichiy*. En rojo se marcan los ejes con anticuerpo anti-SMC3, superpuestos con la señal verde del anticuerpo que reconoce las proteínas del cinetocoro (suero CREST) y del anticuerpo que reconoce los nódulos de recombinación (anti-MLH-1).

2.4. *Euphractus sexcinctus*

2.4.1. Línea somática - caracterización citogenética de la especie

Se llevo a cabo la caracterización citogenética a nivel γ de *E. sexcinctus*. El cariotipo presento un número modal de $2n= 58$ XX/XY y un NF=105 (Fig. 37). Los pares cromosómicos, 11, 28 resultaron metacéntricos, los pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28 submetacéntricos y los pares 14, 16, 18,

19, 22 acrocéntricos (Fig. 37). El cromosoma X resultó submetacéntrico mediano y el cromosoma Y acrocéntrico siendo el más pequeño del complemento (Fig. 37).

Las bandas G, permitieron homologar los elementos de cada par e individualizar de manera segura cada uno de los mismos y de esta manera confeccionar el ideograma de la especie (Fig. 38, 39). Además se pudo demostrar un reordenamiento para el par 1, producto de delección en el brazo corto de uno de los cromosomas, siempre en heterocigosis (Fig. 38).

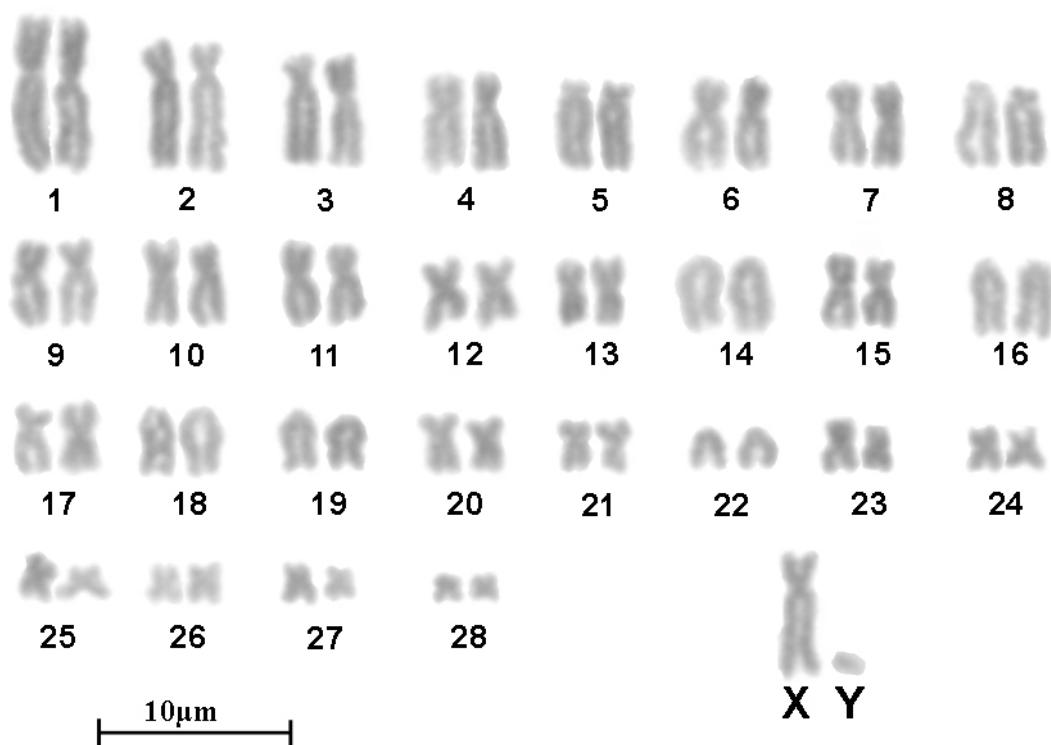


Figura 37: Cariotipo de un ejemplar macho de *E. sexcinctus* de la pcia. de Corrientes. Tinción carbol fucsina.

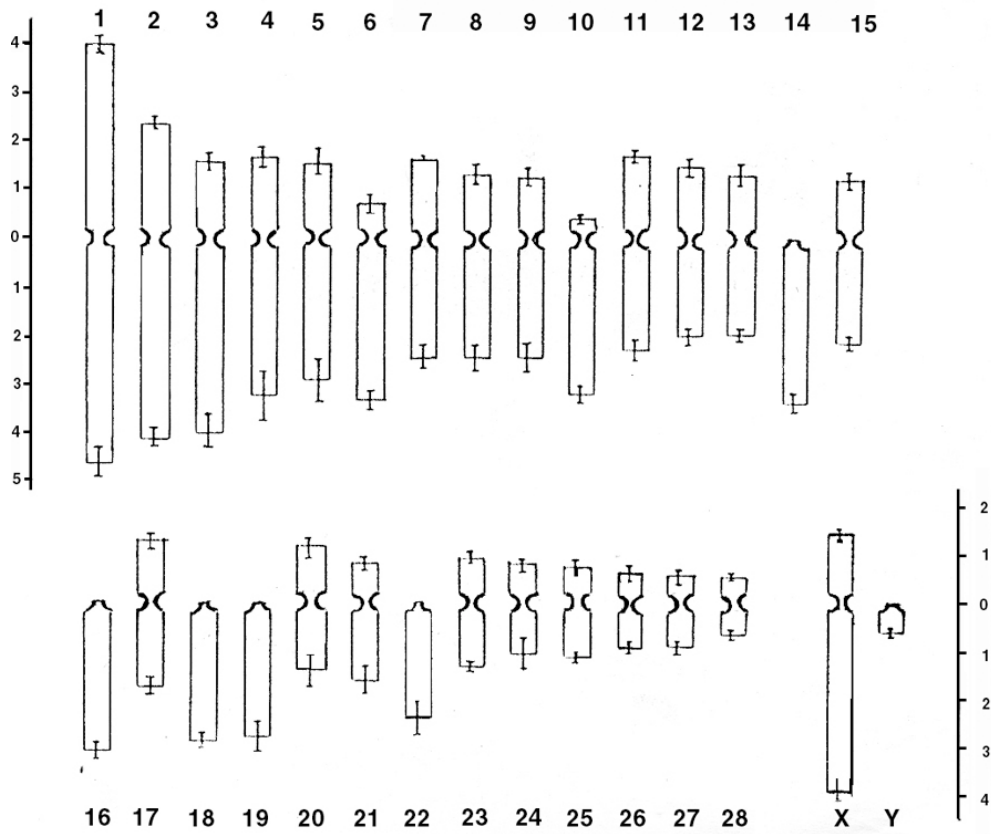


Figura 38: Ideograma representativo del cariotipo de *E. sexcinctus* (mostrando el set haploide de cromosomas), indicando la proporción de cada cromosoma respecto del total del complemento autosómico.

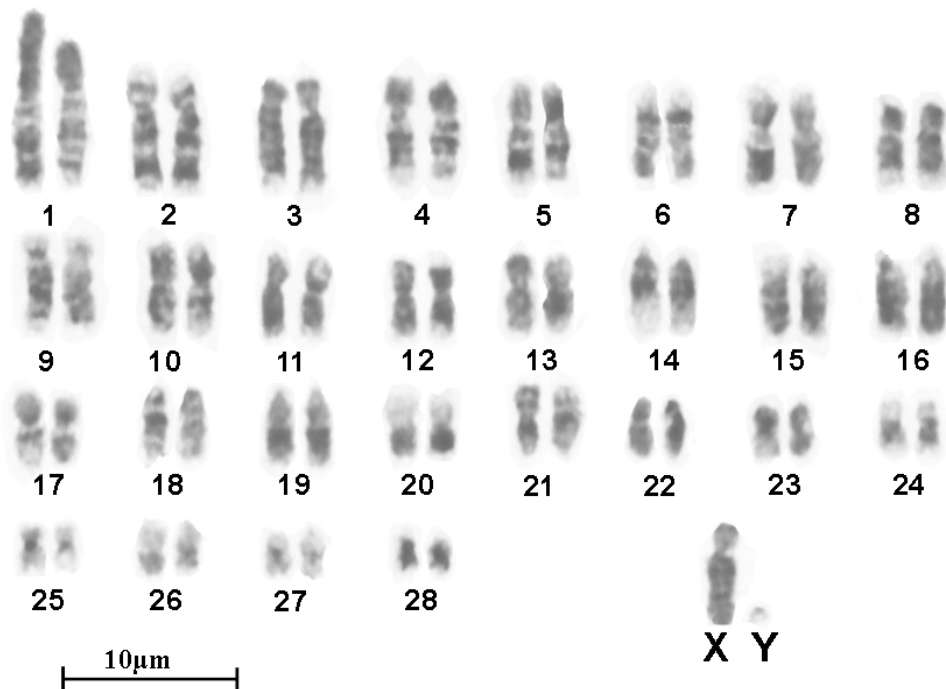


Figura 39: Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de un ejemplar macho de *E. sexcinctus* de la pcia. de Corrientes. El par 1 presenta un rearrreglo cromosómico en heterocigosis.

Las bandas C evidenciaron heterocromatina repetitiva en las regiones pericentroméricas de la mayoría de los pares cromosómicos (Fig. 40). En Los pares 2, 3, la región heterocromática fue más notoria que en los demás; y los pares 5, 6, 8 y 29 presentaron además de la heterocromatina altamente repetitiva centromérica, heterocromatina extensiva al brazo corto (Fig. 40). El par 1 al igual que en los demás eufractinos, también presentó heterocromatina extensiva al brazo q (Fig. 40).

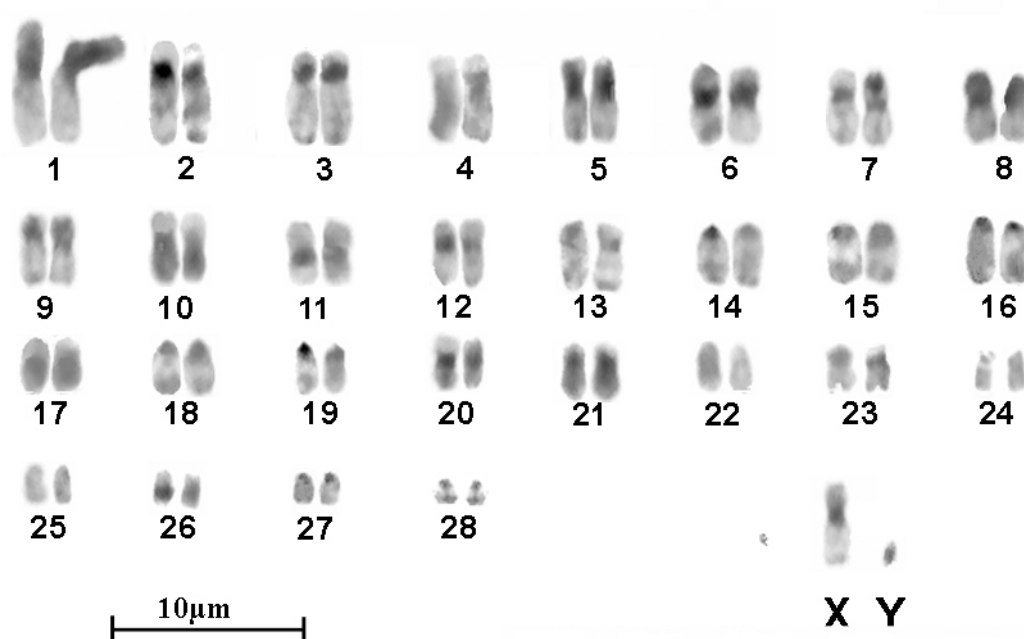


Figura 40: Cariotipo mostrando el patrón de bandas C en un ejemplar macho de *E. sexcinctus* de la pcia. de Corrientes.

Con la técnica de tinción argéntica se localizaron en cromosomas mitóticos y en cromosomas meioticos, los dos organizadores nucleolares de esta especie. Se ubicaron, en los pares 6 y 20 del complemento autosómico mitótico, siendo la misma ubicación en espermatocitos en paquitene del complejos sinaptonémico (Fig. 41, 42).

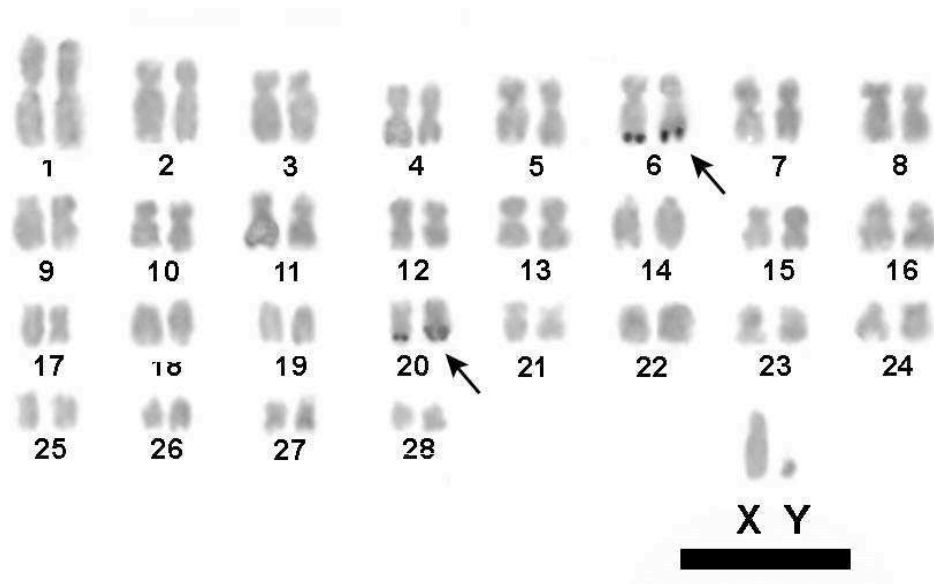


Figura 41: Cariotipo mostrando la localización de los organizadores nucleolares de un ejemplar macho de *E. sexcinctus* de la pcia. de Corrientes. Tinción argéntica.



Figura 42: Espermatocito en paquitene *E. sexcinctus* de la pcia de Salta. Puede apreciarse la localización de los organizadores nucleolares en los pares bibraquiados 6 y 20 (flechas). Tinción argéntica.

2.4.2. Línea germinal - Evans

Mediante la técnica de Evans se estudió la segregación cromosómica en los estadios meióticos de diacinesis/metafase I (MI, Fig. 43) y metafase II (MII, Fig 43). En diacinesis/metafase I se observaron 29 bivalentes autosómicos y el bivalente sexual XY, confirmando así el sistema de determinación sexual observado previamente en los análisis mitóticos con el $2n=58$ XX/XY (Fig. 43). La MI nos permitió durante el apareamiento de los cromosomas localizar el número y ubicación de los quiasmas por cada bivalente cromosómico. Los bivalentes que presentaron dos quiasmas observables fueron: 1, 2, 6, 8, 12, 16, 19, 22, 27, 28 (Fig. 43). La MII nos permitió estudiar la segregación meiotica. En MII: de 50 metafases pudimos observar que menos de un 6 % tenían mala segregación y además que aproximadamente el 50% poseían el Y.

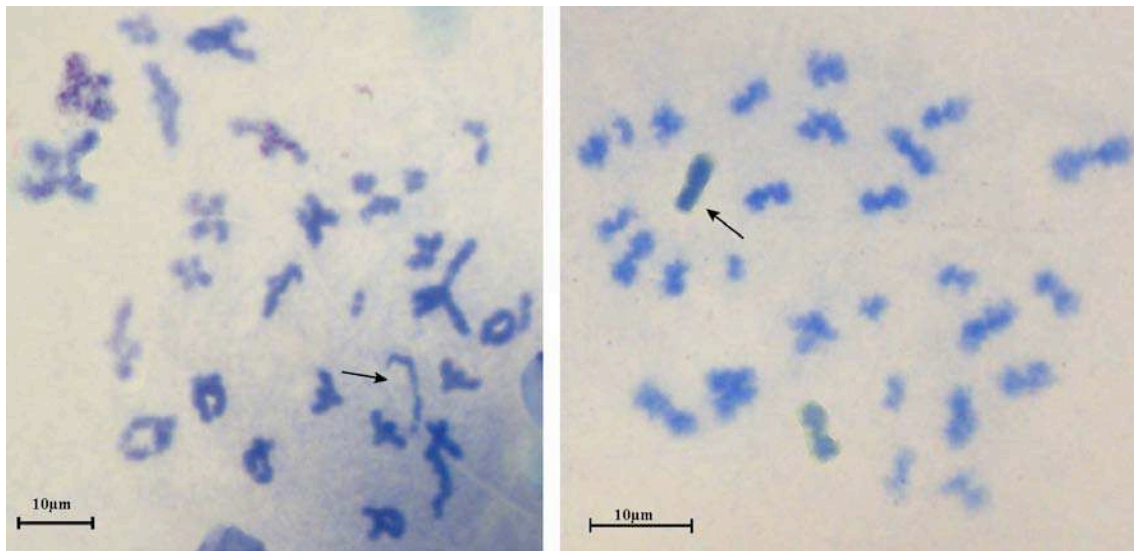


Figura 43: espermatocitos de *E. sexcinctus* diacinesis/metafase I (izquierda), la flecha indica el bivalente sexual XY; y MII (derecha), la flecha indica el cromosoma X.

2.4.2. Línea germinal – técnica de complejo sinaptonémico

Se analizó un total de 79 núcleos de espermatocitos en paquitene. Los núcleos mostraron 27 bivalentes autosómicos completamente apareados y el cuerpo XY. La localización de los centrómeros exhibió 24 componentes bibraquiados autosómicos (6 metacéntricos y 8 submetacéntricos incluido el X) y 14 acrocéntricos incluido el Y. El bivalente 1 fue identificado como el complejo sinaptonémico más largo (Fig. 44). Los espermatocitos en paquitene de *E. sexcinctus*, nos permitieron identificar claramente los cinetocoros del cuerpo XY. El bivalente X resultó submetacéntricos y el Y acrocéntrico (Fig. 44). A partir del estudio meiótico de espermatocitos en paquitene, se corroboró la morfología y el NF obtenido en los cariotipos mitóticos de la especie (Fig. 44). Se observó un apareamiento total entre el cromosoma X y el cromosoma Y en *E. sexcinctus* (Fig. 44).

Se registraron en promedio del total $46,36 \pm 3,9$ focos de la proteína MLH1 por núcleo con un rango de 35 a 43 focos (Fig. 43). Los recuentos realizados no incluyeron el par sexual XY. Siempre se observó, al menos la presencia de un foco por bivalente cromosómico.

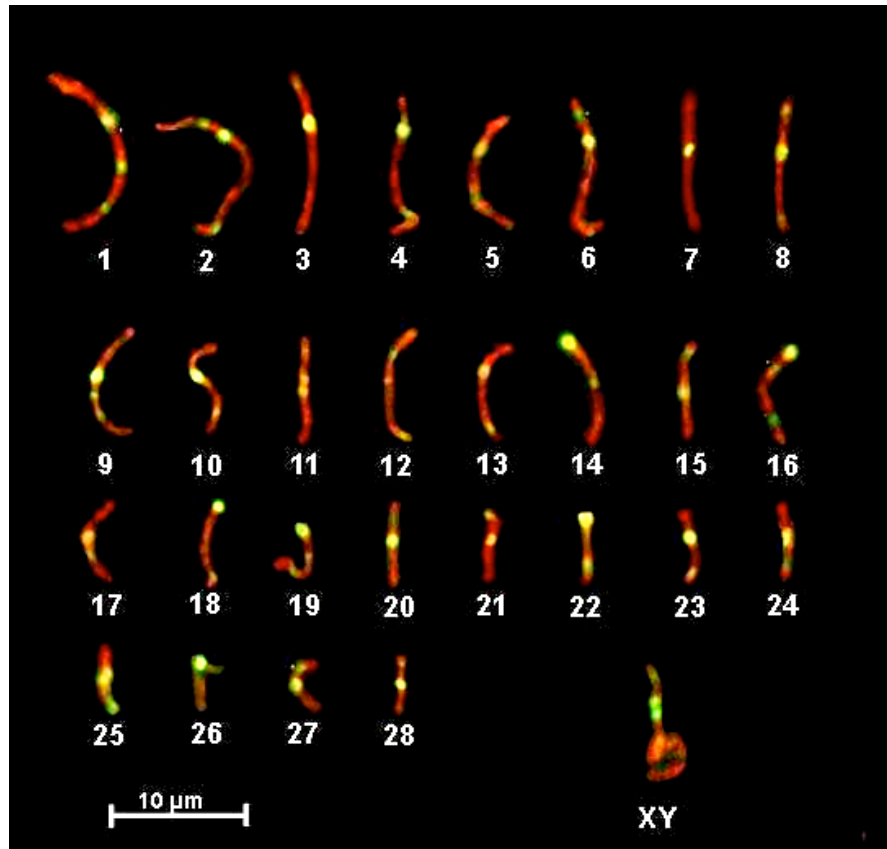


Figura 44: Cariotipo de complejo sinaptonémico de *E. sexcinctus*. En rojo se marcan los ejes con anticuerpo anti-SMC3, superpuestos con la señal verde del anticuerpo que reconoce las proteínas del cinetocoro (suero CREST) y del anticuerpo que reconoce los nódulos de recombinación (anti-MLH-1).

2.5. Detección de secuencias teloméricas en *Euphractini*

Se localizaron las secuencias teloméricas en las especies *Ch. villosus*, *Ch. vellerosus* y *Z. pichiy*. La sonda fue localizada en todos los brazos cromosómicos en posición distal con excepción de un par cromosómico metacéntrico pequeño en *Ch. vellerosus* y *Z. pichiy* donde la marca fue localizada también en la región centromérica.

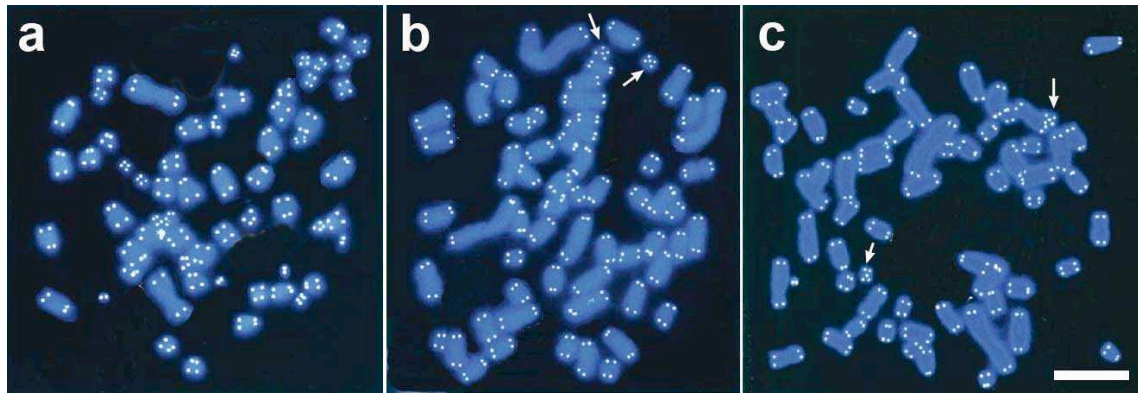


Figura 44: localización *in-situ* de las secuencias teloméricas (TTAGGG)_n en cromosomas de metafases de: a. *Ch. villosus* (macho); b. *Ch. vellerosus* (hembra); c. *Z. pichiy* (macho). Las flechas en “b” y “c” indican los cromosomas donde la localización de secuencias teloméricas fue en regiones centroméricas..

3. Reproducción

3.1. Morfología del tracto reproductor

3.1.1. Estudios anátomo-histológicos del tracto reproductor masculino de *Ch. villosus*

La anatomía general del aparato genital masculino de *Ch. villosus* se muestra en la figura 46. Los riñones se encuentran inmediatamente craneales a los testículos (Fig. 46b). Los testículos, ovoides y alargados en dirección cefalocaudal, son aproximadamente del mismo tamaño (3,5 x 2 x 1,5 cm), y se encuentran localizados en la cavidad pélvica (Fig. 46b).

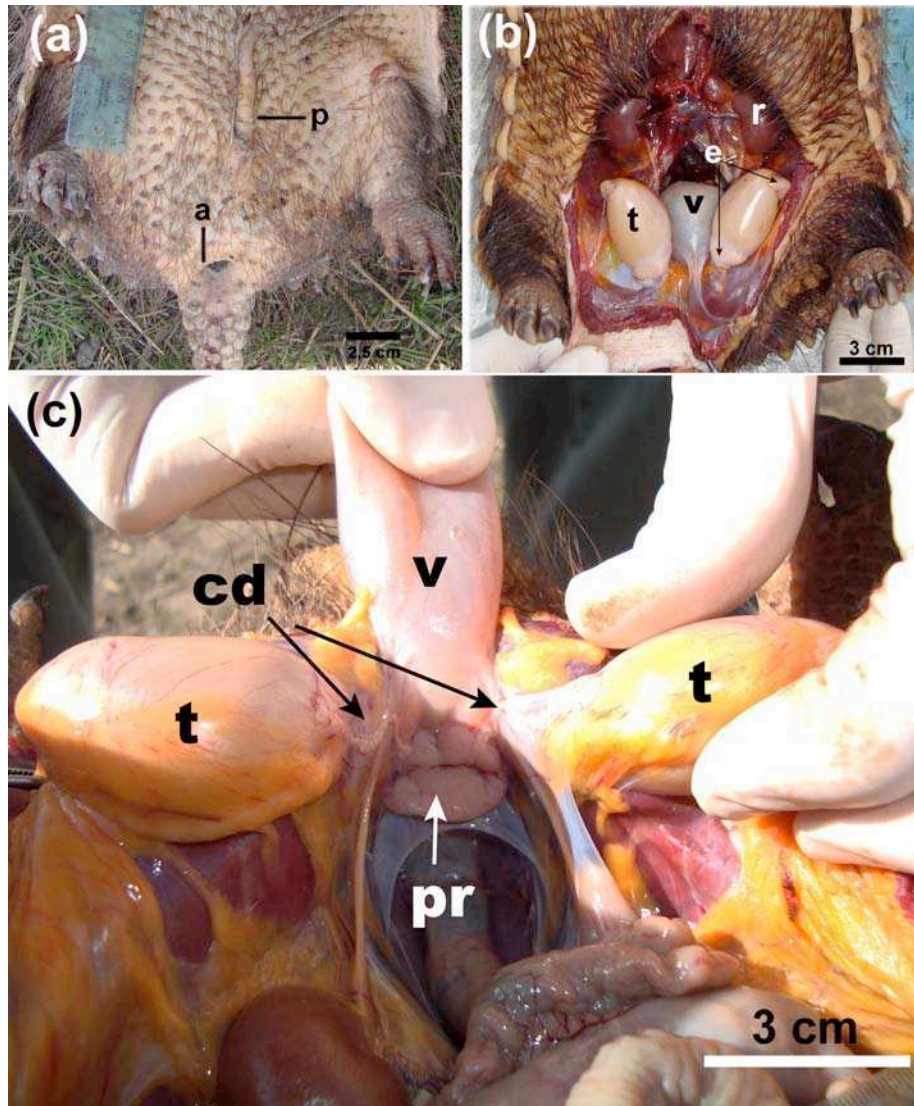


Figura 46: a. vista ventral donde se observa el pene; b. vista ventral donde se observa la localización interna de los testículos; c. vista dorsal donde se observa la localización de la próstata. Abreviaturas: p, pene; t, testículo; v, vejiga; e, epidídimo; r, riñón; cd, conducto deferente; pr, próstata.

El parénquima testicular se encuentra formado por túbulos seminíferos rodeados de un intersticio. Los túbulos seminíferos están constituidos básicamente por un epitelio formado por células de Sertoli intercaladas entre células germinales dispuestas de forma estratificada, por debajo de la membrana basal encontramos células mioepiteliales. En el intersticio se observan células de Leydig y células estromales (ver en esta sección, punto 3.1.2, para una descripción detallada).

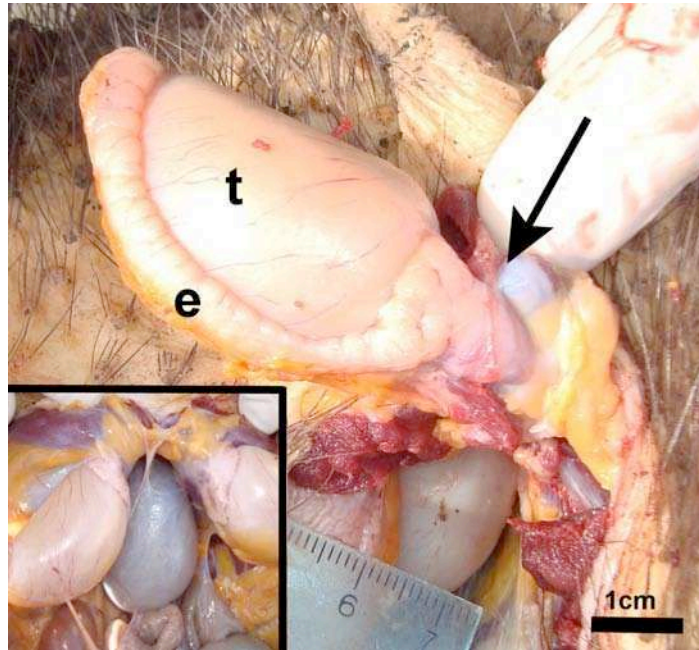


Figura 47: Testículo con epidídimo; la flecha indica la inserción de la zona caudal del epidídimo. En el recuadro se observa a menor aumento la relación topográfica entre el sitio de incersión del epidídimo, la vejiga y el testículo contralateral. t: testículo; e: epidídimo.

Los túbulos seminíferos desembocan en túbulos rectos que se continúan con los túbulos de la rete testis. Los últimos, desembocan en los conductillos eferentes que terminan confluyendo en un conducto único correspondiente al epidídimo en su porción proximal o cabeza. El epidídimo, dividido en cabeza, cuerpo y cauda, surge del extremo cefálico del testículo. La región correspondiente a la cauda epididimaria se inserta en una depresión inguinal del peritoneo (Figs. 46c y 47). El epidídimo se continúa con el conducto deferente en dirección caudal (Fig. 46c). En su región proximal, el conducto deferente, esta bien delimitado, siendo corto y tortuoso. Mientras que en su región distal, tiende a ser rectilíneo. Ambos conductos deferentes (izquierdo y derecho) atraviesan la glándula prostática, y luego se unen a los conductos excretorios de las vesículas seminales para originar el conducto eyaculador (Fig. 48).

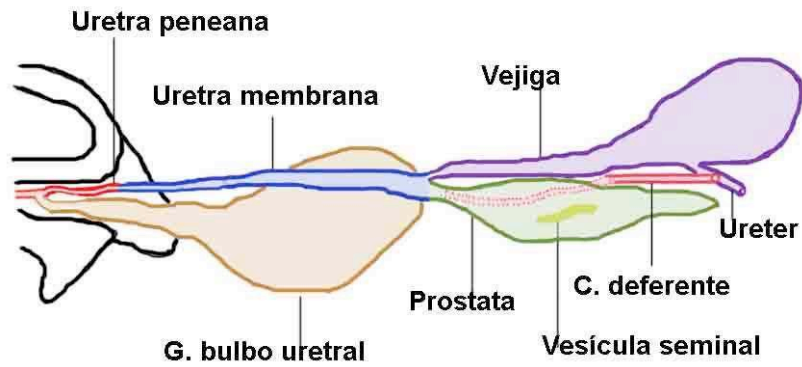


Figura 48: Esquema del tracto reproductor masculino de *Ch. villosus*, se observa la disposición de las glándulas anexas y sus sitios de desembocadura, las vías urinarias, las vías espermáticas y urogenitales.

La próstata unilobulada (4,5 cm x 1,5 x 1, Fig. 46a, 49), esta localizada ventral a la uretra membranosa. Las vesículas seminales, situadas dorsales a la próstata, son pequeños cuerpos alargados y rudimentarios que por su tamaño (1,0 x 0,1 cm) aparentan tener una función menor (Fig. 49).

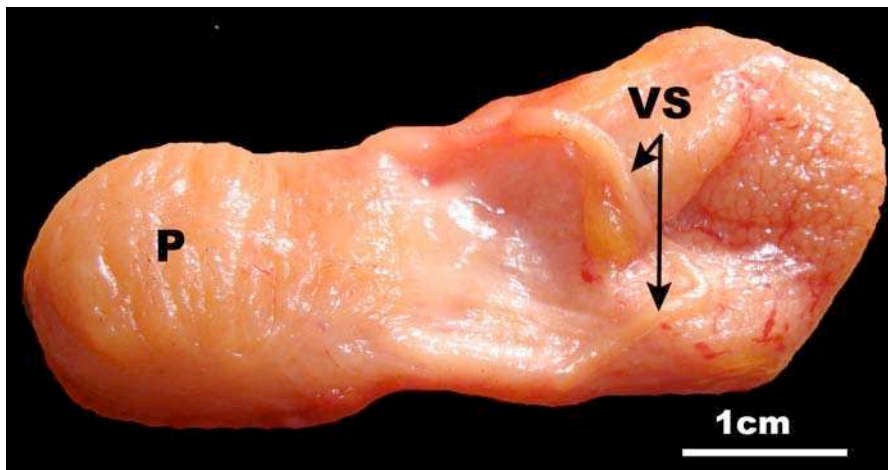


Figura 49: Vista dorsal de la próstata de *Ch. villosus*, las flechas muestran las rudimentarias vesículas seminales.

A la altura de desembocadura de la vejiga, el conducto eyaculador y la próstata se distingue la primera porción de la uretra membranosa, que recorre un trayecto de (5

cm) hasta llegar a la base del pene donde pasa a denominarse, uretra peneana, la cual recorre el trayecto peneano hasta que finaliza en el orificio externo (Fig. 48). Las glándulas bulbouretrales, son estructuras pares de forma ovoide situadas en la cara ventral de la base del pene (Fig. 50).



Figura 50: Vista posterior de las glándulas bulbouretrales (cabeza de flecha) de *Ch. villosus*.

El pene de *Ch. villosus* esta situado a una distancia rostral del ano de 5-8 cm (Fig. 46a) entre este y la sínfisis del pubis. Este órgano presenta una longitud inusual comparada con el largo corporal, alcanzando un largo en reposo de 11-14 cm y pudiendo encontrarse totalmente alojado en un bolsillo cutáneo o saco prepucial, o asomar su extremo anterior. En su extremo posterior, la piel del pene presenta una perfecta continuidad con la piel del abdomen. Se encuentra constituido por una raíz, un cuerpo y una punta y, tal como describieron Afanni et al. (2001), permite observar tres formaciones en corte transversal: dos manojos musculares estriados, pertenecientes al músculo “*levator penis*”; órganos eréctiles correspondientes a los cuerpos cavernosos y esponjosos; y un sistema de cubiertas.

- El “*levator penis*” es un músculo par estriado, de recorrido extenso, las fibras que lo constituyen se insertan en la lámina interna del hueso sacro. Alcanza alrededor de 18 cm de longitud desde su inserción en el sacro hasta su

terminación cerca de la punta del pene. Tiene un espesor dorsoventral de alrededor de 0,6 a 0,8 cm y presenta una circunferencia de alrededor de 1,5 cm.

- El cuerpo cavernoso se origina en el extremo posterior del pene, a nivel de la sínfisis del pubis. El cuerpo cavernoso presenta una cubierta externa o albugínea, un sistema de trabéculas procedentes de estas cubiertas y un sistema de areolas circunscritas por trabéculas.
- El cuerpo esponjoso es un órgano impar, que recorre la cara ventral del pene. En los cortes histológicos, se observa que el mismo se expande cerca del extremo distal del pene rodeando totalmente al cuerpo cavernoso. Si bien externamente, el pene no presenta una formación que señale la existencia de un glande, histologicamente presenta una formación homologa al glande de otros mamíferos.

*3.1.2. Histología y estructura fina del epitelio seminífero de *Ch. villosus* - caracterización del ciclo del epitelio seminífero.*

En ejemplares de *Ch. villosus* considerados activos (capturados a finales de invierno, comienzo de la primavera, ver punto 3.1.3), el epitelio seminífero se compone de cuatro a cinco capas concéntricas de células germinales en distintas etapas de diferenciación (Figs. 51, 52) además de las células de Sertoli. Las últimas presentan una forma alargada, con un núcleo ovoide, el cual presenta una indentación que se extiende profundamente en el nucleoplasma (Fig. 51). La cromatina se encuentra dispersa en el núcleo, en forma de pequeños y delgados grumos de heterocromatina, asociados a la carioteca (Fig. 51), el nucléolo se encuentra en posición central (Fig. 51). En estas células, las gotas lipídicas se encuentran en

pequeñas cantidades en el citoplasma (Fig. 51). Llamativamente, la membrana basal presenta protrusiones hacia el interior del túbulo, que en seres humanos, son relacionadas a un estado patológico.

Se observan dos tipos de espermatogonias y células meióticas en estadios tempranos cercanas a la membrana basal, en el "compartimiento basal", mientras que los estadios meióticos tardíos y las espermatidas se encuentran lejos de la membrana basal, en el "compartimiento adluminal" (Figs. 51, 52).

Utilizando como criterio el grado de maduración de las espermatidas (proceso de espermiogénesis) y las asociaciones entre las distintas células de la serie espermatogénica se determinaron los estadios del epitelio seminífero en *Ch. villosus*. La maduración de las espermatidas fue evaluada en base al desarrollo del acrosoma y la forma del núcleo. Se identificaron trece etapas de diferenciación en espermatidas, cada una con características morfológicas específicas. El análisis de secciones transversales de los túbulos seminíferos revela que el ciclo del epitelio seminífero se puede dividir en ocho estadios claramente identificables con microscopio óptico, y que sólo se observa un estadio por cada corte transversal de los tubulos seminíferos (Figs. 51, 52).

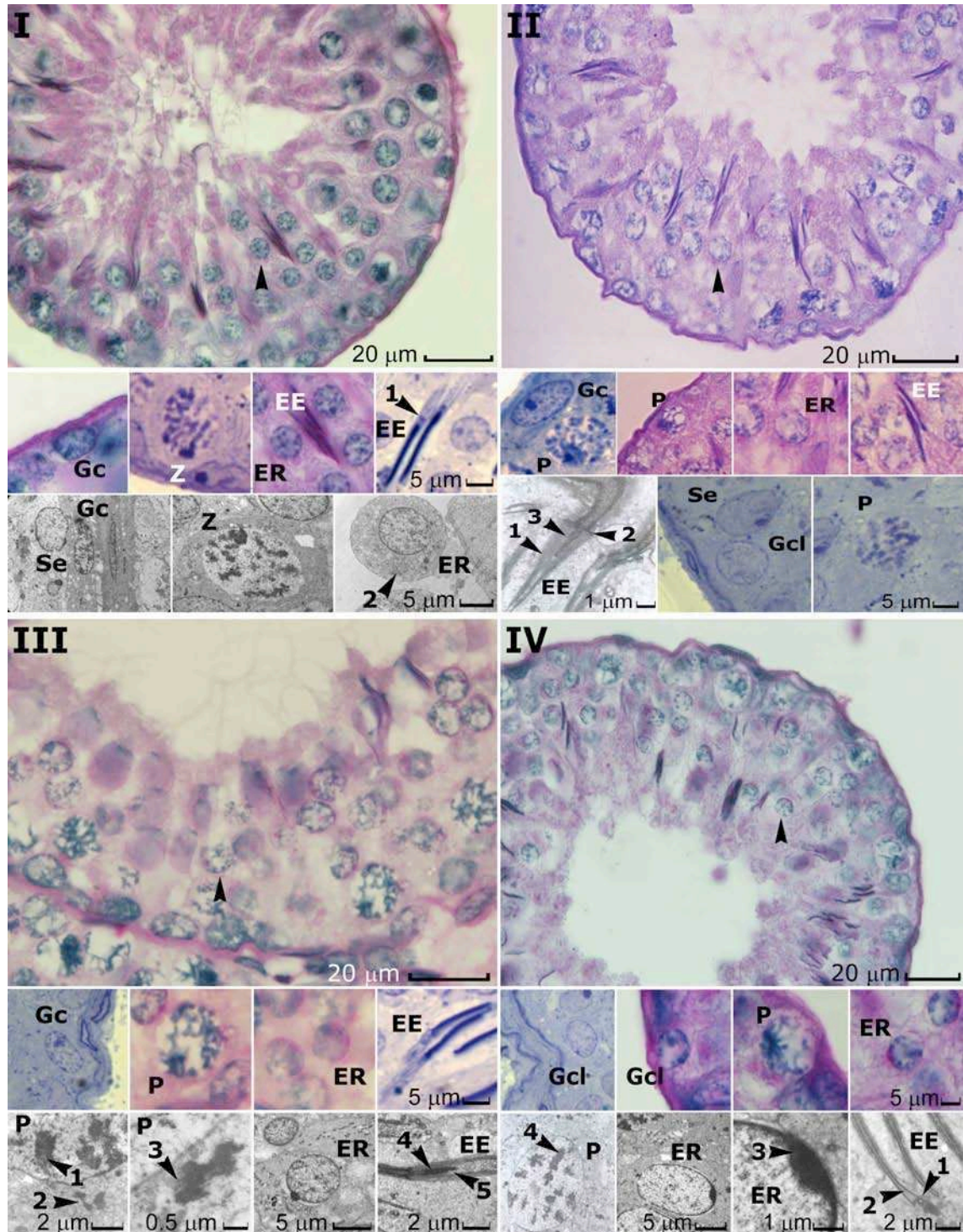


Figura 51: Histología y estructura fina del epitelio seminífero de *Ch. villosus*, estadios I a IV. **Se**, célula de Sertoli; **Gc**, espermatogonia costrosa; **Gcl**, espermatogonia clara; **ER**, espermatίδα redonda; **EE**, espermatίδα elongada; **Esp**, espermatozoide; y **L, Z, P, M** corresponden a espermátocitos en leptotene, zigotene, paquitene y espermátocitos en meiosis respectivamente.

Estadio I: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermatίδα en la etapa 1 de diferenciación. La cabeza de flecha numerada marca: 1, el centríolo; 2, el aparato de Golgi.

Estadio II: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermatίδα en la etapa 2 de diferenciación. La cabeza de flecha numerada marca: 1, manchette; 2, inserción de la manchette; 3, cromatina granular que se extiende caudal a la manchette.

Estadio III: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermatίδα en la etapa 3 de diferenciación. La cabeza de flecha numerada marca: 1, complejo sinaptonémico en espermátocito; 2 y

3, manojos de material filamentososo en el citoplasma del espermatocito; 4, cromatina granular que se extiende caudal a la manchete en la espermátide elongada; 5, el centriolo caudal al núcleo.

Estadio IV: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermátida en la etapa 4 de diferenciación. La cabeza de flecha numerada marca: 1, centriolo; 2, cromatina homogénea que indica una maduración completa de la espermátide; 3, el límite entre la membrana acrosómica y la carioteca; 4, complejo sinaptonémico en espermatocito.

Estadio I: En la membrana basal, se identifican espermatogonias con su núcleo aplanado y paralelo a la membrana basal, caracterizado por presentar grumos de cromatina oscura principalmente localizados alrededor de la membrana nuclear (Figs. 51, 52 espermatogonias costrosas, Gc); también sobre el compartimento basal se encuentran espermatocitos en zigotene (Fig. 51, Z). En el compartimento adluminal se observan espermátidas redondas con un solo gránulo poco condensado alrededor del núcleo (etapa 1), que marca el comienzo de la formación del acrosoma (fase de Golgi); las espermátidas redondas presentan pocos gránulos de heterocromatina en todo el núcleo. En el mismo compartimento, se observa una segunda capa de espermátidas mostrando un núcleo alargado cubierto con un acrosoma bien desarrollado (etapa 9, Fig. 51, espermátida elongada), el centriolo puede ser reconocido en cortes semifinos (Fig. 51).

Estadio II: Esta compuesto por espermatogonias costrosas y espermatogonias, localizadas en la membrana basal, de núcleos grandes y redondos, caracterizadas por presentar una cromatina finamente dispersa (espermatogonias claras, Gcl) (Figs. 51, 52). En este estadio se encuentran espermatocitos en paquitene temprano en el compartimento basal. En el compartimento ad-luminal se observan espermátidas redondas (ER), con gránulos proacrosomales condensados y redondeados adyacentes a la carioteca (etapa 2), y espermátidas alargadas de apariencia aplanada (etapa 10), en las cuales el núcleo se extiende caudalmente a la inserción de la manchete. En esta etapa, la cromatina granular denota que el desarrollo de la espermátide no ha terminado aún y la manchete se encuentra bien desarrollada.

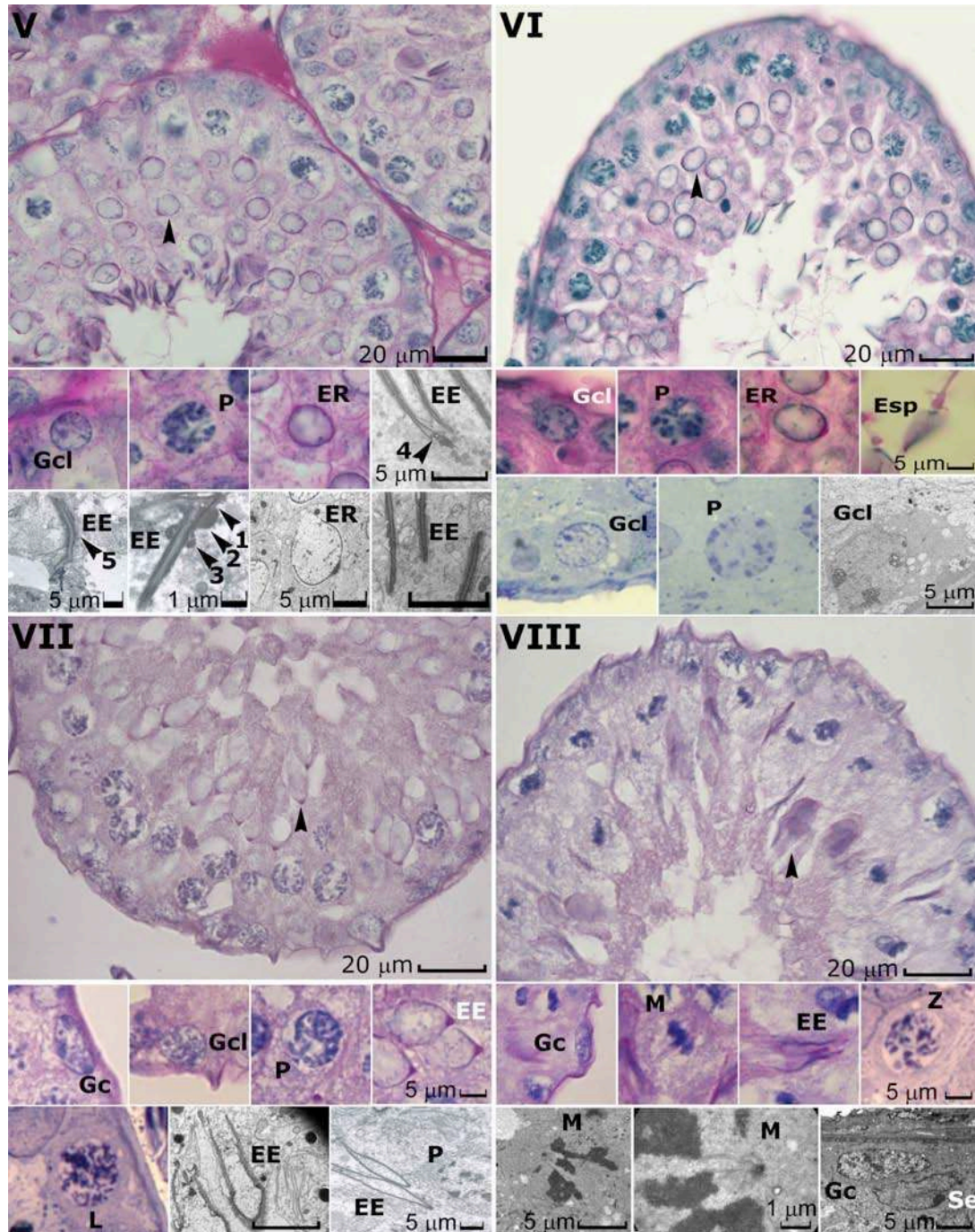


Figura 52: Histología y estructura fina del epitelio seminífero de *Ch. villosus*, estadios V a VIII. **Se**, célula de Sertoli; **Gc**, espermatogonia costrosa; **Gcl**, espermatogonia clara; **ER**, espermatída redonda; **EE**, espermatída elongada; **Esp**, espermatozoide; y **L, Z, P, M** corresponden a espermatoцитos en leptotene, zigotene, paquitene y espermatoцитos en meiosis respectivamente.

Estadio V: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermatída en la etapa 5 de diferenciación. La cabeza de flecha numerada marca: 1, pieza de conexión con patrón a franjas; 2, anillo perinuclear de la machette; 3, anulus; 4, centrólo caudal al núcleo en la espermatída madura; 5, procesos de adhesión de la espermatída con célula de Sertoli.

Estadio VI: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermatída en la etapa 6 de diferenciación.

Estadio VII: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermátida en la etapa 7 de diferenciación.

Estadio VIII: Túbulo completo, la cabeza de flecha marca una espermátida en la etapa 8 de diferenciación.

Estadio III: están presentes tanto espermatogonias costrosas como claras (Fig. 51). Se observan espermátocitos en estadios de paquitene intermedio, espermátidas redondas con un oscuro y marcado granulo proacrosomico sobre la superficie nuclear (etapa 3) y espermátidas elongadas en etapa 11.

Estadio IV: Presenta espermatogonias costrosas y claras (Fig. 51). Se observan espermátocitos en una etapa intermedia de paquitene. El inicio de la etapa IV esta marcado por espermátidas redondas que exhiben material proacrosomico denso, que se extiende lateralmente y comienza a cubrir el núcleo. Las espermátidas elongadas presentan una cromatina gris homogénea y un acrosoma denso que adquiere una forma de espátula (etapa 12).

Estadio V: Están presentes espermatogonias costrosas y claras (Fig. 52). En el compartimento adlumninal se encuentran espermátocitos en paquitene intermedio y espermátidas redondas. Las espermátidas redondas cambian su orientación y el acrosoma ahora, apunta hacia la membrana basal; la extensión de granulos proacrosomicos se hace mas evidente en esta etapa, la cromatina esta mas decondensada, excepto por los grumos de heterocromatina marginal (etapa 5) (Fig. 52). Las espermátidas elongadas presentan una cola distintiva y se encuentran dispuestas alrededor del lumen del epitelio seminífero listas para ser liberadas (etapa 13)

Estadio VI: Espermatogonias claras y costrosas se localizan sobre la membrana basal (Fig. 52). En el compartimento adluminal se observan espermátocitos en paquitene tardío. En esta etapa, el núcleo de la espermátida se vuelve oval (etapa 6) y

se encuentra cubierto a hasta la mitad por la extensión lateral del capuchón acrosomal. Los espermatozoides han sido liberados en el lumen.

Estadio VII: Espermatogonias pálidas y costrosas se localizan sobre el compartimiento basal (Fig. 52) junto con espermatoцитos en leptotene recientemente originados. En el compartimiento abdluminal, hay solamente dos cohortes de células germinales, espermatoцитos en paquitene y espermatidas. En esta etapa las espermatidas se vuelven elongadas y solamente se puede apreciar unos pocos grumos de cromatina (Etapa 7). El acrosoma se extiende a lo largo de su longitud.

Estadio VIII: En este estadio, espermatogonias costrosas y claras se localizan en el compartimiento basal junto con los espermatoцитos en zigotene. En el compartimiento adluminal se encuentran espermatoцитos en estadio de metafase I y metafase II (Fig. 52). Las espermatidas son más elongadas (etapa 8).

3.2. Fisiología reproductiva

*3.2.1. Ciclo reproductivo en machos de *Ch. villosus**

La relación entre el peso del testículo y el peso corporal de los individuos capturados resultó variable durante el año. Alcanzando un máximo a mediados de septiembre (individuos considerados plenamente activos, Fig. 53, 54), que se mantuvo durante los meses siguientes hasta llegar a Mayo, mes en que se produjo un brusco descenso (Fig. 53, 54). La relación entre el peso del testículo y el peso del animal mostró un paulatino aumento durante los meses de Junio y Julio para llegar a nivel cercano al máximo anual en Agosto (Fig. 53, 54).

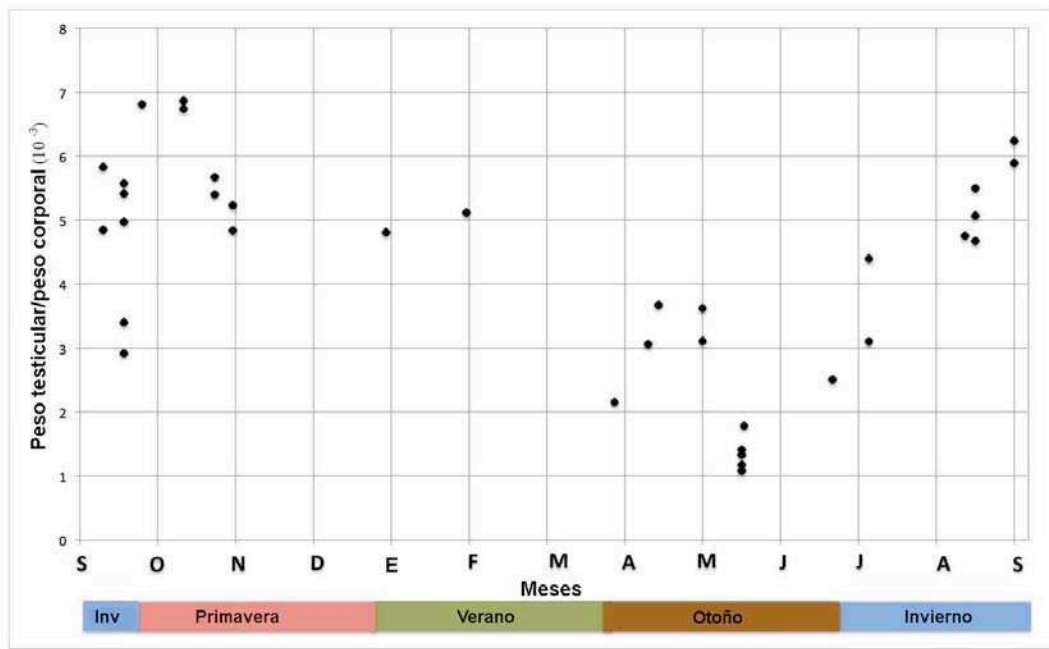


Figura 53: Relación entre el peso testicular y peso del espécimen a lo largo de año en *Ch. villosus*.

Se calculo la frecuencia de túbulos seminíferos activos (con un epitelio seminífero de composición y organización normal, ver punto 3.1.2 de esta sección) por testículo a lo largo del año. Se observaron testículos activos, con aproximadamente un 80 a 95% de los túbulos seminíferos activos, en los individuos capturados desde septiembre (a finales del invierno) hasta finales de abril (otoño, Fig. 55). Llamativamente, en el mes de mayo, la frecuencia de túbulos seminíferos activos se redujo a 0% (Figs. 55 y 56) marcando una detención del proceso de espermatogénesis en 4 individuos estudiados (testículos inactivos).

Todos los túbulos seminíferos de estos individuos con testículos inactivos mostraron una disrupción total de la arquitectura del epitelio, sin estadios post-meióticos de diferenciación celular en la mayoría de los casos y con un lumen colapsado, presentaron también, claros signos de desprendimiento de células (Fig. 56).

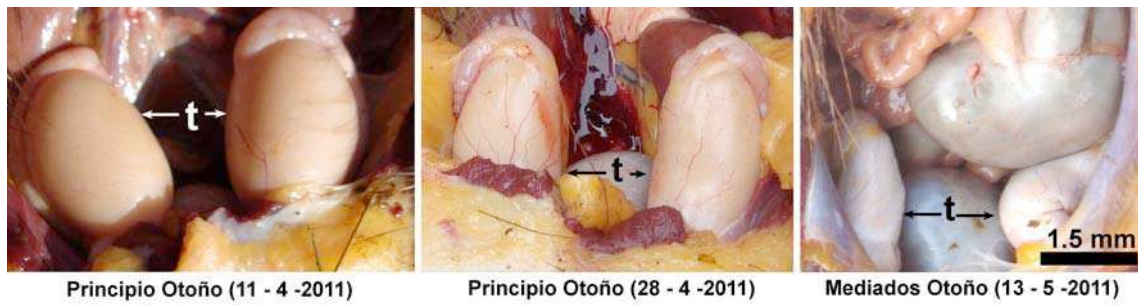


Figura 54: Tres ejemplares de *Ch. villosus* con distinto grado de actividad reproductiva. De izquierda a derecha se observan: dos individuos con testículos activos ordenados por tamaño de testículo decreciente, y uno de pequeños testículos inactivos respecto de los demás.

Estos animales carecieron de espermatozoides en sus conductos deferentes (ver tabla 5). Las células de Sertoli de estos ejemplares contenían un gran número de gotas de lípidos de tamaño variable, las cuales cubrían gran parte del citoplasma de estas células (Fig. 56).

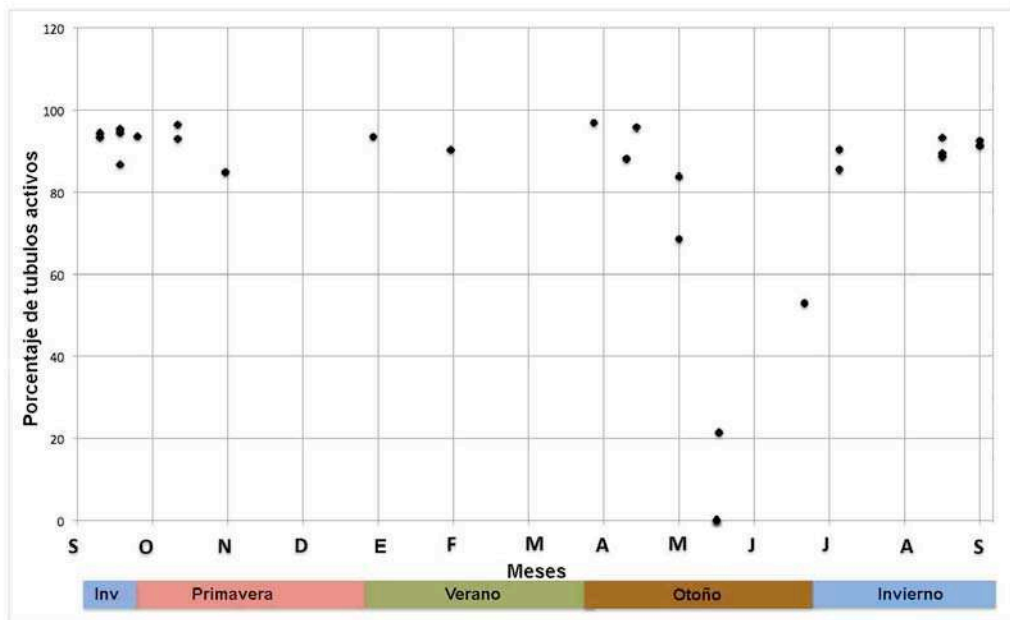


Figura 55: Variación en la frecuencia de túbulos activos a lo largo de año en *Ch. villosus*.

A partir de mediados de junio (otoño), la frecuencia de túbulos activos aumentó al 53% (Fig. 55), esta frecuencia luego se incrementó gradualmente durante los meses siguientes, cuando casi todos los túbulos recuperaron la arquitectura normal en animales con presencia de espermatozoides en sus conductos deferentes (Fig. 55, tabla 5).

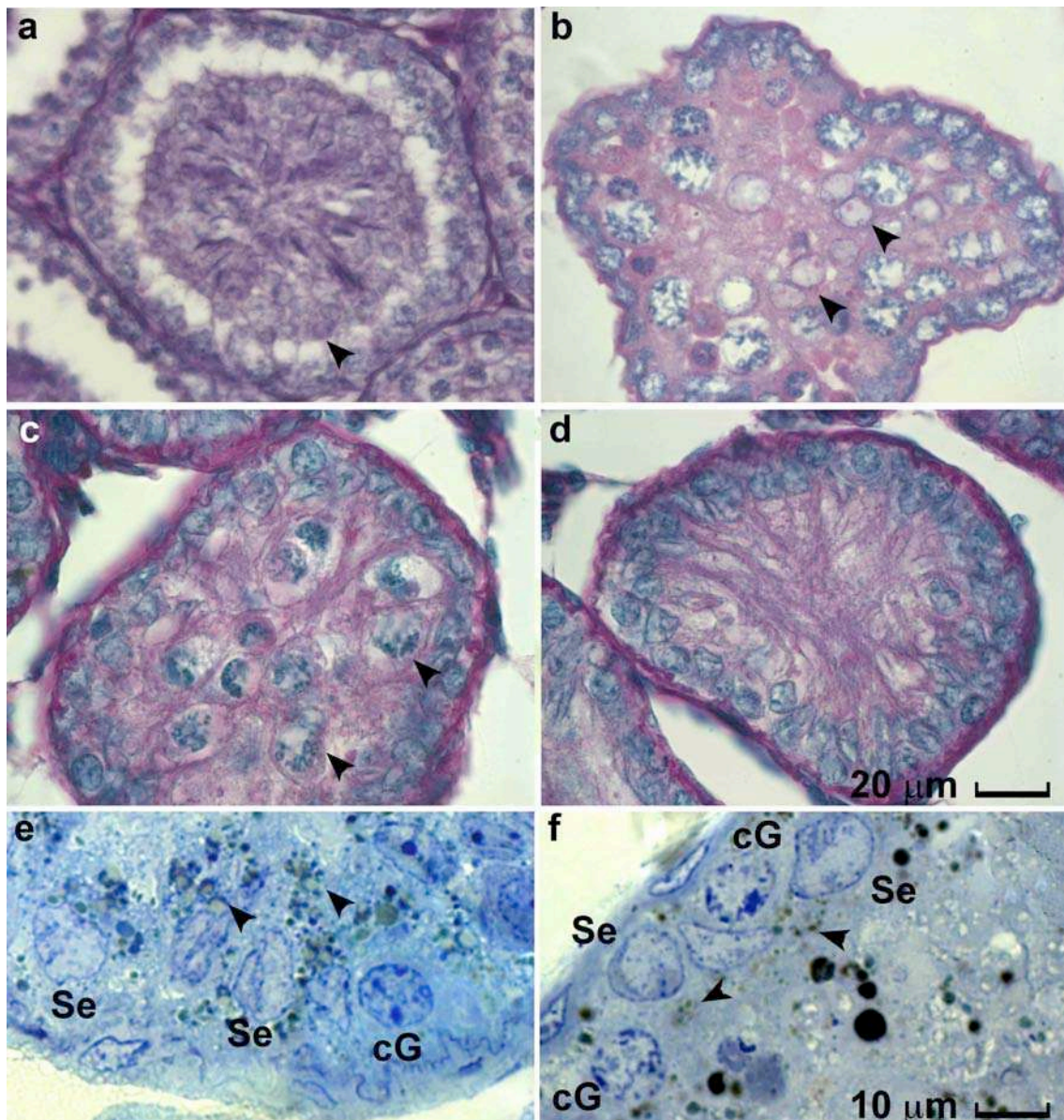


Figura 56: Histología de los túbulos seminíferos inactivos. a-d. túbulos semiíferos en distinto grado de regresión. e,f. Túbulos seminíferos inactivos donde se puede observar la gran cantidad de lípidos (cabeza de flecha) en el citoplasma sertoliano. Se, célula de Sertoli; cG, espermatogonia costrosa.

Mes	Día	Peso (gr)	Peso testicular (gr)	Número de espermatozoides / mg conducto deferente 10 ⁶
Septiembre	17/09/2010	3500	18.95	NA
	17/09/2010	3500	19.50	NA
	17/09/2010	3500	11.90	NA
	17/09/2010	3600	10.50	NA
	17/09/2010	3500	17.40	NA
	24/09/2010	2600	17.70	NA
Octubre	22/10/2010	3200	18.15	NA
	22/10/2010	3500	18.90	NA
	29/10/2010	3400	16.45	15.710
	29/10/2010	3700	19.35	16.500
Dic	27/12/2004	3800	18.28	NA
Enero	27/01/2005	3700	18.94	NA
Marzo	25/03/2011	3600	7.75	NA
Abril	07/04/2010	4100	12.54	NA
	11/04/2011	3700	13.58	13.650
	28/04/2011	4100	12.75	12.400
	28/04/2011	4000	14.50	12.920
Mayo	13/05/2011	2900	4.10	0
	13/05/2011	3800	4.10	0
	13/05/2011	2600	3.05	0
	13/05/2011	3500	4.65	0
	14/05/2010	4100	7.32	13
Jun	17/06/2010	3900	9.78	25.400
Jul	01/07/2011	4500	19.80	18.400
	01/07/2011	3000	9.30	16.000
Agosto	07/08/2010	3800	18.07	62.755
	11/08/2011	3500	16.35	10.666
	11/08/2011	3500	19.25	21.053
	11/08/2011	3700	18.75	11.200
	26/08/2011	3360	19.80	12.667
	26/08/2011	2620	16.35	11.560

Tabla 5: Estado reproductivo de machos de *Ch. villosus*

3.2.2. Ciclo reproductivo en hembras de *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*.

Correlación entre las concentraciones de progesterona fecal y plasmática

Al evaluar la correlación existente entre la progesterona medida en plasma sanguíneo y materia fecal que fue conservada congelada sin disecar (de ahora en adelante, **heces frescas**) no se encontró una correlación significativa tanto para *Ch. villosus* ($r = 0,07$ y $P = 0,84$) como para *Ch. vellerosus* ($r = 0,11$ y $P = 0,70$, Fig. 57a,b). Sin embargo, cuando la materia fecal fue disecada antes de ser congelada para su conservación (de ahora en adelante, **heces secas**), se observó una correlación positiva significativa para ambas especies ($r = 0,82$, $P = 0,05$ y $r = 0,60$, $P = 0,05$ para *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus* respectivamente; Fig. 57, 1d,e).

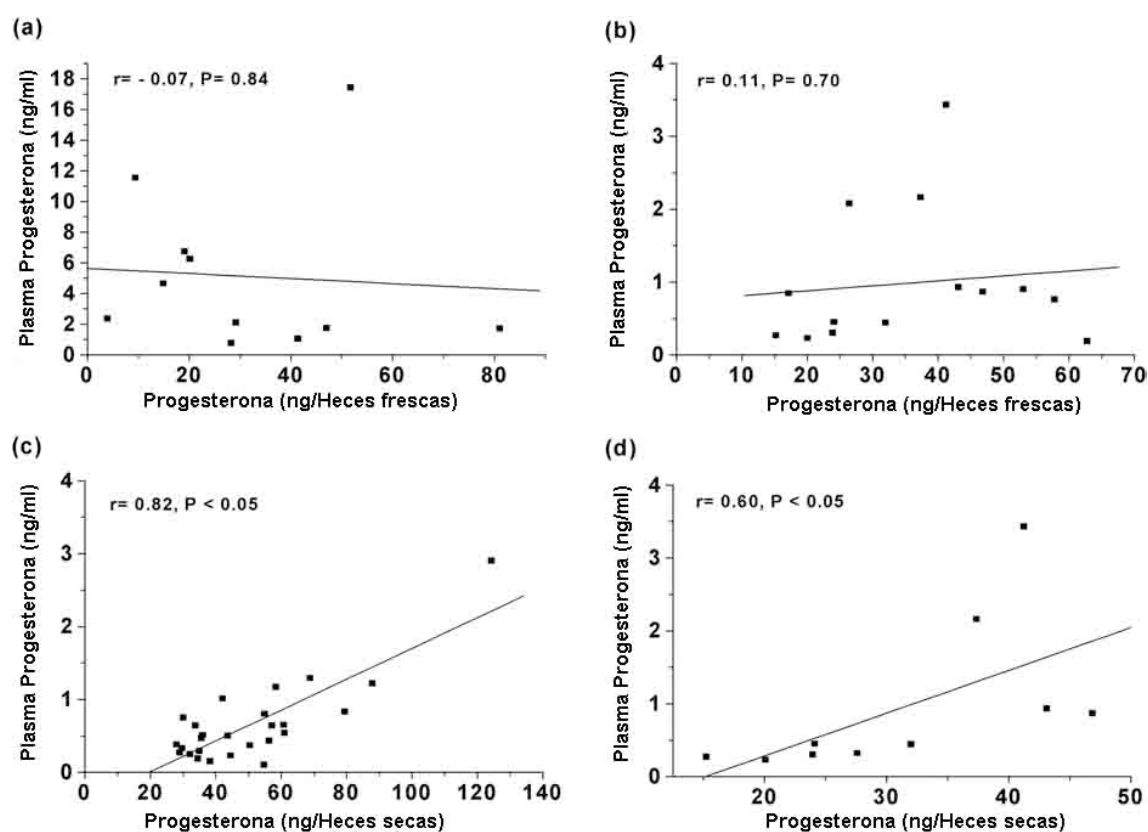


Figura 57: Curvas de correlación entre concentraciones de progesterona plasmática y: a) muestras de heces frescas en *Ch. villosus*; b) muestras de heces frescas en *Ch. vellerosus*; c) muestras de heces secas en *Ch. villosus*; d) muestras de heces secas en *Ch. vellerosus*.

Variación estacional de estradiol y progesterona en armadillos en cautiverio.

Para monitorear los cambios en la concentración de las hormonas progesterona y estradiol durante el año en *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus* se utilizaron heces secas de un ejemplar hembra en cautiverio para cada especie (Fig. 58). En *Ch. villosus*, la concentración basal media de estradiol fue de $3,04 \pm 0,80$ ng/g de heces secas (rango, 1,29–4,54 ng/g de heces secas). Dos picos ($\geq 5,68$ ng/g de heces secas) se produjeron a final de otoño y principio de invierno (Fig. 58a). Con respecto a la progesterona, la concentración basal media fue de $28,72 \pm 11,75$ ng/g de heces secas (Fig. 58b, rango, 8,73–51,10 ng/g de heces secas). Cuatro picos ($\geq 147,83$ ng/g de heces frescas) fueron detectados al final del invierno, y durante la primavera y principios del verano.

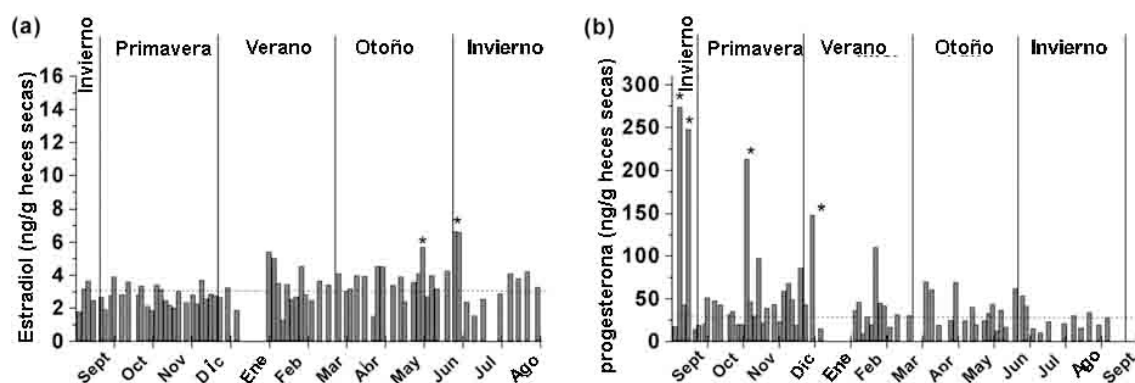


Figura 58: Perfiles anuales de concentración de hormonas esteroides de heces secas de *Ch. villosus*: a) Estradiol; y b) Progesterona. La línea punteada representa la concentración basal media de estradiol; *Indica los picos hormonales.

En *Ch. vellerosus*, la concentración basal media de estradiol fue $3,46 \pm 1,20$ ng/g de heces secas (rango, 1,60–5,82 ng/g de heces secas, Fig. 59a). Un pico (14,30 ng/g de heces secas) se produjo en invierno (Fig. 59a). La concentración de progesterona basal media fue $14,05 \pm 3,03$ ng/g de heces secas (rango, 8,23–19,78 ng/g de heces secas). Tres picos ($\geq 41,83$ ng/g de heces secas) se produjeron durante la primavera (Fig. 59b).

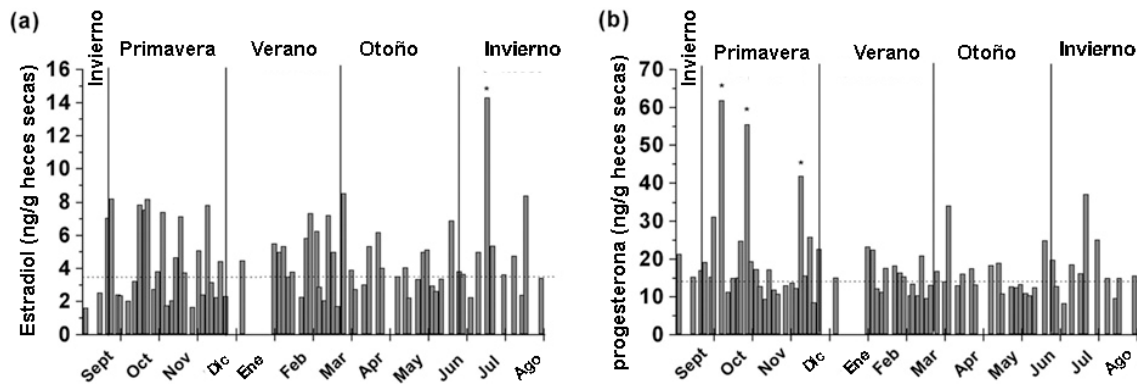


Figura 59: Perfiles anuales de la concentración de hormonas esteroides en heces secas de *Ch. vellerosus*. a) Estradiol. b) Progesterona. La línea punteada representa la concentración basal media de progesterona; *Indica los picos de la hormona.

Variación estacional de progesterona en armadillos a campo.

Las concentraciones de progesterona en muestras de heces secas de *Ch. villosus* produjeron picos durante invierno y primavera, sin embargo no se detectó ningún pico durante el verano o el otoño (Fig. 60a). Un patrón similar se observó en *Ch. vellerosus* con picos en invierno y primavera, y sin picos durante verano y otoño (Fig. 60b).

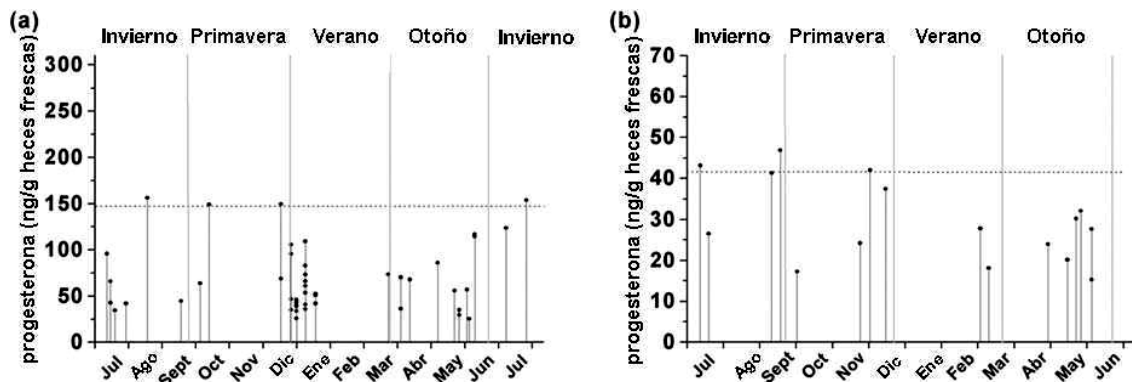


Figura 60: Perfiles anuales de la concentración de progesterona en heces secas de ejemplares a campo (de diferentes localidades) de: a) *Ch. villosus*; y b) *Ch. vellerosus*. La línea punteada representa el valor límite a partir del cual los valores superiores a este límite fueron considerados picos hormonales

Discusión

Discusión

1. La posición filogenética de Xenarthra

La nomenclatura en Xenarthra ha sufrido sucesivas modificaciones desde las primeras descripciones del grupo, tanto en sus formas fósiles o vivientes. En los últimos años, los estudios de filogenia molecular han realizado importantes aportes acerca de la posición filogenética del grupo (Delsuc) y de sus relaciones con los restantes mamíferos placentados. Hasta el momento, los estudios citogenéticos no han ayudado a comprender la historia evolutiva de Xenarthra, esto puede ser debido a que hasta el momento los mismos carecen de profundidad.

Tal como fue propuesto por Glass (1985), los Xenarthra se encuentran solidamente agrupados por un carácter anatómico, las vertebras xenartrales. Nos propusimos encontrar caracteres citológicos que puedan constituir nuevos elementos de discusión al apasionado debate acerca de la posición filogenética del grupo. El comportamiento meiótico del par sexual fue uno de ellos. Tal como dijo Scavone et al. (2000) para *D. novemcinctus* y Sciurano et al. (2006) para *Ch. villosus* y *D. hybridus*, existe un completo apareamiento entre el cromosoma X e Y durante gran parte de la meiosis. Estos resultados fueron extendidos a casi toda la tribu Euphractini mediante nuestro análisis de los bivalentes del paquitene meiótico. El comportamiento del par sexual, podría así, ser característico del superorden Xenarthra, ya que si bien aún resta estudiar el comportamiento de los cromosomas sexuales en perezosos (suborden Phyllophaga), en el oso hormiguero (suborden Vermilingua), sucede lo mismo (Rossi et al. com. pers.). Resta aún, el estudio de pequeñas regiones que podrían permanecer libres, durante cierto momento de la meiosis, tal como fue planteado por Sciurano et al. (2006). De todas formas, de extenderse este

comportamiento a los perezosos, constituiría una característica única de Xenarthra y un elemento más que apoye su monofilia.

Tal como fue mencionado en el capítulo 1.1 de la introducción (“de los Edentados a los Xenarthra), antiguamente se debatió acerca del grupo Edentata, y de la relación de los Xenarthra junto con los pangolines. Si bien, esa hipótesis ya fue descartada tanto por caracteres moleculares (Murphy et al. 2001, Madsen et al. 2001) como morfológicos (Emry 1970), indicando que las similitudes entre los pangolines y los armadillos son un mero fenómeno de convergencia, los caracteres citológicos son también contundentes acerca de esto. Ya que el comportamiento de los cromosomas sexuales en el pangolín chino (*Marmos pentadactyla*), muy es distinto a lo observado en Xenarthra, presentando regiones no apareadas (Chen et al. 1991). Es interesante mencionar que un roedor (*Galea musteloides*), presenta el mismo fenómeno descrito para Xenarthra (Solari 1993).

Por último, respecto de la posición basal de Xenarthra en la filogenia de los mamíferos placentados, nuestros estudios en Euphractini refuerzan la hipótesis de Sciurano et al. (2006) acerca del posible carácter primitivo del comportamiento de los cromosomas sexuales en Xenarthra, lo cual deja abierta la puerta a nuevos estudios en este campo, que ayuden a clarificar la posición filogenética de Xenarthra, un problema que aún sigue sin solución para los paleontólogos y aquellos que centran sus estudios en la filogenia molecular (Scillato-Yané 1980, Delsuc et al. 2001, Gaudin 2004)

Tal vez porque, inicialmente no nos planteamos caracterizar a la familia Dasypodidae (i.e. a todos los armadillos), no hemos encontrado, a través de nuestros estudios, un carácter distintivo de esta familia. Sin embargo, esto no resulta, sorprendente, ya que así como los Xenarthra son muy distintos al resto de los

mamíferos, los armadillos son muy distintos entre sí. Basta con mencionar que los espermatozoides en el género *Dasypus*, morfológicamente, se identifican mejor con los de Pilosa (osos hormigueros y perezosos) que con los de Euphractini, para entender el grado de diferencia. De la misma forma podemos entender que a nivel citogenético no sea evidente la caracterización de grupos que divergieron hace cerca de 40 millones de años (Delsuc et al. 2001).

En cambio, la tribu Euphractini, fue claramente agrupada por características citológicas, que a raíz de nuestros estudios resultaron evidentes, siendo distintivas del grupo respecto de los restantes linajes de Xenarthra. Tanto la presencia de un brazo heterocromático en el par 1, de longitud variable entre géneros, como la presencia de un cromosoma Y puntiforme, constituyeron características únicas y diagnósticas para Euphractini.

2. Obtención de sangre para estudios citogenéticos

Los Xenarthra, por lo expuesto en el capítulo 1.1 (“1.1. De los edentados a los Xenarthra”), difieren del resto de los animales de laboratorio y de las especies de interés veterinario, y al momento no se disponía de una técnica efectiva para obtener sangre a campo en armadillos. Cuyos aspectos anatómicos, como piel gruesa, presencia de placas dérmicas óseas y abundancia de tejido adiposo, entre otros, dificultaron el acceso a vasos sanguíneos, por lo tanto obtener sangre en condiciones adecuadas para el cultivo celular, constituyó inicialmente una limitante importante para nuestro estudio, y requirió un trabajo descriptivo acerca de los sitios adecuados para la obtención de muestras de sangre periférica (Luaces et al. 2011a).

Si bien, inicialmente la sedación resultaba una alternativa atractiva, debido a la gran resistencia física ofrecida por los armadillos, surgieron condicionantes en

relación a la calidad de la muestra de sangre obtenida y el bienestar animal. Ha sido fehacientemente descrita la interferencia de las drogas anestésicas sobre la transformación linfocitaria en el cultivo de linfocitos y algunos componentes sanguíneos (Siebert et al. 2007). En nuestro laboratorio, las muestras de sangre provenientes de armadillos anestesiados con clorhidrato de ketamina, mostraron invariablemente un bajo rendimiento en los cultivos de linfocitos (Luaces et al 2011a). Dado que los armadillos son especies de compleja regulación térmica y metabolismo (Roig 1969, 1970), no conociéndose además, el clearance renal para los diferentes anestésicos en estos animales, la aplicación de anestésicos para obtener muestras aptas para cultivo resultó complicada e imprevisible como elemento citotóxico.

El estrés excesivo durante la manipulación esta asociado a cambios fisiológicos en la sangre que pueden invalidar los resultados de los experimentos (como la alteración de la presión y del número de leucocitos o también la elevación de la glucosa sanguínea, Siebert et al. 2007). Dado que una correcta sujeción agiliza los tiempos de manipuleo, minimizando por consiguiente el nivel de estrés, una eficaz inmovilización y un rápido procedimiento de sangrado fue determinante para obtener una muestra viable para nuestros estudios citogenéticos.

2. Citogenética

Dados los estudios de Mathey en 1949, que concluían que las variaciones cromosómicas encontradas en la naturaleza, pueden ser de diversos tipos, con distintos rearrreglos estructurales como inversiones y traslocaciones, en estados de homo y heterocigosis; a esto sumada la posibilidad de que los híbridos (heterocigotas para un rearrreglo) tengan una fertilidad reducida asociada a mecanismos de

aislamiento post-cigóticos; es que inicialmente nos propusimos caracterizar citogenéticamente a Euphractini y estudiar los tipos de rearrreglos cromosómicos, en sus distribuciones de Argentina.

Ch. villosus, con la distribución mas amplia del grupo, ya había sido estudiada por Benirschke (1969) con un $2n=60$ XY, sin embargo, a través de nuestros estudios en ejemplares representativos de la distribución argentina, no se obtuvieron resultados coincidentes respecto del cariotipo publicado por este autor. Ya que en el mismo, la homologación de los pares difirió de la realizada por nosotros, dado que a nuestro entender, el ejemplar estudiado presentaba un polimorfismo del par 1. Por lo tanto, el orden de ciertos pares cromosómicos fue aproximativo y no coincidente. El cromosoma X, presentado por él, es un elemento acrocéntrico grande y no corresponde al X descrito por nosotros, de morfología submetacentrica y que se encuentra entre los elementos medianos del cariotipo ($4,25\pm 0,51$). Al estudiar el cariotipo confeccionado por Benirschke (1969), observamos que el elemento acrocéntrico grande presentado como X, corresponde al par 2 en todos nuestros ejemplares. Jorge et al. (1977) en una hembra de *Ch villosus*, también describen erróneamente el par sexual, tal como en el trabajo anterior. Y, acorde con nuestros resultados, los elementos por ellos colocados en el par 3, corresponden a los elementos del par sexual XX según nuestro cariotipo. También en este trabajo, se repite el error del trabajo anterior, ya que colocan los elementos que a nuestro entender corresponden al par 2, como par XX. A partir de tinciones diferenciales como bandas G y C, pudimos homologar correctamente los pares y además identificar aquellos erróneamente apareados en trabajos pasados, el cromosoma 2 estudiado por nosotros, muestra el mismo patrón de bandas C que el X descrito por Jorge et al. (1977). El estudio de la meiosis permitió confirmar nuestros resultados, tanto en

cromosomas del estadio de diacinesis/metafase I, que mostró un cromosoma X submetacéntrico y un Y acrocéntrico pequeño, como en complejos sinaptonémicos del paquitene del espermatocito, que permitió medir certeramente los cromosomas sexuales y verificar su morfología y que el cromosoma Y es el elemento mas pequeño del complemento (tal como fue sugerido por el estudio del cariotipo mitótico, correspondiendo al $0,90\pm 0,06\%$ del complemento haploide). La morfología de los autosomas fue también verificada certeramente

El orden inicial de los elementos del cariotipo propuesto por Benirschke (1969) no fue respetado. Ya que, dadas las inconsistencias en el orden de los cromosomas previamente propuesto, se debieron cambiar de lugar algunos pares cromosómicos. Para confeccionar nuevamente el cariotipo, se respetó la convención de Denver (1965), ordenando los elementos criteriosamente, primero por tamaño decreciente, y segundo por morfología, ubicando primero los metacéntricos, después los submetacéntricos y después los acrocéntricos.

En estudios previos, fue descrito en una población de Jacinto Arauz, un rearreglo cromosómico en el par 1, producto de una inversión pericéntrica (Merani 2002). Que da como resultado, en vez de un cromosoma metacéntrico, un cromosoma submetacéntrico. Este rearreglo fue registrado en heterocigosis en 4 individuos y en doble homocigosis (i.e. con ambos elementos del par rearrreglados) en 2 individuos de 22 individuos estudiados. En esta tesis, describimos un reordenamiento en dos ejemplares hembras de la población de Madariaga, que también resultó ser una inversión pericéntrica en el par 1. En este caso, su frecuencia no pudo ser estudiada dado el bajo número de animales que pudieron ser estudiados en estas localidades en las cuales las densidades poblacionales son bajas. Este mismo polimorfismo, fue también encontrado en la localidad de Pellegrini (n=3). De esta forma, se han

caracterizado algunos rearrreglos cromosómicos para *Ch. villosus* en su distribución Argentina, que dado el número de ejemplares estudiados, la frecuencia de los mismos se encontraría en alrededor de 1/500 y según White (1973), correspondería a una frecuencia de mutación espontánea. De todas maneras, dado que restan realizar estudios poblacionales a gran escala, el número de rearrreglos podría ser mas alto de lo que reflejan nuestros resultados, ya que azarosamente, hemos podido, a lo largo de la amplia distribución de *Ch. villosus*, detectar al menos cinco inversiones pericéntricas que involucraron gran cantidad de material cromosómico.

La sonda telomérica, nos sirvió para reconfirmar que en *Ch. villosus*, no se encuentra en otras regiones que no sean los extremos, no detectándose secuencias teloméricas de introgresión en otras regiones de todo el complemento diploide. (Meyne et al. 1990, Slijepcevic 1998).

Ch. vellerosus, ocurre desde el Gran Chaco y la región central de Argentina hasta la provincia de Mendoza y las latitudes medias de la provincia de Buenos Aires (distribución principal o núcleo). Su distribución fue expandida por el descubrimiento de nuevas poblaciones (distribución secundaria) en el área costera de la Bahía de Samborombon, que no son continuas con el área principal ocupada por esta especie. El cariotipo de *Ch. vellerosus* fue informado en trabajos previos (Luaces 2007), presentándose invariable, a lo largo de gran parte de su distribución, salvo por una pequeña inversión pericéntrica en el cromosoma 7. Este rearrreglo cromosómico varió en proporción respecto de las distintas distribuciones, ocurriendo en doble homocigosis (condición rearrreglada) en la distribución principal, y en simple homocigosis (condición original) en la distribución secundaria. Dada la sutil diferencia estructural entre las variantes cariotípicas, es que se verificó la morfología cromosómica mediante técnicas de mayor resolución, como el estudio de los

complejos sinaptonémicos, en individuos de la distribución núcleo y en individuos de la distribución marginal para confirmar lo observado en el cariotipo mitótico. Esta distribución disyunta, fue explicada como un relictos de una paleodistribución más extensa que comprendía el actual territorio de la provincia de Buenos Aires durante el Pleistoceno y parte del Holoceno (Carlini y Vizcaíno 1987). Se calcula así un tiempo importante de aislamiento que podría haber resultado en la fijación de diversos tipos de rearrreglos cromosómicos. Fue objetivo, estudiar las poblaciones marginales de la distribución núcleo, situadas al oeste de la provincia de Buenos Aires (Localidad de Pellegrini), el estudio de los cromosomas mitóticos y meióticos en ejemplares de esta poblaciones mostró que en los animales estudiados, el número fundamental (NF=90) fue igual al existente en la población núcleo.

Si bien los cariotipos difieren entre las dos distribuciones, resta aún caracterizar citogenéticamente a las dos subespecies reconocidas por Yepes (1928), *Ch. vellerosus vellerosus* en el noroeste de su distribución y *Ch. vellerosus pannosus* en el centro-sur. Esta propuesta, tampoco no ha sido validada o descartada con estudios moleculares o nuevos estudios morfológicos.

La sonda telomérica, nos sirvió para aclarar que en *Ch. vellerosus*, esta sonda detecta regiones distales a los centrómeros en todos los caso, salvo por un cromosoma metacéntrico pequeño en donde esta marca se localizó en posición pericentromérica.

El cariotipo de *Z. pichiy*, fue informado previamente por Meritt et al. (1973), si bien el $2n$ de los ejemplares estudiados por nosotros, fue coincidente, el número fundamental varió ya que en su trabajo, Meritt et al. (1973) informan 14 elementos bibraquiados, mientras que nuestros resultados reportan 16 elementos bibraquiados. El número fundamental fue también verificado por el estudio del complejo

sinaptonémico, mediante el cual corroboramos que nuestro número establecido en el cariotipo mitótico era el correcto.

La sonda telomérica, nos sirvió para reconfirmar que en *Z. pichiy*, su localización no se encuentra en otras regiones que no sean los extremos, salvo por un cromosoma metacéntrico pequeño en donde esta marca se localizó en la región pericentromérica al igual que *Ch. vellerosus*.

En *E. sexcinctus* previamente se reportó un cariotipo de $2n=58$ (Benirschke et al. 1969, Jorge et al. 1977, Barroso and Seuánez 1991, Liu et al. 2010). El cariotipo por nosotros informado fue coincidente con lo publicado previamente donde 23 pares fueron bibráquidos y 5 pares acrocéntricos.

Se caracterizaron así, 4 de 5 especies de armadillos eufractinos, se describieron rearrreglos cromosómicos para *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*. Para *Ch. villosus* estos rearrreglos podrían existir como polimorfismos en poblaciones naturales, mientras que para *Ch. vellerosus*, se podrían proponer dos variantes cariotípicas para cada una de sus distribuciones, que serían resultado de variaciones en el cariotipo que fueron fijadas posterior al origen de la discontinuidad en la distribución de *Ch. vellerosus* hace alrededor de 10.000 años. El primer tipo de situación, el rearrreglo es claramente un polimorfismo cromosómico balanceado, donde la frecuencia del mismo dependerá del tipo de selección o del nicho de adaptación, como así también de su incidencia en la fertilidad cuando se encuentra en heterocigosis.

Por último, la caracterización citogenética de estas especies, permitirá estudiar su relación con enfermedades zoonóticas que han sido descriptas en el grupo, y que son de importancia sanitaria nacional.

3. Reproducción

3.1 Morfología de tracto reproductor en machos de *Ch. villosus*

El tracto reproductivo masculino en eufractinos solo ha sido caracterizado en antiguos estudios anatómicos. Recientemente, solo se cuenta con estudios que describen el pene de *Ch. villosus* en relación a procesos neurofisiológicos del sueño (Affanni et al. 2001) o para estudiar la relación entre este y áreas cerebrales como el núcleo de Onuf (Aldana Marcos 1996). Como ya fue mencionado, es por demás importante estudiar la diversidad reproductiva en estas especies ya que no existen trabajos previos que caractericen un sistema por demás diferente de lo que acostumbramos en mamíferos. Si consideramos la relación existente entre el pene y el cuerpo de un animal, podremos acordar que el pene de *Ch. villosus* es uno de los más largos entre los mamíferos. También es lógico pensar en soluciones de diseño que permitan a un animal de fecundación interna, reproducirse normalmente aún a costa de llevar un caparazón, parece una solución reservada para los armadillos, sin embargo esto no se da en todos los integrantes de la familia ya que en el género *Dasypus* esta relación se reduce a menos de la mitad. Y refiere también, a la diversidad morfológica que existe dentro de la familia. Esta relación y morfología se mantiene en el resto de los eufractinos marcando la escasa diferencia existente entre estas especies, sea respecto de su morfología externa, cariotípica o la de los espermatozoides. Se requieren pruebas bioquímicas que aclaren las diferencias existentes entre los espermatozoides de esta tribu, todos iguales morfológicamente, así también como en su forma de nadar (Cordoba et al. 2007, Luaces com pers). Además experimentos de fecundación interespecífica que puedan esclarecer las finas

diferencias entre sus tractos reproductores, que puedan o no traducirse en mecanismos de aislamiento precigótico.

Estudiar el proceso de espermatogénesis tiene como objetivo comprender tanto procesos diversos que puedan estar operando en la producción de gametas en estas especies, como así también ser punto de partida para entender el proceso normal, que indefectiblemente estará afectado en heterocigotas para rearrreglos cariotípicos como fue desmostrado para otras especies de mamíferos (Redi y Capanna 1988).

En el epitelio seminífero de *Ch. villosus* presenta 8 asociaciones celulares (o estadios) diferentes. Hasta el momento, estos estudios sólo fueron realizados en *Dasybus novemcinctus* (Weaker 1977, Torres et al. 1981). En los cuales, inicialmente fueron descriptos 10 estadios (Weaker 1977), aunque luego utilizando metodologías como estudios de marcaje radioactivo timidina tritiada (de alta precisión), el número de estadios fue reducido a 8 (Torres et al. 1981); pudiendo así indicar, que la espermatogénesis, en lo que respecta a la morfología celular general, sería un proceso conservado en el grupo. Describimos además, trece estadios en la espermiogénesis de acuerdo a la morfología celular, ilustrando el proceso de diferenciación desde la espermátide redonda hasta el espermatozoide de cabeza extremadamente delgada y con forma de cuchara.

Se distinguieron claramente, dos tipos de espermatogonias, costrosa y clara, aunque aún resta caracterizar cual de ellas constituye la célula troncal.

3.2 Fisiología de la reproducción:

3.2.1. Ciclo reproductivo en machos de *Ch. villosus*

El epitelio seminífero de *Ch. villosus*, se encontró activo durante la mayor parte del año, menos durante un corto periodo en el cual el proceso de espermatogénesis y por consiguiente la producción de espermatozoides se interrumpió. Este fenómeno nos indica, que ciclos reproductivos con una espermatogénesis de tipo estacional ocurren en *Ch. villosus*. Durante el periodo de inactividad, la arquitectura epitelial colapsa y solo se evidencian células de Sertoli y espermatogonias. Aunque los mecanismos moleculares involucrados en esta interrupción de la normal espermatogénesis son desconocidos, las consecuencias son el completo desprendimiento de los espermatoцитos y las espermátidas, que son liberadas abruptamente al lumen. Cuarenta y cinco días después de la captura de individuos con espermatogénesis interrumpida, los individuos presentaron una completa restitución de la normal actividad del epitelio seminífero, sugiriendo que la duración del proceso espermatogénico es comparable al de otros mamíferos, incluyendo al armadillo *D. novemcinctus* (32-36 días, Torres et al. 1981), el ratón (34,5 días, Oakberg 1956) y la rata (48 días, Leblond y Clermont 1952).

La interrupción estacional de la espermatogénesis es frecuente en muchos mamíferos (ver introducción, punto 3.2.1.), dados los estudios realizados por otros autores en otro armadillo eufractino, *Z. pichiy* (Superina y Jahn 2009), sumado a nuestras observaciones personales en *Ch. vellerosus*, podría plantearse que la interrupción de la espermatogénesis constituiría un proceso fisiológico conservado en Euphractini. Resta aún saber si tanto *Ch. nationi* como *E. sexcinctus* presentan esta característica, siendo en el último menos probable dado que su distribución es mas

cercana al trópico donde la oferta de recursos es menos fluctuante durante el año. En *D. novemcinctus*, una continua espermatogénesis ha sido observada durante el año (McCusker 1985), sin embargo en dicho estudio, las muestras no fueron representativas de todo el periodo anual y quizás el momento de quiescencia gonadal no pudo ser detectado, dado su probable corta duración, como indican nuestros resultados para *Ch. villosus*. No se descarta entonces, que la espermatogénesis estacional podría ser una estrategia reproductiva de todos los armadillos (familia Dasypodidae).

Como fue descrito para otros mamíferos, e.g. vizcachas (*Lagostomus máximus maximus*, Fuentes et al. 1991) y topos (*Talpa europea* y *T. occidentalis*, Tähkä et al. 1989, Rajesh et al. 2010), la actividad reproductiva podría estar regulada por las condiciones ambientales. Y, el fotoperiodo sería el estímulo más importante en la regulación estacional de la reproducción de los animales en sus hábitats naturales. En *Ch. villosus*, una progresiva recuperación de la espermatogénesis coincide con un aumento gradual de las horas luz a partir del mes de junio. También en *Z. pichiy*, los cambios en la actividad espermatogénica se correlacionan con una regulación endocrina estacional (Superina y Jahn 2009). La glándula pineal, tiene un rol crítico en la mediación del fotoperiodo para el control de la función gonadal en diferentes mamíferos, siendo determinante en la regulación del ciclo reproductivo (Lincoln 1979, Domínguez et al. 1987, Reiter 1980). Sin embargo, en *Ch. villosus*, dada la ausencia de una glándula pineal discreta (Benitez et al. 1994), un importante rol de la glándula Harder podría ser postulado (Benitez et al. 1994).

3.2.1. Ciclo reproductivo en hembras de *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*

En armadillos, la imposibilidad de utilizar métodos convencionales, como extendidos vaginales (Iodice 2010) dada la presencia de un seno urogenital en la mayoría de las especies (Cetica et al. 2005), dificulta el estudio del ciclo reproductivo. La recolección de sangre y orina resultan metodologías complejas a la hora de realizar grandes muestreos a campo. Por lo tanto, el estudio de las variaciones hormonales en heces ofrece una alternativa interesante a la hora de monitorear la fisiología reproductiva en armadillos salvajes.

A partir de los ensayos realizados con muestras de materia fecal conservadas por distintas metodologías, pudimos concluir que disecar las muestras antes de conservarlas a -20°C, es fundamental para que los dosajes realizados en materia fecal tengan correlación con aquellos realizados en plasma. No se registró una correlación significativa entre la concentración de progesterona en material fecal húmeda (o sin secar) guardada a -20 °C y la plasmática tanto en *Ch. villosus* como en *Ch. vellerosus*. Esto podría ser explicado por los diferentes grados de dilución ocasionados por el contenido de agua en diferentes muestras. Una correlación significativa fue registrada entre la progesterona plasmática y la progesterona medida a partir de materia fecal disecada.

Diferentes métodos de secado y almacenamiento fueron descritos en la literatura, entre los cuales podemos mencionar, congelamiento de la materia fecal a -20 °C y posterior liofilización antes del almacenamiento final a -20 °C (Superina et al. 2009) y secado en horno entre 55 y 80 °C previo a su almacenamiento en sílica gel (Brockman y Whitten 1996). Tal como fue descrito en trabajos previos (Hirata y Mori 1995, Yamauchi et al. 1999) la concentración de progesterona en materia fecal aumenta entre 30 min y 48 hs posterior a la defecación cuando las heces son almacenadas a

20°C, posiblemente debido a que las bacterias intestinales presentes en la materia fecal convierten los esteroides en una forma no conjugada (Hirata y Mori 1995, Yamauchi et al. 1999). Sin embargo, esto no ocurre a 4 °C (Hirata y Mori 1995, Yamauchi et al. 1999) y un correcto almacenamiento minimiza el potencial impacto de esa actividad (Monfort 2003). Por lo tanto, es importante mantener las muestras recolectadas en el campo a 4-5 °C hasta tanto puedan ser disecadas. Esa desecación podría prevenir la acción de las bacterias intestinales que alteran los metabolitos esteroides.

Sin embargo, este pasaje no es necesario para todas las especies, en el serau japonés (*Capricornis Crispus*, Togashi et al. 2009), una correlación positiva fue descrita entre la progesterona medida en las muestras de material fecal frescas y la progesterona sérica, sin embargo en este estudio la materia fecal debió ser disecada antes de almacenarla a -20 °C para obtener una correlación positiva entre la progesterona medida en suero y materia fecal.

De esta forma, habiendo validado el método, se estudiar los perfiles hormonales y se establecieron los picos a lo largo de un año de muestreo. Los resultados obtenidos en este trabajo, proveen valores de base y de picos hormonales para futuros estudios en *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*. Tanto en hembras de *Ch. villosus* como de *Ch. vellerosus*, observamos un ciclo poliéstrico anual durante fines del invierno y hasta comienzos del verano. Este fenómeno, es muy diferente a lo observado en ejemplares de distribución norteamericana de *D. novemcinctus*, especie que se caracteriza por presentar un retraso en la implantación. En la mayoría de las especies de mamíferos, el estro es corto en comparación con otras fases del ciclo reproductivo (Allen 1922, Matton et al. 1991), y la variación en la concentración de progesterona (fase luteal) provee un indicador mas seguro de la actividad reproductiva que el estradiol (fase

folicular). Existe por lo tanto, una mayor probabilidad de detectar un pico de progesterona que uno de estradiol.

Los ciclos reproductivos de los eufRACTINOS por nosotros observados, podrían resultar en una sincronización de los apareamientos durante las estaciones favorables (Luaces et al. 2011b), que como es de esperar, se encuentran finamente sincronizados entre machos y hembras. Esta estrategia asegura que la mayor parte de las crías nazcan a fines de la primavera y el principio del verano cuando las condiciones ambientales como comida, temperatura y humedad son óptimas. Cuando comparamos el ciclo reproductivo de hembras de *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus*, no observamos, grandes diferencias temporales entre estas especies para los periodos de actividad reproductiva. Lo cual es esperable, dada la mayor disponibilidad de recursos en la época de actividad. De esta forma, podemos postular que ambas especies se encuentran sincronizadas reproductivamente, y el periodo en el que estas especies se reproducen no constituiría una barrera reproductiva entre ellas.

De esta forma, es pertinente afirmar que las especies de Euphractini, no presentan grandes mecanismos de aislamiento pre-cigóticos. A las similitudes morfológicas descritas en sus espermatozoides, ahora añadimos la morfología de sus tractos reproductivos, como así también la cronología de sus ciclos reproductivos tanto en machos como en hembras. Concluimos a partir de nuestros estudios que finos mecanismos de aislamiento reproductivo, estarían actuando en estas especies.

Conclusiones

Conclusiones

- Los armadillos de la tribu Euphractini presentan caracteres citológicos que sustentan la monofilia de Xenarthra.
- La extracción de sangre de cola se convierte en una metodología efectiva para estudios citogenéticos de armadillos.
- El par 1 de Euphractini, así también como el cromosoma Y puntiforme son característicos del grupo.
- *Ch. villosus* presenta un cariotipo que no es constante en su distribución.
- *Ch. vellerosus* presenta un cariotipo establecido para cada una de sus distribuciones.
- *Ch. villosus* presenta una espermatogénesis estacional caracterizada por un corto periodo de quiescencia gonadal a mediados del mes de Mayo.
- Una correlación significativa fue registrada entre la progesterona plasmática y la progesterona medida a partir de materia fecal disecada.
- *Ch. villosus* y *Ch. vellerosus* presentan ciclos ovaricos estacionales que ocurren desde el fin del invierno hasta comienzos del verano.

Bibliografía

Bibliografía

- Abba AM, Cassini MH (2010) Ecological differences between two sympatric species of armadillos (*Xenarthra*, Mammalia) in a temperate region of Argentina. *Acta Theriologica* 55:35-44
- Abba AM, Superina M (2010) The 2009/2010 Armadillo Red List Assessment. *Edentata* 11:135-184
- Abba AM, Vizcaíno SF (2008) Los Xenartros (Mammalia: *Xenarthra*) del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernadino Rivadavia" y del Museo de La Plata, Argentina. *Contribuciones del MACN* 4:5-37
- Abba AM, Vizcaino SF, Cassini SH (2007) Effects of land use on the distribution of three species of armadillos in the Argentinean pampas. *Journal of Mammalogy* 88:502-507
- Affanni JM, Cervino CO, Marcos HJ (2001) Absence of penile erections during paradoxical sleep. Peculiar penile events during wakefulness and slow wave sleep in the armadillo. *Journal Sleep Research* 10:219-228
- Aldana Marcos HJ (1996) Estudio Experimental sobre dos peculiaridades del armadillo *Chaetophractus villosus*: el núcleo de Onuf y la glándula de Harder. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
- Aldana Marcos HJ and Affani JM (2005) Anatomy, histology, histochemistry and fine structure of the Harderian gland in the South American armadillo *Chaetophractus villosus* (*Xenarthra*, Mammalia). *Anatomy Embryology* 209:409-424
- Anderson RP, Handley CO jr (2001) A new species of three-toed sloth (Mammalia: *Xenarthra*) from Panama, with a review of the genus *Bradypus*. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 114:1-33
- Anderson S (1997). Mammals of Bolivia, Taxonomy and Distribution. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 231:1-652
- Azize Atalah G (1975) Presencia de *Chaetophractus villosus* (Edentata, Dasypodidae). Nueva especie para la región de Magallanes, Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia* (Chile) 6:169-171

- Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZM, Gomes GM, Franco M and Montenegro MR (1998) Isolation of *Paracoccidioides basiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic área of paracoccidioidomycosis. American journal of Tropical Medicine and Hygiene 58:12-505
- Bansode, F. W., Chowdhury, S. R. and Dhar, J. D. (2003). Seasonal changes in the seminiferous epithelium of rhesus and bonnet monkeys. J. Med. Primatol. 32, 170-177.
- Barroso CML, Seunánez H (1991) Chromosome studies on *Dasypus*, *Euphractus* and *cabassous* genera (Edentata: Dasypodidae). Cytobios 68:179-196
- Beath MM, Bernischke K, Brownhill LE (1962) The chromosomes of ninebanded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. Chromosoma 13:27-38
- Bedford JM, Millar RP (1978) The character of sperm maturation in the epididymis of the ascrotal hyrax, *Procavia capensis* and armadillo, *Dasypus novemcinctus*. Biology of Reproduction 19:396-406
- Benirschke K, Low RJ, Ferm VH (1969) Cytogenetic studies of some armadillos. In: Benirschke K (ed) Comparative mammalian cytogenetics. Springer-Verlag, New York, pp 330-45
- Benítez, I., Aldana Marcos, H. J. and Affanni, J. M. (1994). The encephalon of *Chaetophractus villosus*. A general view of its most salient features. Comunicaciones Biológicas. 12, 57-73.
- Berg, K. A., Wiger, R., Dahl, E., Torp, T., Farstad, W., Krogenaes, A., McNeilly, A. S., Paulenz, H. and Ropstad, E. (2005). Seasonal changes in spermatogenic activity and in plasma levels of FSH, LH and testosterone, and the effect of immunization against inhibin in the male silver fox (*Vulpes vulpes*). Anat. Histol. Embryol. 34, 220-224.
- Bianchi MS, Bianchi NO, Pantelias GE y Wolff S (1985) The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. Chromosoma 91(2):131-136
- Blottner, S., Hingst, O. and Meyer, H. H. (1996). Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). J. Reprod. Fertil. 108, 299-305.
- Boveri TH (1904) Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Fisher, Jena
- Carlini AA Vizcaíno SF (1987) A new records of the armadillo *Chaetophractus vellerosus* (Gray, 1865) (Mammalia, Dasypodidae) in the Buenos Aires Province of Argentine:

- possible causes for the disjunct distribution. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 22:53-56
- Carr DH, Walker JE (1961) Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes. *Stain technology* 36:233-236
- Carrizo E, Palacio M, Roic LD (2005) Uso medicinal de algunas especies nativas en Santiago del Estero (República Argentina). *Dominguezia* 21(1):25-32.
- Casanave E, Bermúdez P, Polini N (2006) Principal coagulation factors and natural anticoagulants in the armadillo *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Xenarthra, Dasypodidae). *Comparative Clinical Pathology* 14:210-216
- Cetica P, Aldana Marcos HJ Merani MS (2005) Morphology of female genital tracts in Dasypodidae (Xenarthra, Mammalia), a comparative survey. *Zoomorphology* 124(2):57-65
- Cetica P, Rahn IM, Merani MS, Solari A (1997) Comparative spermatology in Dasypodidae II (*Chaetophractus vellerosus*, *Zaedyus pichiy*, *Euphractus sexcinctus*, *Tolypeutes matacus*, *Dasybus septemcinctus* y *Dasybus novemcinctus*). *Biocell* 21:195-204
- Cetica P, Sassaroli J, Merani MS, Solari A (1993) Comparative spermatology in Dasypodidae (*Priodontes maximus*, *Chaetophractus villosus* y *Dasybus hybridus*). *Biocell* 18:89-103
- Cetica PD, Solari AJ, Merani MS, de Rosas JC, Burgos MH (1998) Evolutionary sperm morphology and morphometry in armadillos. *J Submicrosc Cytol and Pathol* 30: 309-314
- Chen Q, Liu R, Wang Y, Shih L (1991) Studies on the mitotic chromosomes and meiotic synaptonemal complexes (SC) of Chinese pangolin (*Mams pentadactyla*) *Zool. Res.* 12: 299-304.
- Claussen U, Michela S, Mühlhig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehra T (2002) Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenetics and Genome Research* 98:2-3
- Cope ED (1889) The Edentata of North America. *The American Naturalist* 23:657-664
- Corin-Frederic J (1969) Les formulas gonosomiques dites aberrants chez les mammifères Euteriers. *Chromosoma* 27:268-87
- Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AMR, Matute DG, McEwen JG y Restrepo A (2005) The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis*

- (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Medical Mycology* 43(3):275-280
- Cuvier GB (1798) Tableau elementaire de l'histoire naturelle des animaux. Bauodouin, Paris
- Dadhich, R. K., Real, F. M., Zurita, F., Barrionuevo, F. J., Burgos, M. and Jiménez, R. (2010). Role of Apoptosis and Cell Proliferation in the Testicular Dynamics of Seasonal Breeding Mammals: A Study in the Iberian Mole, *Talpa occidentalis*. *Biol. Reprod.* 83(1), 83-91.
- De Jong W, Zweers A, Joysey KA, Gleaves JT, Boulter D (1985) Protein sequence analysis applied to Xenarthra and Pholidota phylogeny. En GG Montgomery (ed) The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 65-76
- Delsuc F, Catzeflis FM, Stanhope MJ, Douzery EJ (2001) The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil *Eurotamandua*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 268:1605-1615
- Delsuc F, Stanhope MJ, Douzery EJP (2003) Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 261-275
- Delsuc F, Vizcaíno SF, Douzery EJP (2004) Influence of Tertiary paleoenvironmental changes on the diversification of South American mammals: a relaxed molecular clock study within xenarthrans. *BMC Evolutionary Biology* 4(11):1471-2148
- Desmarest AG (1804) Tableau Méthodique des Mammifères in Nouveau Dictionnaire d'Histoire Naturelle, Appliquée aux Arts, Principalement à l'Agriculture, à l'Économie Rurale et Domestique: Par une Société de Naturalistes et d'Agriculteurs: Avec des Figures Tirées des Trois Règnes de la Nature Deterville Vol 24, Paris
- Dobigny G, Ducroz JF, Robinson TJ, Volobouev V (2004) Cytogenetics and Cladistics. *Systematic Biology* 53:470-484
- Dobigny G, Yang F, O'Brien PCM, Volobouev V, Kovács A, Pieczarka JC, Ferguson-Smith MA and Robinson TJ (2005) Low rate of genomic repatterning in Xenarthra inferred from chromosome painting data. *Chromosome Research.* 13(7):651-663

- Dominguez, S., Piezzi, R. S., Scardapane, L. and Guzman, J. A. (1987). A light and electron microscopic study of the pineal gland of vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). *J. Pineal Res.* 4, 211-219.
- Emry RJ (1970) A North American Oligocene pangolin and other additions to the Philidota. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 142:455-570
- Engelmann G (1985) The phylogeny of the Xenarthra. En GG Montgomery, (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 51-64
- Evans EP, Breckon G, Ford CE (1964) An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics* 3(5):289-294
- Fernández M (1909) Beiträge zur Embriologie der Gürteltiere. Zur Keimblü inversion und spezifischen Polyembryonie der Mulita (*Tatusia hybrida* Desm). *Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch* 39:302-333
- Fonseca GAB, Rylands AB, Costa CMR, Machado RB, Leite YLR (1994) *Livro vermelho dos mamíferos Brasileiros ameaçados de extinção*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte
- Forejt J (1982) X-Y involvement in male sterility caused by autosome translocations: a hypothesis. En: DG Crosignani and BL Rubin (eds) *Genetic Control of Gamete Production and Function*. Grune and Stratton, New York, pp 135-151
- Fuentes, L. B., Caravaca, N., Pelzer, L. E., Scardapane, L. A., Piezzi, R. S. and Guzman, J. A. (1991). Seasonal Variations in the Testis and Epididymis of Vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*) *Biol. Reprod.* 45, 493-497.
- Furuta, I., Porkka-Heiskanen, T., Scarbrough, K., Tapanainen, J., Turek, F. W. and Hsueh, A. J. (1994). Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters. *Biol. Reprod.* 51, 1315-1321.
- Galbreath GJ (1985) The evolution of monozygotic polyembryony in *Dasypus*. En GG Montgomery (Ed) *The evolution and ecology of armadillos, Sloths, and vermilinguas*, Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 243-246
- Garagna S, Redi CA, Zuccotti M, Britton-Davidian J, Winking H (1990) Kinetics of oogenesis in mice heterozygous for Robertsonian translocations. *Differentiation* 42:167-171

- Gardner AL (2005) Order Cingulata and order Pilosa. En DE Wilson and DM Reeder (eds) Mammal species of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimor. Vol 1 pp 94-103
- Gaudin TJ (1995) The ear region of edentates and the phylogeny of the Tardigrada (Mammalia, Xenarthra). *Journal of Vertebrate Paleontology* 15:672-705
- Gaudin TJ (1999) The morphology of the xenarthrous vertebrae (Mammalia: Xenarthra). *Fieldiana* 1505(41):1-38
- Gaudin TJ (2004) Phylogenetic relationships among sloths (Mammalia, Xenarthra, Tardigrada): the craniodental evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 140(2):255-305
- Gaudin TJ y Wible JR (2006) The phylogeny of living and extinct armadillos (Mammalia, Xenarthra, Cingulata): a craniodental analysis. En MT Carrano, TJ Gaudin, RW Blob and JR Wible (eds) *Amniote paleobiology: perspectives on the evolution of mammals, birds and reptiles*. University of Chicago Press, Chicago, pp 98-153
- Gaudin TJ, Wible JR, Hopson JA, Turnbull WD (1996) Reexamination of the morphological evidence for the cohort Epitheria (Mammalia, Eutheria). *Journal of Mammalian Evolution* 3(1):31-79
- Gill T (1872) Arrangement of the familias of mammals with analytical tables. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 11:1-98.
- Glass B (1985) History of classification and nomenclature in Xenarthra (Edentata). En GG Montgomery (ed) *The ecology and evolution of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 1-3
- Gomendio M, and Roldan ERS (2008) Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal Development Biology* 52:439-447
- Grassé PP (1955) Ordre des Édentés. Formes actuelles. Sousordre des Xénarthres. En : PP Grassé (ed). *Traité de Zoologie, Mammifères Les Ordres: Anatomie, Éthologie, Systématique*. Masson and Cie Press, Paris, pp 1182-1266
- Greggor DH Jr (1980) Preliminary study of movements and home range of the armadillo *Chaetophractus vellerosus*. *Journal of Mammalogy* 61:334-335.
- Greggor DH Jr (1985) Ecology of the little hairy armadillo *Chaetophractus vellerosus*. En: GG Montgomery (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 397-405

- Herbst LH, Webb AIA (1988) simple technique for sampling blood from fully conscious nine-banded armadillos. *Lab Ani Sci.* 38:335-336.
- Hotta Y, Chandley AC (1982) Activities of X-linked enzymes in spermatocytes of mice rendered sterile by chromosomal alteration. *Gamete Research* 6:65-72
- Howell WM, Black D (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36:1014-1015
- Huxley T (1872) *A manual of the anatomy of vertebrated animals.* Cornell University Library, New York
- Illiger C (1811) *Prodromus systematis mammalium et avium additis terminis zoographicis utriusque classis, eorumque versione germanica.* C Salfield, Berlin
- Iodice OH (2009) *Armadillos y zarigüeyas como modelos experimentales en la investigación biomédica: contribuciones a la generalización de su uso.* Universidad de Morón, Secretaría de Ciencia y Tecnología
- Johnson, L. (1991). Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biol. Reprod.* 44, 284-291.
- Jorge W (1982) Chromosome study in the “Pichiciego Argentino”, *Chlamyphorus truncatus Harlan* (Dasypodidae, Edentata). *Mammalian Chromosomes Newsletter* 23(03):101-7
- Jorge W, Best RC, Wetzel RM (1985a) Chromosome studies on the silky anteater *Cyclopes didactylus* L (Myrmecophagidae: Xenarthra, Edentata). *Caryologia* 38:325-329
- Jorge W, Meritt DA and Bernirschke K (1977) Chromosomes studies in Edentata. *Cytobios* 18: 157-72
- Jorge W, Orsi-Souza AT, Best RC (1985) The somatic chromossomes of Xenarthra. En GG Montgomery (Ed) *The evolution and ecology of armadillos, Sloths, and vermilinguas.* Smirtsonian Institution Press, Washington DC pp 121-129
- Jorge W, Pinder L (1990) Chromosome study on the maned sloth *Bradypus torquatus* (Bradypodidae, Xenarthra). *Cytobios* 62:21-25
- Jorge, W. (2000) Mitotic and meiotic chromosome studies in silky anteater *Cyclopes didactylus* (Myrmecophagidae: Xenarthra). *Cytobios* 101:95-100

- Kaneko, K., Akiya, Y., Sato, H., Tanaka, A., Aoki, H., Miyoshi, M., Abukawa, T., Mochizuki, M. and Kawakami, S. (2009). Seasonal influence on testicular function of male raccoons, *Procyon lotor*. *Anim. Reprod. Sci.* 112, 283-292.
- Karlin S, Nevo E (1986) Evolutionary processes and theory. Academic Press, Orlando
- Kaudern W. 1914. Studien über die männlichen Geschlechtsorgane von Edentaten. I. Xenarthra. *Arkiv for zoologi* 9:1-53.
- Kin MS, Fort M, Bedotti, Casanve EB (2010) Detección de anticuerpos contra *Brucella sp.* en *Chaetophractus villosus* (Desmarest, 1804) en La Pampa, Argentina. XXIII Jornadas Argentinas de Mastozoología, SAREM, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- King M (1987) Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity* 59:1-6.
- King M (1993) Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge University Press, New York
- Leblond C P, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *The Annals of the New York Academy of Sciences* 55:548-73
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2):201-220
- Lincoln, G. (1979). Photoperiod control of seasonal breeding in the cat: participation of the cranial sympathetic nervous system. *J. Endocrinol.* 82, 135-147.
- Linnaeus C (1758) *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* Laurentii Salvia, Stockholm.
- Luaces JP, González Sánchez Wusener A, Aparicio E, Chumino Rodríguez Y, Cética PD, Aldana Marcos H, Merani MS (2006) Estacionalidad en el ciclo celular del epitelio seminífero en Xenarthra. I Congreso Sudamericano de Mastozoología. Gramado Río Grande do Sul Brasil.
- Luaces JP, Ciuccio M, Rossi LF, Faletti AG, Cetica PD, Casanave EB, Merani MS (2011b) Seasonal changes in ovarian steroid hormone concentrations in the large hairy armadillo (*Chaetophractus villosus*) and the crying armadillo (*Chaetophractus vellerosus*). *Theriogenology* 75:796-802

- Luaces JP, Rossi LF, Aldana Marcos HJ, Merani MS (2011a) The rete mirabile of the tail, an effective site for sampling sterile blood from armadillos. Development of a simple and safe method for obtaining culture viable lymphocyte considering anatomo-histological evidences in five genera of Xenarthra. Italian Journal of Zoology. Vol. 78(1): 63-69.
- Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, DeBry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS (2001) Parallel adaptative radiations in two major clades of placental mammals. Nature 409:610-614
- Mammals (Armadillos, Anteaters and Sloths) - Molecular Biology and Evolution 24: p2573-258
- mammals. Endocrine. Rev. 1:109-131.
- Massoia E (1970) Contribución al conocimiento de los mamíferos de Formosa con noticias de los que habitan zonas vinateras. IDIA (INTA) 276:55-63
- Matthew WD (1918) A revision of the coger Eocene Wasatch and Wind River faunas. Part 5 – Insectivora (part.), Glires, Edentata. Bulletin of the American Museum of Natural History 38:565-657
- Matthey R (1949) Les Chromosomes des Vertebres. Rouge, Lausanne.
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York
- Mc Nab BK (1980) Energetics and the limits to a temperate distribution in armadillos. Journal of Mammalogy 61:606-627
- Mc Nab BK (1985) Energetics, population biology, and distribution of xenarthrans, living and extinct. En GG Montgomery (Ed) The evolution and ecology of armadillos, Sloths, and vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington DC pp 219-132
- McCusker GJ (1985) Testicular cycles in the common long-nosed armadillo *Dasyopus novemcinctus*, in North Central Texas. En: Montgomery GG (ed) The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 255-60
- McDonald HG (2003a) Sloth remains from North American caves and associated karst features. En BW Schubert, JI Mead, RW Graham (eds) Ice Age cave faunas of North America, Indiana University Press, Indianapolis pp 1-16
- McDonald HG (2003b) Xenarthra skeletal anatomy: primitive or derived? (Mammalia, Xenarthra). Senckenbergiana biologica 83:5-17

- McDonough CM (1997) Pairing behavior of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*).
The American Midland Naturalist 138:290-298
- McKenna MC, Bell SK (1997) Classification of mammals above the species level. Columbia
University Press, New York
- Medri IM, Superina M (2010) *Euphractus sexcinctus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of
Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 29 November
2011.
- Mendel FC (1985) Adaptations for suspensory behavior in the limbs of two-toed sloth. En GG
Montgomery (Ed) The evolution and ecology of armadillos, Sloths, and vermilinguas.
Smithsonian Institution Press, Washington DC pp 62-151
- Merani MS (2002) Libro de resúmenes, I Congreso "Osvaldo A Reig" de Vertebradología
Básica y Evolutiva e Historia y Filosofía de la Ciencia, pp 52-53
- Meritt D, Benirschke K (1973) The chromosomes of *Zaedyus pichiy* Ameghino, 1889.
Mammalian Chromosomes Newsletter 14(3):108-109.
- Miranda F, Medri IM (2010) *Myrmecophaga tridactyla*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of
Threatened Species. Version 2011.2.<www.iucnredlist.org>. Downloaded on
29 November 2011
- Möller-Krull M, Delsuc F, Churakov G, Marker C, Superina M, Brosius J, Douzery EJP,
Schmitz J (2007) Equal contribution. Retroposed elements and their flanking regions
resolved the evolutionary history of xenarthran mammals (armadillos, anteaters and sloths).
Molecular Biology and Evolution 24:2573-2582
- Mones A (1986) Palaeovertebrata Sudamericana. Catálogo sistemático de los vertebrados
fósiles de América del Sur, Parte 1. Lista preliminar y Bibliografía. Courier
Forschungsinstitut Senckenberg, Frankfurt
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DMA, Hungerford DA (1960) Chromosome
preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Experimental Cell
Research 20:613-16
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ (2001) Molecular
phylogenetics and the origins of placental mammals. Nature 406:618-614

- Murphy WJ, Fröncke L, O'Brien SJ, Stanyon R (2003) The Origin of Human Chromosome 1 and Its Homologs in Placental Mammals. *Genome Research* 13:1880-1888
- Newman HH (1912) The ovum of the nine-banded armadillo. Growth of the oocytes maturation and fertilization. *Biological Bulletin* 23:359-424
- Newman MM, Patterson JT (1910) The development of the ninebanded armadillo from primitive streak stage to birth with special reference to the question of specific polyembryony. *Journal of Morphology* 21:359-424
- Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 5th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Oakberg EF (1956) A description of spermatogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy* 99:391-413
- Olfert ED, Cross BM, McWilliams AA (1993) Guide to the care and use of experimental animals. 2nd ed Vol 1. Canadian Council on Animal Care, Ottawa
- Osborn HF (1910) The age of mammals in Europe, Asia, and North America. MacMillan Company, New York.
- Painter TS (1925) Chromosome number in mammals. *Science* 61:423-424.
- Parera A (2002) Los mamíferos de la Argentina y la región austral de América del Sur. Editorial El Ateneo, Buenos Aires
- Patterson B, Segall W, Turnbull WD, Gaudin TJ (1992) The ear region in Xenarthrans (=Edentata: Mammalia). Part II Pilosa (Sloths and anteaters), palaeodonts, and a miscellany. *Fieldiana Geology* ns 24:1-79
- Peppler RD (2008) Reproductive biology of the nine-banded armadillo. En: SF Vizcaíno, WJ Loughry (ed) *Biology of Xenarthra*. University Press of Florida, Gainesville, pp 151-159
- Perez Zubieta JC (2008) Algunos aspectos de la historia natural del quirquincho andino en hábitats aledaños a tres localidades de la provincia Sur Carangas, Oruro, Bolivia. Tesis de grado. Facultad de Ciencias y tecnología, Universidad de San Simón.
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P (1997) A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Research* 5(1):66-8

- Poljak SJ, Escobar G, Deferrari, Lizarralde MS (2007) Un nuevo mamífero introducido en la Tierra del Fuego: el “peludo” *Chaetophractus villosus* (Mammalia, Dasypodidae) en Isla Grande. *Revista Chilena de Historia Natural* 80:285-294.
- Prodöhl PA Loughry JW, McDonough MC, Nelson WS, Thompson EA and Avise JC (1998) Genetic maternity and paterniy in a local population of armadillos asessed bymicrosatellite DNA markers and field data. *American Nauralist* 151:7-19
- Redford KH (1985) Food habits of armadillos (Xenarthra: Dasypodidae). En: Montgomery GG (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 429-437
- Redford KH y Eisenberg JF (1992) *Mammals of the Neotropics. Vol 2 The souther cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay*. University of Chicago Press, Chicago
- Redi CA, Hilscher B, Winking H (1983) Stage-dependent enzymatic activities in spermatogenesis of mice with the standard karyotype and of chromosomal variants with impaired fertility. *Andrologia* 15:322-330
- Redi CA, Capanna E (1988) Robertsonian heterozygotes in the house-mouse and the fate of their germ cells. En: A Daniel (ed) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. Alan R Liss, New York, pp 315-359
- Reig OA (1984) Significado de los métodos citogenéticos para la distinción y la interpretación de las especies, con especial referencia a los mamíferos. *Zoología XIII* 3:19-44
- Reiter, R. J. (1980). The pineal gland and its hormones in the control of reproduction in
- Reiter, R. J. (1986). The pineal gland pubertal development in mammals: a state of the art assessment. In: ‘The Pineal Gland during Development’. (Eds. I. D. Gupta and R. J. Reiter.) pp. 100-116. (Croom Helm: London.)
- Richard F, Lombard M, Dutrillaux B (2000) Phylogenetic Origin of Human Chromosomes 7, 16, and 19 and their Homologs in Placental Mammals. *Genome Research* 10:644-651
- Robinson TJ, Ruiz-Herrera A (2010) Mammalian Chromosomal Evolution: From Ancestral States to Evolutionary Regions. En: P Pontarotti (ed) *Evolutionary Biology Concepts, Molecular and Morphological Evolution*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp 143-158
- Roig VG (1971) Observciones sobre la termorregulación en *Zaedyus pichiy*. *Acta zoológica Lilloana* 28:13-18

- Roldan ERS, Gomendio M, Vitullo AD.1992. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: females selection and sperm competition. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 67:551-593
- Roman EA, Ricci AG, Faletti AG (2005) Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 242:33-41
- Romer AS (1966) *Vertebrate Paleontology*. 3rd Ed (Vol III). University Of Chicago Press, Chicago
- Rose KD, Emry RJ, Gaudin TJ, Storch J (2005) Xenarthra and Pholidota. En KD Rose and JD Archibald (eds), *The rise of placental mammals: Origins and relationships of the major extant clades*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 26-106
- Rossi LF, Luaces JP, Aldana Marcos HJ, Cetica PD, Gachen G, Perez Jimeno G, Merani M.S. 2011. Female reproductive tract of the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*, Myrmecophagidae, Xenarthra). *Anatomy and histology. Journal of Morphology* doi, 10.1002/jmor.10983
- Saez FA, Drets ME, Brum N (1964) Chromosomes of the mulita (*Dasypus hybridus* Desmarest): a mammalian edentate of South America. In: *Mammalian cytogenetics and related problems in radiobiology*. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, pp 163-70
- Sankoff D (2003) Rearrangements and chromosomal evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 13:583-587.
- Sarich VM (1985) Xenarthran systematics: albumin immunological evidence. En GG Montgomery (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 77-81.
- Sato, T., Tachiwana, T., Takata, K., Tay, T. W., Ishii, M., Nakamura, R., Kimura, S., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. (2005). Testicular dynamics in Syrian hamsters exposed to both short photoperiod and low ambient temperature. *Anat. Histol. Embryol.* 34, 220-224.
- Scavone MDP, Oliveira C, Bagagli E, Foresti F (2000). Analysis of the synaptonemal complex of the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Genetics and Molecular Biology* 23:613-616

- Schön, J., Göritz, F., Streich, J., Blottner, S. (2004). Histological organization of roe deer testis throughout the seasonal cycle: variable and constant components of tubular and interstitial compartment. *Anat. Embryol.* 208(2), 151-159.
- Scillato-Yané GJ (1980) Catálogo de los Dasypodidae fósiles (Mammalia, Edentata) de la República Argentina. Actas del Segundo Congreso Argentino de Paleontología y Bioestratigrafía y Primer Congreso Latinoamericano de Paleontología Vol 3, pp7-36
- Sciurano RB, Merani MS, Bustos J, Solari AJ (2006) Synaptonemal complexes and XY behavior in two species of argentinian armadillos: *Chaetophractus villosus* and *Dasypus hybridus* (Xenarthra, Dasypodidae). *Biocell* 30(1):57-66
- Scott WB (1937) A history of land mammals in the west hemisphere. MacMillan Company, New York
- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972
- Shaw JH, Carter TS, Machado-Neto JC (1985) Ecology of the giant anteater *Myrmecophaga tridactyla* in Serra da Canastra, Minas Gerais, Brazil: a pilot study. En GG Montgomery (Ed) The evolution and ecology of armadillos, Sloths, and vermilinguas, Smithsonian Institution Press, Washington DC pp 379-384
- Sheng, X., Zhang, H., Zhang, W., Song, M., Zhang, M., Li, B., Weng, Q., Watanabe, G. and Taya, K. (2008). Seasonal changes in spermatogenesis and immunolocalization of inhibin/activin subunits in the wild male ground squirrel (*Citellus dauricus* Brandt). *J Reprod Dev.* 54: 460-464.
- Simpson GG (1945) The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 85:1-350
- Sobarzo CM, Lustig L, Ponzio R, Suescun MO, Denduchis B (2009) Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on gap and tight junction protein expression in the testis of prepubertal rats. *Microscopy Research and Technique* 72(11):868-77
- Soibelzon E, Carlini A A, Tonni EP, Soibelzon, LH (2006) *Chaetophractus vellerosus* (Mammalia: Dasypodidae) in the Ensenadan (Early-Middle Pleistocene) of the southeastern Pampean region (Argentina). *Paleozoogeographical and paleoclimatic aspects: Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Monatshefte* 12:734-748

- Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ (2003) Placental mammal diversification and the cretaceous-tertiary boundary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:1056-1061
- Stanyon R, Rocchi M, Capozzi O, Roberto R, Misceo D, Ventura M, Cardone MF, Bigoni F, Archidiacono N (2008) Primate chromosome evolution: ancestral karyotypes, marker order and neocentromeres. *Chromosome Research* 16:17-39.
- Storrs EE. (1989) Reproduction delay in the common long-nosed armadillo, *Dasypus novemcinctus* L. En: KH Redford, JF Eisenberg (eds) *Advances in Neotropical Mammalogy*. Sandhill Crane Press, Gainesville, Florida, pp 535-548
- Superina M, Carreño N, Jahn, A (2009) Characterization of seasonal reproduction patterns in female pichis, *Zaedyus pichiy* (Xenarthra: Dasypodidae) estimated by fecal sex steroid metabolites and ovarian histology. *Animal Reproduction Science*, 2009, 116: 358-369
- Superina M, Jahn GA (2009) Seasonal reproduction in male pichi *Zaedyus pichiy* (Xenarthra: Dasypodidae) estimated by fecal androgen metabolites and testicular histology *Animal Reproduction Science* 112 : 283-292
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75(1):304-6
- Superina M, Abba AM (2010) *Chaetophractus nationi*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 29 November 2011.
- Superina M, Abba AM (2010b) *Zaedyus pichiy*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 29 November 2011.
- Superina M, Miranda FR, Abba A (2010) The 2010 Anteater Red List Assessment - Edentata 11: p96-114
- Sutton WS (1902) On the Morphology of the Chromosome Group in *Brachystola magna*. *Biological Bulletin* 14:24-39
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM (1996) Phylogenetic inference. En: DM Hillis, C Moritz, BK Mable (eds). *Molecular systematics*, 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass pp 407-514

- Tähkä, K. M., Teräväinen, T., Pankakoski, E. and Jalkanen, M. (1989). The testes of moles (*Talpa europaea*) retain a considerable microsomal capacity for androgen synthesis during seasonal regression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76, 301-309.
- Talmage RV and Buchanan GD (1954) The armadillo (*Dasypus novemcinctus*). A review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. Rice Institute Pamphlet 41:1-135
- Tamada, H., Tsukamoto, Y., Nishida, T. and Sasaki, F. (2000). Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-testes axis of the Japanese wood mouse (*Apodemus speciosus*). *Anat. Rec.* 260, 366-372.
- Tamayo HM (1973) Los armadillos de Chile. Situación de *Euphractus sexcinctus* (Linneo 1758), (Mammalia, Edentata, Dasypodidae). *Noticiario Mensual del Museo Nacional de Historia Natural de Chile (Chile)* 17:203-204
- Thomas O (1894) On a new species of armadillo from Bolivia. *Annals and Magazine of Natural History* 13(6):70-72.
- Torres, C. N., Godinho, H. P. and Setchell B. P. (1981). Frequency and duration of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *J Reprod. Fertil.* 61, 335-340.
- Vicq D'Azyr MF (1972) *Système anatomique des quadrupedes*. *Encycl Methodique*. Agasse, París
- Vizcaíno SF, Abba AM, García Esponda CM (2006) Magnaorden Xenarthra. En: RM Barquez, MM Díaz y RA Ojeda (Eds) *Mamíferos de Argentina: Sistemática y Distribución*, Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, San Miguel de Tucumán, Argentina pp 46–56
- Vizcaíno SF, Scillato-Yané (1995) Eocene tardigrade (Mammalia, Xenarthra) from Seymour Island, West Antarctica. *Antartic Science* 7:408-407
- Waddel PJ et al. (1999) Towards resolving the interordinal relationships of placental mammals. *Systematic Biology* 48:1-5
- Wallace BMN, Searle JB, Everett CA (2002) The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytogenetic and Genome Research* 96:276-286

- Weaker, F. J. (1977). Spermatogonia and the cycle of the seminiferous epithelium in the nine-banded armadillo. *Cell Tissue Res.* 179(1), 97-109.
- Weir BJ, Rowlands IW (1973) Reproductive strategies of mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4:139-163
- Werdelin L, Nilsson A (1999) The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. *The Journal of Theoretical Biology* 196:61-72
- Wetzel RM (1982) Systematics, distribution, ecology and conservation of south american Edentates. En: MM Mars and HH Genoways (eds) *Mammalian Biology in South America*. Special Publication series, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburg, Pennsylvania, U.S.A
- Wetzel RM (1985a) The identification and distribution of recent Xenarthra (=Edentata). En GG Montgomery (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 5-21
- Wetzel RM (1985b) Taxonomy and distribution of armadillos. En GG Montgomery (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 23-46
- White MJD (1973) Chromosomal Rearrangements in Mammalian Populations Polymorphism and Speciation. En: Chiarelli AB y Capanna E (eds) *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, London, pp 95-124
- White MJD (1977) *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, London
- Wilson DE, Reeder DM (1993) *Mammalian species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington
- Yeo M, Acosta M, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GAJ, López E, González N, Patterson JS, Gaunta MW, Rojas de Arias A, Miles MA (2005) Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology* 35:225-233
- Yepes JV (1928) Los "Edentata" argentinos. *Sistemática y distribución*. *Revista Universidad de Buenos Aires* 2(5):461-515

Anexo

Anexo

1. Soluciones

Medio de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron RPMI 1640 y MEM Modificado a pH 7. La preparación de los medios de cultivo se realizó a partir de preparados de aminoácidos y vitaminas comerciales liofilizados, los cuales fueron diluidos en agua tridestilada estéril de alta calidad obtenida a partir de filtros Milli-Q Millipore. Posteriormente los medios fueron filtrados a través de dos membranas clarificantes. Seguidamente fueron filtrados a través de una membrana de retención bacteriana y, finalmente, a través de una membrana de 0.22 µm para retención viral. A continuación, los medios de cultivo fueron fraccionados en flujo laminar en alícuotas de 8 ml y 4 ml en frascos de 50 ml que luego fueron debidamente cerrados con tapones de goma estériles y finalmente precintados.

Colchicina

Se prepararon soluciones madre de colchicina de concentración 0.1 mg/ml, las cuales fueron conservadas a 4°C en frascos ampolla debidamente cubiertos con papel de aluminio. Para la obtención de la solución de colchicina con concentración óptima para el trabajo con los cultivos, se efectuaron diluciones 1:10 en solución fisiológica destilada estéril (concentración 10 µg/ml).

Suero

Se utilizó suero fetal bovino de marcas Natocor y Bioser, los cuales se encuentran en estado líquido y condiciones de esterilidad.

FHA

La Fitohemaglutinina de marca Sigma fue diluida 1:25 en solución fisiológica estéril. La mitogenicidad de la misma fue evaluada adicionando a un cultivo de linfocitos 0.1 ml, 0.2 ml y 0.3 ml

de dicha dilución por cada 10 ml de medio de cultivo. Una vez establecida la dilución de mayor poder mitogénico, ésta fue utilizada hasta finalizar el stock.

5 Penicilina-estreptomicina

La solución de Penicilina-Estreptomicina fue preparada partir de agua bidestilada en las siguientes concentraciones:

- Penicilina G (sódica) 104 U1/ml diluida en 100 ml de agua bidestilada.
- Estreptomicina 50 µg/ml diluida en 100 ml de agua bidestilada.

Posteriormente, fue fraccionada debidamente en alícuotas de 2 ml para ser utilizada en los cultivos.

Hipotonía

La solución hipotónica fue preparada a partir de 1 litro de agua tridestilada con concentración KCL 0,007 Molar.

Bandas G:

a) Enzima

ClNa 9 gr./litro 25ml

PO₄Hna 0,11 N 25ml

Tripsina Difco 1% 10 ml

PH= 7,5

b) PO₄Hna 0,11 N 8 gr./litro

PO₄Hna 12 H₂O 10,08 gr./500 ml

Tripsina Difco 1:250 1gr. En 100 ml de H₂O dest. Agitación en un erlemeyer por una hora y luego filtrar y alicuotar.

c) Buffer Sorensen para coloración

Sol A PO₄H₂K 4,54 gr. en 500 ml.de H₂O dest.

Sol B PO₄HNa₂ 5,94 gr. en 500 ml. De H₂O dest.

Sol de coloración

Sol. A	60 ml.
Sol B	30 ml.
Giemsa	8 a 10 ml.

Bandas C

- HCL 0,2 N 1,6 ml. De ácido clorhídrico en 100 ml. de H₂O destilada
- Sol de(OH) al 5% en agua bidestilada (preparar en el momento)
- Sol SSC ClNa 8,76 gr.
 Citrato de Na 4,41 gr
 Disolver en 500 ml. de agua bidestilada
- Coloración: Giemsa 1/50 en el siguiente buffer:
 Sol A PO₄H₂K 4,53 gr./500 ml. de agua bidest 70 ml.
 Sol B PO₄HNa₂ 9,47 gr./500 ml. de agua bidest 30ml

Tinción de NOR (nucleolar organizing regions) según Howel and Black, 1980

Solución de Nitrato de Plata al 50%

Agua bidestilada	500µl
Nitrato de Plata	0.25 gr

Preparar en pequeñas cantidades en un tubo eppendorf. Envolver el tubo en papel aluminio para evitar la exposición a la luz.

Solución de gelatina 1%

0.1g de gelatina
10 ml. De agua destilada

50 µl de ac. Fórmico

Disolver la gelatina en agua calentando a 60-70° dejar enfriar y agregar el ac fórmico, guardar en frascos color caramelo.

2. Procedencia de las muestras

Especie	Localidad	Sexo	Nº de individuos
<i>Ch. villosus</i>	Neuquén	H	2
<i>Ch. villosus</i>	La Pampa (Gral. Acha)	H	2
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Gral. Madariaga)	H	3
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Navarro)	M	21
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Navarro)	H	6
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Gral. Las Heras)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Saladillo)	M	4
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Saladillo)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Bahía Blanca)	M	14
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Bahía Blanca)	H	14
<i>Ch. villosus</i>	Sgo. del Estero (San Pedro de Guasayan)	M	1
<i>Ch. villosus</i>	Sgo. del Estero (San Pedro de Guasayan)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (El Remanso)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Formosa (La Salvación)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Gral. Paz)	M	4
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Gral. Paz)	H	4
<i>Ch. villosus</i>	Temaiken	M	1
<i>Ch. villosus</i>	Temaiken	H	2
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Brandsen)	M	1
<i>Ch. villosus</i>	Mendoza (Cerro de la Gloria)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Pellegrini)	M	3
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Pellegrini)	H	6
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Medanos)	M	1
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Medanos)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Córdoba (Santo Domingo)	H	1
<i>Ch. villosus</i>	Cordoba (Los Hormigueros)	M	1
<i>Ch. villosus</i>	Córdoba (Zoo Tatu Carreta)	M	1
<i>Ch. villosus</i>	San Luis	M	2
<i>Ch. villosus</i>	San Luis	H	2
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Loma Verde)	M	63
<i>Ch. villosus</i>	Buenos Aires (Loma Verde)	H	57
			223

Distribucion principal			
Especie	Localidad	Sexo	Nº de individuos
<i>Ch. vellerosus</i>	La Pampa (Naico)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	La Pampa (Naico)	H	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Chaco (Roque Sáenz Peña)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Chaco (Roque Sáenz Peña)	H	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Córdoba (Jesús María)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	San Juan (San Juan)	H	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (La Cocha)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (La Cocha)	H	3
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (Los Perez)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (El Palancho)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (La Cañada)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (La Madrid)	H	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (Horco Molle)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (Horco Molle)	H	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (Domingo Millan)	M	2

<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (Huasa Pampa N)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Tucumán (Huasa Pampa S)	M	1
<i>Ch. vellerosus</i>	Cordoba (Santo Domingo)	H	3
<i>Ch. vellerosus</i>	Salta (El Quebrachal-MACN)	M	1
<i>Ch. vellerosus</i>	Cordoba (La Paz-MACN)	M	2
<i>Ch. vellerosus</i>	Jujuy (Abrapampa-MACN)	H	1
<i>Ch. vellerosus</i>	Cordoba (Santo Domingo)	H	3
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Pellegrini)	M	3
<i>Ch. vellerosus</i>	San Luis (El Centenario)	M	1
			48

Distribución secundaria

Especie	Localidad	Sexo	Nº de individuos
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Bahía Blanca)	M	3
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Bahía Blanca)	H	1
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Pipinas)	M	5
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Pipinas)	H	5
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Punta indio)	M	1
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Magdalena)	M	19
<i>Ch. vellerosus</i>	Buenos Aires (Magdalena)	H	21
			55

Especie	Localidad	Sexo	Nº de individuos
<i>Z. pichiy</i>	Río Negro (Catriel)	M	2
<i>Z. pichiy</i>	Río Negro (Catriel)	H	6
<i>Z. pichiy</i>	Santa Cruz (Puerto Deseado)	M	1
<i>Z. pichiy</i>	Santa Cruz (Puerto Deseado)	H	1
<i>Z. pichiy</i>	Santa Cruz (Portezuelo)	H	1
<i>Z. pichiy</i>	Chubut (Puerto Madryn)	H	1
<i>Z. pichiy</i>	San Luis	M	1
<i>Z. pichiy</i>	San Luis	H	1
			14

Especie	Localidad	Sexo	Nº de individuos
<i>E. sexcinctus</i>	Córdoba	M	1
<i>E. sexcinctus</i>	Córdoba	H	1
<i>E. sexcinctus</i>	Buenos Aires (Temaiken)	M	1
<i>E. sexcinctus</i>	Buenos Aires (Temaiken)	H	2
<i>E. sexcinctus</i>	Salta	M	1
<i>E. sexcinctus</i>	Corrientes	M	1
			7