

Tesis Doctoral

# Citogenética y biología de la reproducción en Myrmecophagidae (Xenarthra) de Argentina

Rossi, Luis Francisco

2013-02-22

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rossi, Luis Francisco. (2013-02-22). Citogenética y biología de la reproducción en Myrmecophagidae (Xenarthra) de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rossi, Luis Francisco. "Citogenética y biología de la reproducción en Myrmecophagidae (Xenarthra) de Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-02-22.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ecología Genética y Evolución

**“Citogenética y biología de la reproducción en Myrmecophagidae  
(Xenarthra) de Argentina”**

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

**Lic. Rossi Luis Francisco**

Director de tesis: Dra. Merani Maria Susana

Director: Dr. Greizerstein Eduardo

Consejero de Estudios: Dra. Poggio Lidia

Lugar de trabajo: Departamento de Ecología Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina 2012

## **Citogenética y biología de la reproducción en Myrmecophagidae (Xenarthra) de Argentina**

La familia Myrmecophagidae, constituida por cuatro especies, son mamíferos xenartros con distribución endémica del Neotrópico. Al pertenecer esta familia a un grupo basal en placentados, es de particular interés para el establecimiento de las relaciones filogenéticas en mamíferos. Como constituyente de nuestra fauna autóctona su biología requiere ser cuidadosamente analizada. Se caracterizó citogenética-molecularmente a 39 ejemplares (20 machos y 19 hembras) de *Myrmecophaga tridactyla* ( $2n=60$  y  $NF=110-12$ ) y 29 ejemplares (17 machos y 12 hembras) de *Tamandua tetradactyla* ( $2n=54$  y  $NF=108$ ). Se establecieron dos poblaciones cariológicas para *M. tridactyla* y una para *T. Tetradactyla* en su distribución Argentina. El par 1 al igual que otros pares cromosómicos, como los sexuales, resultaron estar compartidos en la familia. Se describió también la morfología de los tractos reproductivos en machos y hembras. El tracto reproductor femenino, reveló características arcaicas (seno-urogenital) presentes en otras especies de Xenarthra. Los machos de *Tamandua tetradactyla* presentaron inhibición testicular, en relación con una variación en el tamaño del tracto reproductor y se caracterizó morfométricamente el espermatozoide. También se determinó el ciclo hormonal en hembras de ambas especies resultando poliéstricas anuales.

**Palabras clave:** Xenarthra; Myrmecophagidae; Evolución Cromosómica; Biología Reproductiva; Morfología Espermática; Ciclo Estral.

## **Cytogenetics and reproductive biology in Myrmecophagidae (Xenarthra) from Argentina**

The four species of the Myrmecophagidae family are Xenarthra mammals with endemic distribution in the Neotropics. The basal status of this family, in the placental mammals, makes them important for establishing phylogenetic relationships in mammals. Being part of our native fauna makes it necessary for us to carefully analyze and reformulate again their biology. 39 specimens (20 males and 19 females) of *Myrmecophaga tridactyla* ( $2n = 60$  and  $NF = 110-12$ ) and 29 individuals (17 males and 12 females) of *Tamandua tetradactyla* ( $2n = 54$  and  $NF 108$ ) were characterized cytogenetic and molecularly. Two karyological populations of *M. tridactyla* and one of *T. Tetradactyla* were established for their Argentine distribution. The pair 1, as other pairs like the sex chromosomes, was found to be shared in the family. The morphology of the reproductive tracts and hormone cycle in females of both species, which were determined as annual polyestrous, were described. The female reproductive tract showed archaic features (urogenital sinus) present in other species of Xenarthra. The males of *Tamandua Tetradactyla* showed testicular inhibition, correlated to a size variation of the reproductive tract and the spermatozoon was morphometrically characterized.

**Keywords:** Xenarthra; Myrmecophagidae; Chromosome Evolution; Reproductive Biology; Sperm Morphology; Estrous cycle.

## 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 el 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 PICT 38013/1198 , la mayor parte de la tarea de campo de esta tesis. Y el sueldo de mis dos primeros años de Beca.
- A la Dra. Maria Susana Merani, mi Directora de tesis, por sus consejos profesionales, por sus enseñanzas diarias de valores, respeto e incentivo diario hacia la carrera.
- Al Dr. Eduardo Greizerstein, Director de tesis, por su disposición, enseñanzas y confianza.
- Al Prof. Dr. A.J. Solari, por ser fuente de consulta e inspiración permanente
- Al Dr. Luaces JP, por ser parte de estos intensos primeros años compartidos de carrera.
- Al Prof. Dr. Hernán Aladana Marcos, por su entusiasmo e incentivo hacia el saber
- Al Prof. Dr. Pablo Cética por sus enseñanza y compromiso.
- A la Prof. Dra. M.D. Mudry por su compromiso y apoyo.
- A los CHICOS del Lab: Ezequiel, Viviana, Carolina, Eric, Fernando. Por su disposición, respeto y colaboración
- A la Dra. Roberta B. Sciurano por siempre brindar su apoyo.

- A la Prof. Dra. María Ines Pigozzi por sus enseñanzas.
- A la Dra. E. Steinberg por su colaboración siempre
- Al Dr. J. Correa por sus narraciones y momentos de anécdotas del Lab.
- A la Dra. I. Larripa
- Al Dr. A. Abba
- Al Dr. Affanni
- A La Dra. Casannave
- A los jurados que evaluarán mi trabajo de tesis doctoral, que con sus aportes y sugerencias ayudarán a enriquecer la misma.
- A la Lic. Cristina Deparci
- A todas las personas que forman parte del estudio de los Xenarthra por enriquecer el conocimiento de esta fauna tan particular.
  
- A Laura, por estar a mi lado, por su apoyo, por su paciencia y por ser mi cable a tierra.
- A mi Familia por el apoyo incondicional
- A mis amigos
- Y a todas las personas que siempre apoyaron este camino



# INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....   | 12 |
| 1.1. Los Xenarthra .....                                      | 12 |
| 1.1.1. El superorden Xenarthra .....                          | 12 |
| 1.1.2. De los edentados a los Xenarthra .....                 | 15 |
| 1.1.3. Biología de Xenarthra.....                             | 20 |
| 1.1.3.1. Las vértebras xenarthras.....                        | 20 |
| 1.1.3.2. Temperatura corporal y metabolismo .....             | 20 |
| 1.1.3.3. Estado de conservación .....                         | 21 |
| 1.1.3.4. Enfermedades y parásitos.....                        | 21 |
| 1.2. Los Vermilinguas .....                                   | 23 |
| 1.2.1. Familia Myrmecophagidae.....                           | 23 |
| 1.2.1.1. <i>Myrmecophga tridactyla</i> (Oso hormiguero) ..... | 24 |
| 1.2.1.2. <i>Tamandua tetradactyla</i> (Oso Melero) .....      | 28 |
| 1.2.1.3. <i>Tamandua mexicana</i> .....                       | 32 |
| 1.2.1.4. <i>Cyclopes didactylus</i> (hormiguero pigmeo).....  | 32 |
| 1.3. Citogenética .....                                       | 33 |
| 1.3.1. Rearreglos cromosómicos y especiación .....            | 33 |
| 1.3.2. Citogenética en Xenarthra .....                        | 36 |
| 1.3.2 Citogenética en Myrmecophagidae .....                   | 37 |
| 1.4. Reproducción .....                                       | 38 |
| 1.4.1. Morfología.....  | 38 |
| 1.4.2. Ciclo reproductivo .....                               | 39 |
| 2. Objetivos e hipótesis de trabajo .....                     | 42 |
| 2.1. Objetivos generales.....                                 | 42 |
| 2.2. Objetivos particulares .....                             | 42 |



|   |    |
|---|----|
| 2.3. Hipótesis de trabajo .....   | 43 |
| 3. Materiales y Métodos .....   | 45 |
| 3.1. Citogenética .....   | 45 |
| 3.1.1. Línea Somática .....   | 45 |
| 3.1.1.1. Extracción de sangre .....   | 45 |
| 3.1.1.2. Cultivo de sangre.....   | 46 |
| 3.1.1.3. Sacrificio del cultivo.....  | 47 |
| 3.1.1.4. Preparación de los extendidos .....  | 48 |
| 3.1.1.5. Observación y selección de las metafases .....                                 | 48 |
| 3.1.1.6. Bandas G .....   | 48 |
| 3.1.1.7. Técnicas de Bando C.....   | 49 |
| 3.1.1.8. Técnica para la detección y ubicación del NOR.....                             | 49 |
| 3.1.1.9. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de campo claro         | 50 |
| 3.1.1.10. Medidas y confección del ideograma.....                                       | 50 |
| 3.1.2. Línea germinal .....   | 51 |
| 3.1.2.1. Microextendidos de complejos sinaptonémicos (C/S) .....                        | 52 |
| 3.1.2.2. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de fluorescencia ..... | 53 |
| 3.2. Biología Reproductiva .....  | 53 |
| 3.2.1. Estudios de morfología del tracto reproductor.....                               | 53 |
| 3.3.2. Estudio del ciclo reproductivo en hembras.....                                   | 54 |
| 4. Resultados.....  | 58 |
| 4.1. Citogenética .....   | 58 |
| 4.1.1. <i>Myrmecophaga tridactyla</i> (Oso hormiguero).....                             | 58 |
| 4.1.2. <i>Tamandua tetradactyla</i> (Oso Melero) .....                                  | 67 |
| 4.1.3. Homeologías cromosómicas entra ambas especies .....                              | 72 |
| 4.2. Reproducción .....   | 76 |
| 4.2.1. Hembras .....  | 76 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.1.1. Ovarios .....   | 76  |
| 4.2.1.2. Oviductos .....   | 78  |
| 4.2.1.3. Útero .....   | 80  |
| 4.2.1.4. Parte inferior del tracto genital.....  | 81  |
| 4.2.2. Machos.....   | 84  |
| 4.2.2.1. Tracto Genital.....   | 84  |
| 4.2.2.1 Histología testicular y estructura fina de la espermatogénesis .....             | 89  |
| 4.2.2.2. Morfología espermática.....   | 90  |
| 4.2.2.3. Variaciones morfológicas del tracto genital entre los individuos.....           | 92  |
| 4.3. Hormonas Sexuales.....  | 94  |
| 4.3.1. <i>Myrmecophaga tridactyla</i> .....  | 94  |
| 4.3.2. <i>Tamandua tetradactyla</i> .....  | 95  |
| 5. Discusión .....   | 98  |
| 5.1 Citogenética .....   | 98  |
| 5.1.1 <i>Myrmecophaga tridactyla</i> .....   | 98  |
| 5.1.2. <i>Tamandua Tetradactyla</i> .....  | 102 |
| 5.1.3 Homeologías Cromosómicas entre <i>M. tridactyla</i> y <i>T. tetradactyla</i> ..... | 106 |
| 5.2 Reproducción .....   | 108 |
| 5.2.1. Tracto reproductor de Hembras .....   | 108 |
| 5.2.2. Tracto reproductor de Machos.....   | 109 |
| 5.2.1. Ciclo Hormonal de Hembras .....   | 113 |
| 6. Conclusiones .....  | 115 |
| 7. Bibliografía .....  | 117 |
| 8. Anexos.....   | 140 |
| 8.1. Soluciones: .....   | 140 |
| 8.1.1. Medios de Cultivo: .....  | 140 |
| 8.1.2. Colchicina: .....   | 140 |

|   |     |
|---|-----|
| 8.1.3. Suero: .....   | 140 |
| 8.1.4. Antibióticos: .....  | 141 |
| 8.1.5. Solución Hipotónica: .....   | 141 |
| 8.1.6. Fijador: .....   | 141 |
| 8.1.7. Bandas G con tripsina: .....   | 141 |
| 8.1.8. Bandas C:.....   | 142 |
| 8.1.9. Tinción de NOR (nucleolar organizing regions) (Howel and Black, 1980)..... | 143 |
| 8.1.10. Microextendido de complejo sinaptonémico .....                            | 144 |
| 8.1.11. Inmunodetección: .....  | 145 |
| 8.2. Procedencia de los animales.....   | 146 |

# **Introducción**

# 1. Introducción

## 1.1. Los Xenarthra

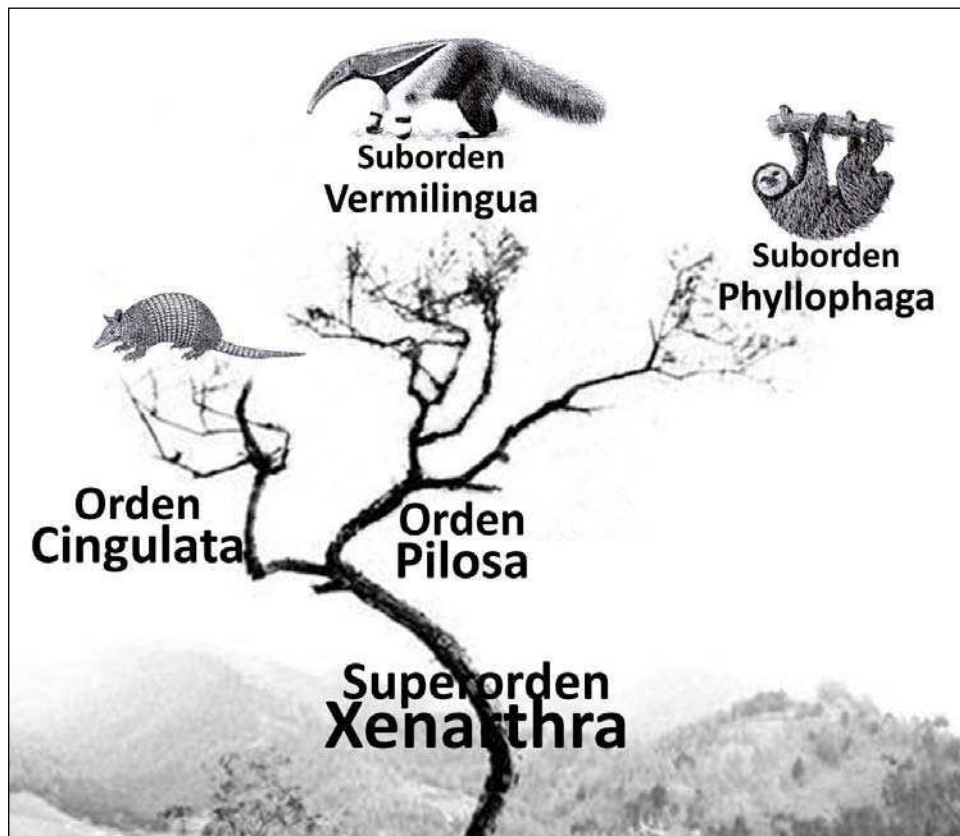
### 1.1.1. El superorden Xenarthra

Los Xenarthra son uno de los grupos de mamíferos más peculiares y característicos de la Región Neotropical. Su evolución seguramente estuvo ligada a la historia geológica de Sudamérica y han sido considerados representantes del stock inicial de mamíferos en dicho continente (Patterson y Pascual 1972). Sus formas actuales están representados por los armadillos, los osos hormigueros y los perezosos. Xenarthra junto con Euarchontoglires, Laurasiatheria y Afrotheria, es considerado uno de los cuatro principales clados supraordinales de Eutheria.

A pesar del modesto número de 31 especies vivas (Gardner 2008), este grupo probablemente originario de Gondwana fue muy conspicuo en América del Sur desde principios del terciario, Ca. 65 Ma, hasta finales del Cenozoico, con más de 200 géneros descritos extinguidos. Durante este tiempo América del Sur fue esencialmente una masa de tierra aislada, lo que permitió el desarrollo de variadas formas de Xenarthra que ocuparon distintos nichos ecológicos resultando muy diversos en este período de "espléndido aislamiento" (Simpson 1980). Una disminución importante en su diversidad tuvo lugar durante la extinción masiva, al final del Pleistoceno, hace unos 10.000 años (Delsuc et al. 2004) Entre los numerosos fósiles de Xenarthra, algunos de proporciones gigantes juegan un papel importante en la historia de la biología, como el perezoso gigante *Megatherium americanum* descrito por Cuvier en 1798 y los ejemplares recolectados por Darwin entre 1832 y 1833 durante su visita a

América del Sur en su famoso viaje a bordo del Beagle HSM.

El superorden Xenarthra, en la actualidad se encuentra representado por 31 especies divididas en dos órdenes: **Cingulata** con los armadillos (familia Dasypodidae) y **Pilosa** que posee a su vez dos subórdenes: *Phyllophaga* representado por los perezosos (familias Bradypodidae y Megalonychidae) y *Vermilingua* por los mirmecófagos\* (familias Myrmecophagidae y Cyclopedidae) (Anderson y Handley 2001; Gaudin 2004) (Figura 1).



**Figura 1:** Relaciones en Xenarthra.

\* Con el fin de hacer más fácil la lectura de esta tesis, usamos el término “mirmecófagos” para integrar los osos hormigueros, osos meleros y hormigueros pigmeos.

Cingulata está representado por las 21 especies de armadillos en solo la familia Dasypodidae, la más especiosa entre Xenarthra (Gardner 2008). Esta familia reúne algunos taxones ampliamente distribuidos, como el armadillo de 9 bandas *Dasypus novemcinctus* y especies endémicas que se encuentran entre los mamíferos más raros conocidos, como los pichiciegos *Calyptophractus retusus* y *Chlamyphorus truncatus* (Svartman 2012).

Pilosa se divide en 2 subórdenes. El primero de ellos, Vermilingua, reúne a los “osos”, con 2 familias existentes: la familia Cyclopedidae monoespecífica, representado por el hormiguero pigmeo u oso hormiguero sedoso *Ciclopes didactylus*, y Myrmecophagidae que reúne al oso hormiguero gigante *Myrmecophaga tridactyla* y en la actualidad dos especies reconocidas del género *Tamandua*: *T. mexicana* (con tres subespecies) y *T. tetradactyla* (con 4 subespecies) (Gardner 2008).

El segundo suborden de Pilosa, reúne las familias Bradypodidae, con 4 especies de perezosos de 3 dedos del género *Bradypus*: *Bradypus tridactylus*, *Bradypus torquatus*, *Bradypus variegatus* y *Bradypus pygmaeus*; y Megalonychidae con dos especies de perezosos de dos dedos, *Choloepus hoffmanni* y *C. didactylus*. *Bradypus variegatus* puede tener hasta siete subespecies y *C. hoffmanni* hasta 5, además se encuentran descritas 2 poblaciones separadas que son probablemente distintas subespecies (Aguiar y Fonseca 2008; Gardner 2008). El perezoso de collar *B. torquatus*, endémico de una franja costera de Bosque Atlántico en el sureste de Brasil, está categorizado como vulnerable (UICN 2011), y se ha sugerido a base de datos morfológicos y moleculares que se asigne a un género diferente, *Scaeopus torquatus* (Wetzel y Ávila-Pires 1980; Barros et al. 2003; Gardner 2008; Moraes-Barros et al. 2011).

### 1.1.2. De los edentados a los Xenarthra

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

Cuando Linneaus (1758) sistematizó los mamíferos en ocho órdenes; los mirmecófagos y los perezosos se encontraban junto a los elefantes y los pangolines en el Orden Bruta. Los armadillos, en cambio, en conjunto con los cerdos hormigueros, comadrejas y algunos insectívoros, en el orden Bestiae. Edentati fue utilizado como orden por primera vez por Vicq D' Azyr, en 1792; pero en realidad el primero en utilizar el término Edentata como orden fue Cuvier en 1798.

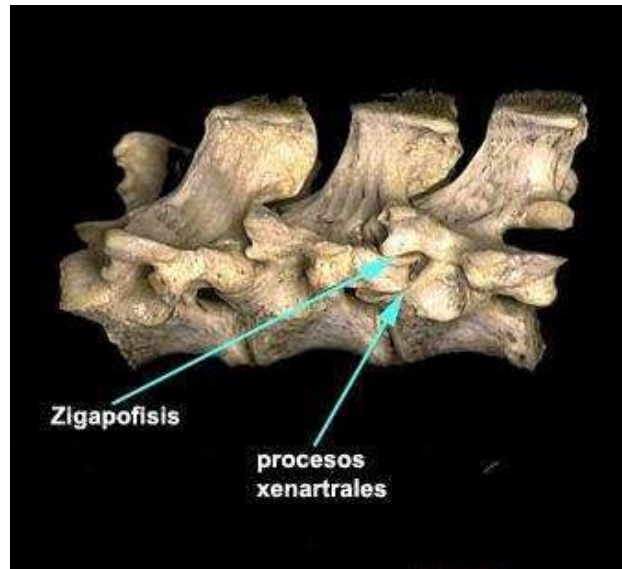
Los xenartros sudamericanos poseen una curiosa combinación de caracteres que determinaron que, desde épocas remotas se los considerase mamíferos anómalos de posición relativamente independiente dentro del conjunto de la clase Mammalia, incluidos dentro de una subclase particular compartida con taxones presuntamente emparentados, como los pangolines y los oricterópidos. Ameghino (1908) sostuvo que los desdentados, como los pangolines juntamente con los monotremas y los cetáceos formaban un grupo particular, los "Homalodonta", originando, según él directamente de una cepa reptiliana a través de un grupo hipotético de los "Archaecopelta"; también Parker (1886) sugirió que estuvieron conectados por su origen con los monotremas. Básicamente, se reconoce que el grupo posee una serie de características de orden anatómico y fisiológico interpretadas como muy primitivas para los mamíferos euterios, al punto que se los ha considerado como una cohorte aparte: los Paratheria (Thomas



1887; Carlini y Scillato Yané 1996). Pero por su anatomía y fisiología reproductiva, los edentados son verdaderos placentarios comprendidos dentro de los Eutheria.

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. Simpson (1945) divide el orden Edentata en dos subórdenes: Palaenodonta y Xenarthra, designando dos infraórdenes para Xenarthra: Pilosa (cubiertos de pelos) y Cingulata (con caparazón).

En 1985, Glass propone que todos los edentados vivientes y fósiles están caracterizados por una vértebra xenarthra, las que le dieron al orden el nombre de Xenarthra (Cope 1889) por sus típicas apófisis accesorias (xenarthrales) en las vertebrae lumbares, a veces también en las dorsales (Gaudin y Biewener 1992) (Figura 2). Esto determina la presencia de una, dos o tres pares de facetas articulares suplementarias en las caras anteriores y posteriores de las respectivas vertebrae (Gaudin y Biewener 1992). Consecuentemente, dada la homogeneidad taxonómica, la restricción zoogeográfica, el hábitat esencialmente neotropical y la disponibilidad de este nombre en función de una única característica esquelética, se propuso la utilización de Xenarthra como nombre ordinal (Glass 1985).



**Figura 2:** Apófisis accesorias xenartrales que dan origen al nombre Xenarthra.

Los mamíferos del superorden Xenarthra retuvieron un número de caracteres primitivos presentando su propias apomorfías, (McKenna 1975). Es por esto que, el grupo combinó numerosas especializaciones inusuales y bizarras, exhibiendo un amplio espectro de morfologías y ecologías. Entre ellas un gran número de modificaciones inusuales del esqueleto, que incluyen la fusión de las apófisis transversas de las vértebras caudales con el Isquion, la presencia de una espina escapular secundaria, la presencia de osificaciones dérmicas y la reducción o simplificación de la dentición (Engelman 1985).

A pesar de la diversidad de formas de vida, existe gran evidencia que los Xenarthra son un grupo monofilético. De Jong et al. (1985), estudiando aminoácidos de la proteína cristalina del cristalino, propusieron un origen monofilético para los perezosos y los osos hormigueros asignándole también una posición basal al orden dentro de Eutheria. Por otra parte 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. Este origen monofilético fue

profundizado *a posteriori* con la inclusión de nuevos caracteres (Gaudin 1995; 1999; 2004; Gaudin et al. 1996; McDonald 2003 a, b; Rose et al. 2005).

Ya en el año 2001 Murphy et al., secuenciando 18 genes de 64 especies, ampliaron el estudio filogenético molecular y lograron definir 4 grandes clados para los Eutheria: Afrotheria, Euarchontoglires, Laurasiatheria y Xenarthra. La discusión sobre cuál es el grupo basal de los mamíferos placentarios todavía permanece sin resolverse; siendo Afrotheria, Xenarthra, o ambos formando un clado hermano a Eutheria denominado Paratheria. Con el advenimiento de los estudios de filogenia molecular, se sumaron nuevas evidencias a las anteriores, sosteniendo la existencia de un ancestro común para el grupo, y una posición basal para Xenarthra dentro de los mamíferos euterios (De Jong et al. 1985; Sarich 1985; Madsen et al. 2001; Murphy et al. 2001). Sin embargo, aún existen muchos interrogantes en torno al origen y evolución de los principales linajes del grupo. Esta incógnita se extiende tanto a sus centros de dispersión, como a cuál o cuáles fueron los linajes basales o ancestrales (Carlini y Scillato Yané 2004). Particularmente, estas cuestiones resultan importantes para determinar el origen y comprender la evolución de las formas vivientes.

La monofilia de Xenarthra, y de cada uno de sus 5 reconocidas familias actuales está bien apoyado por estudios moleculares (Murphy et al. 2001 a, b; Delsuc et al. 2001; 2002; 2011; Barros et al. 2003; Möller-Krull et al. 2007). Estimaciones, de los datos moleculares, sugieren que el grupo se originó alrededor de 105 millones de años (Delsuc et al. 2004; Springer et al. 2004; Delsuc y Douzery 2008) y su radiación se llevó a cabo probablemente durante la transición Cretácico/Terciario. El grupo más basal de Xenarthra, los armadillos, divergían en torno a 70 millones de años, seguida por la división entre los osos hormigueros y los perezosos alrededor de 60 millones de años. La división entre los dos linajes de osos hormigueros se estimó en 40 millones de

años, y los de los 2 géneros vivientes de perezosos, que se asignan a familias separadas, en torno a 20 millones de años. Se atribuyó un papel importante a los cambios paleoambientales en la diversificación de Xenarthra (Delsuc et al. 2004; Delsuc y Douzery 2008; 2009). En el 2004, Delsuc et al. indicaron además, que los órdenes Xenarthra y Afrotheria podrían tener un antecesor común al final del Cretácico, cuando África, América del Sur, Antártida y Australia estaban conectadas en 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.

El fósil más antiguo registrado de Xenarthra está representado por escudos de armadillo del Paleoceno tardío de Brasil y data de aproximadamente 58 millones de años (Bergqvist et al. 2004), lo que deja un intervalo de casi 50 millones de años entre el origen estimado de Xenarthra basado en datos moleculares y su aparición en el registro fósil. Esto coincide con la observación de que Xenarthra representa un enigma paleontológico y biogeográfico que sólo será resuelto ante el hallazgo de mayores y más antiguos fósiles (Delsuc y Douzery 2008).

En la actualidad, el orden es considerado en sí mismo uno de los cuatro grandes clados de mamíferos placentarios. Sin embargo, su origen y relaciones con los restantes Eutheria siguen siendo objeto de un debate aún no resuelto tanto desde un punto de vista anatómico y paleontológico (Rose y Emry 1993; Carlini y Scillato Yané 1996; Gaudin 1998, 2004) como también desde otro evolutivo y molecular (Murphy et al. 2001; Kriegs et al. 2006; Nikolaev et al. 2007).

### **1.1.3. Biología de Xenarthra**

#### **1.1.3.1. Las vértebras xenartras**

Las vértebras son estructuras óseas que junto con el cráneo forman el esqueleto axial, característica sinapomórfica del subfilo Vertebrata, en el cual los xenartros así como otros mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces están incluidos. El carácter más conspicuo que agrupa a los Xenarthra es la presencia de articulaciones extras en las vértebras (articulaciones xenartrales intervertebrales) (Figura 2), de ahí el nombre Xenarthra (xenos= extraño, y arthros= articulación) (Glass 1985; Engelmann 1985; Patterson et al. 1992; Gaudin 1999). Estas articulaciones confieren resistencia y mayor flexibilidad al esqueleto axial, que junto a las extremidades anteriores fuertes y robustas que terminan en garras, facilitan tareas de gran desgaste del esqueleto como es la excavación en armadillos, desgarrar termiteros en los osos hormigueros y rotación del cuerpo de hasta 180° en los perezosos arborícolas (Mendel 1985).

#### **1.1.3.2. Temperatura corporal y metabolismo**

Los xenartros tienen un metabolismo basal bajo, alta conductividad térmica y una temperatura corporal que varía entre 34,1 °C y 35,5 °C, (Roig 1971; McNab 1985). Estos niveles pueden estar asociados a los hábitos fosoriales (armadillos) y arborícolas (perezosos y algunos osos); o al consumo de alimentos de bajo potencial calórico, como hojas, hormigas y termitas (McNab 1985). Es conocido que la dieta presenta bajo contenido de calorías debido a que esta constituida por componentes indigeribles (armadillos y osos), y en algunos casos contiene componentes letales que requieren un

metabolismo de bajo rango para asegurar niveles adecuados de detoxificación química (perezosos y posiblemente hormigueros) (Montgomery 1985 a, b). Este bajo metabolismo es importante en su rol con el establecimiento de largos períodos gestacionales, intenso cuidado materno con la descendencia, y un reducido número de crías por camada en general (Montgomery 1985a).

De todas las especies de xenartros vivientes, los mirmecófagos y perezosos se encuentran limitados a regiones tropicales de América (Nowak 1999), mientras que los armadillos se encuentran representados también en ambientes de climas rigurosos como los del sur de América del Sur y centro-sur de América del Norte (Nowak 1999).

#### **1.1.3.3. Estado de conservación**

Dada la degradación del hábitat debido al desmonte en Sudamérica, muchas especies de mamíferos encuentran comprometida su supervivencia. No hacen excepción a esto los Xenarthra, algunos de cuyos principales representantes se encuentran amenazados, como el oso hormiguero (*Myrmecophaga tridactyla*, Miranda y Medri 2010), el quirquincho andino (*Chaetophractus nationi*) o el tatu carreta (*Priodontes maximus*, Superina y Abba 2010). En la actualidad la gran mayoría de los Xenarthra son cazados como recurso alimenticio, atropellados por vehículos o perseguidos para ser usados como mascotas, por lo que en muchas regiones de América del Sur sus poblaciones corren riesgo de extinciones locales (Abba et al. 2007; Abba et al. 2008; Abba y Superina 2010).

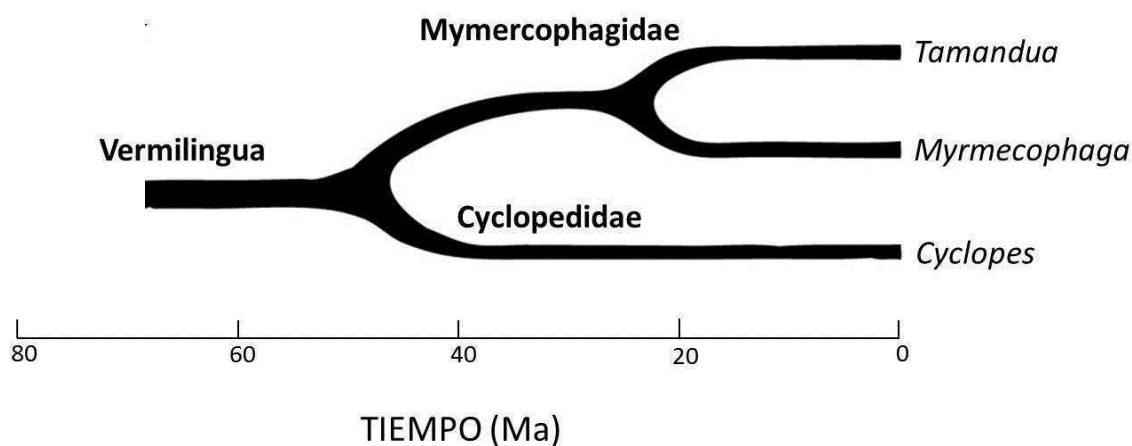
#### **1.1.3.4. Enfermedades y parásitos**

Los xenartros son susceptibles a numerosas enfermedades, por lo que se han convertido en interesantes modelos experimentales en la investigación biomédica, los armadillos del género *Dasypus*, aun hoy constituyen el único modelo experimental para el estudio de la infección causada por el bacilo de Hansen (*Mycobacterium leprae*), (McDonough 1997) y a su vez como otros animales de vida libre, son reservorios de algunas zoonosis.

Las especies del orden pilosa son hospedadores y/o reservorios naturales de algunos hongos patógenos dermatófitos, como por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis* (agente etiológico de la Paracoccidiomicosis o Blastomicosis sudamericana, micosis sistémica, que afecta principalmente los órganos linfáticos y los pulmones (Bagagli et al. 1998; Corredor et al. 2005)). También se han evidenciado bacterias transportadas por garrapatas parasitarias de estas especies como *Borrelia hemrsi* (Hubálek y Rudolf 2011) y se han reportado parásitos hemoflagelados en *Tamandua mexicana* como *Tripanosoma rangeli*, y en otras especies del genero *Tamandua*, *Tripanosoma legeri* y *Tripanosoma myrmecophagae* en *Myrmecophaga tridactyla* (Vallejo et al. 2003). Por último, y no menos importante, algunas especies han sido detectadas como reservorios de virus. Se destacan los *Bunyavirus* como el virus *Oropouche* que causa una enfermedad febril en humanos con picos epidémicos reconocidos cada vez más frecuentemente en la Amazonia, especialmente brasilera. En Vermilinguas han sido detectados varios *Togavirus* como el virus de la encefalitis Venezolana, *Mayaro virus*, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis de *San Louis*, virus de *Ilehus*. También se han detectado *Phlebovirus*: virus *Anhanga*, virus *Itaporanga* y virus *Punta Toro*; y de la clase Orbivirus el virus *Changuinola*. Además se ha encontrado el virus *Bradypus-4* aun no clasificada su procedencia (Seymour 1985).

## 1.2. Los Vermilinguas

El suborden Vermilingua está constituido por dos familias, Myrmecophagidae, y Cyclopedidae. La primera representada con dos géneros, el género *Myrmecophaga* con una sola especie, *M. tridactyla* (oso hormiguero), y el género *Tamandua* constituido por dos especies, *Tamandua tetradactyla* (oso melero) y *Tamandua mexicana* (oso melero). A la familia Cyclopedidae pertenece el género *Cyclopes*, con una única especie, *Cyclopes didactylus* (oso hormiguero de dos dedos, hormiguero pigmeo o serafín de platanar) (Wilson y Reeder 2005) (Figura 3).



**Figura 3:** Suborden Vermilingua con las dos familias y los tres géneros que lo representan. Antigua filogenia realizada en base al tipo de albúmina, modificada de Sarich y Cronin (1976).

### 1.2.1. Familia Myrmecophagidae

Los myrmecophagidos únicos miembros del superorden realmente desprovistos de dientes, poseen un cráneo largo y tubular y una lengua larga y vermiforme que le



permiten alimentarse con facilidad de hormigas y termitas, las cuales constituyen su dieta casi exclusiva (Montgomery 1985; Redford 1985), poseen además un pelaje denso, orejas pequeñas y cola larga (Nowak 1999).

#### **1.2.1.1. *Myrmecophaga tridactyla* (Oso hormiguero)**

El oso hormiguero, *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus 1758), es por tamaño la especie más grande del orden Xenarthra, con una longitud de 1,20 m que se incrementa entre 60 a 90 cm con la cola y pesa entre 28 y 60 Kg (Wetzel 1985; Nowak 1999). Las patas delanteras son robustas y potentes con cinco dedos, incluyendo tres garras con forma de gancho, de ahí su nombre, por lo cual camina sobre los nudillos (Figura 4). Los miembros posteriores tienen cinco garras de menor tamaño lo que permite al animal apoyar su pie en forma completa, ya que son plantigrados. El pelaje es largo duro y grisáceo, salpicado de blanco y negro con una banda ancha que se extiende desde la garganta formando una punta triangular en el hombro bordeada finamente con blanco a lo largo de su longitud, las patas delanteras son en su mayoría de pelaje blanco mientras que las traseras negras (Nowak 1999; Medri et al. 2003).



**Figura 4:** Ejemplar de *M. tridactyla* (oso hormiguero). Foto gentileza Pérez Jimeno G.

En general es un animal solitario, excepto por la relación que mantienen las madres con sus crías, que es de aproximadamente un año (Shaw et al. 1985; 1987). En el noroeste Argentino, la época de reproducción abarca los meses entre septiembre y marzo, el largo de gestación es entre  $180 \pm 10$  días, con una camada constituida en general por una sola cría, con un peso al nacimiento de  $1,1 \pm 0,5$  Kg (Byrne 1962; Hardin 1976; Massoia 1980). Es una especie territorial con su *home-range* entre 9 y 25 km<sup>2</sup> (Neris et al. 2002). Parera et al. (2002) han sugerido para Argentina un *home range* entre 3 a 90 km<sup>2</sup>. Los territorios se pueden superponer pero los individuos mantienen su distancia el uno del otro en forma permanente (Parera et al. 2002).

## Distribución

El oso hormiguero habita desde Honduras, en Centroamérica, hasta la región del Gran Chaco en Bolivia, Paraguay y norte de Argentina (Miranda y Medri 2010) (Figura 5).

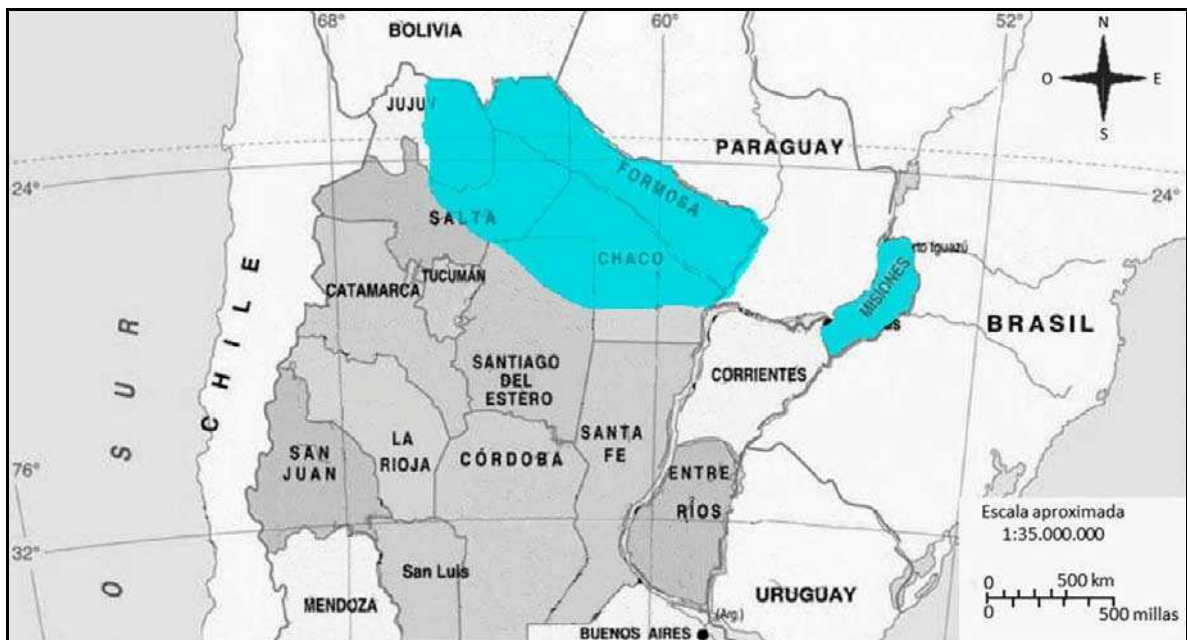
Los hábitats en donde se localizan son diversos, encontrándose en el bosque húmedo tropical, bosque seco, pastizales abiertos, sabana, y la región del Gran Chaco (Merritt 2008). Su hábitat más típico es el de los pastizales abiertos y sabanas arboladas tropicales y subtropicales, con abundancia de estructuras coloniales de insectos sociales denominados “tacurús”. También se halla en los bosques, pero es altamente dependiente de la presencia de colonias de insectos accesibles al nivel del suelo (Parera et al. 2002).



**Figura 5:** Distribución geográfica de *M. tridactyla*.

En Argentina (Figura 6), en el límite meridional de su distribución, se encuentra en las provincias de Misiones, Formosa, centro y norte de Chaco, este de Salta, este de Jujuy y norte de Santiago del Estero, marcando como límite más austral aproximadamente los 27°S, correspondiente al límite austral de la provincia de Misiones (Fonseca y Aguiar 2004).

En nuestro país su distribución ha ido disminuyendo con el correr de la última centuria (Chébez 1994). Antiguamente la distribución en Argentina de *M. tridactyla* abarcaba, además de las zonas actuales, parte de la provincia de Corrientes y norte de Santa Fe, donde en la actualidad se la considera extinto (Chébez 1994). Es importante destacar que en estos momentos en Corrientes, específicamente en los Esteros de Iberá, hay un proyecto de reintroducción de la especie, denominado “oso hormiguero gigante” (Jiménez Pérez 2006).



**Figura 6:** Distribución actual de *M. tridactyla* en Argentina (Fonseca y Aguiar 2004)

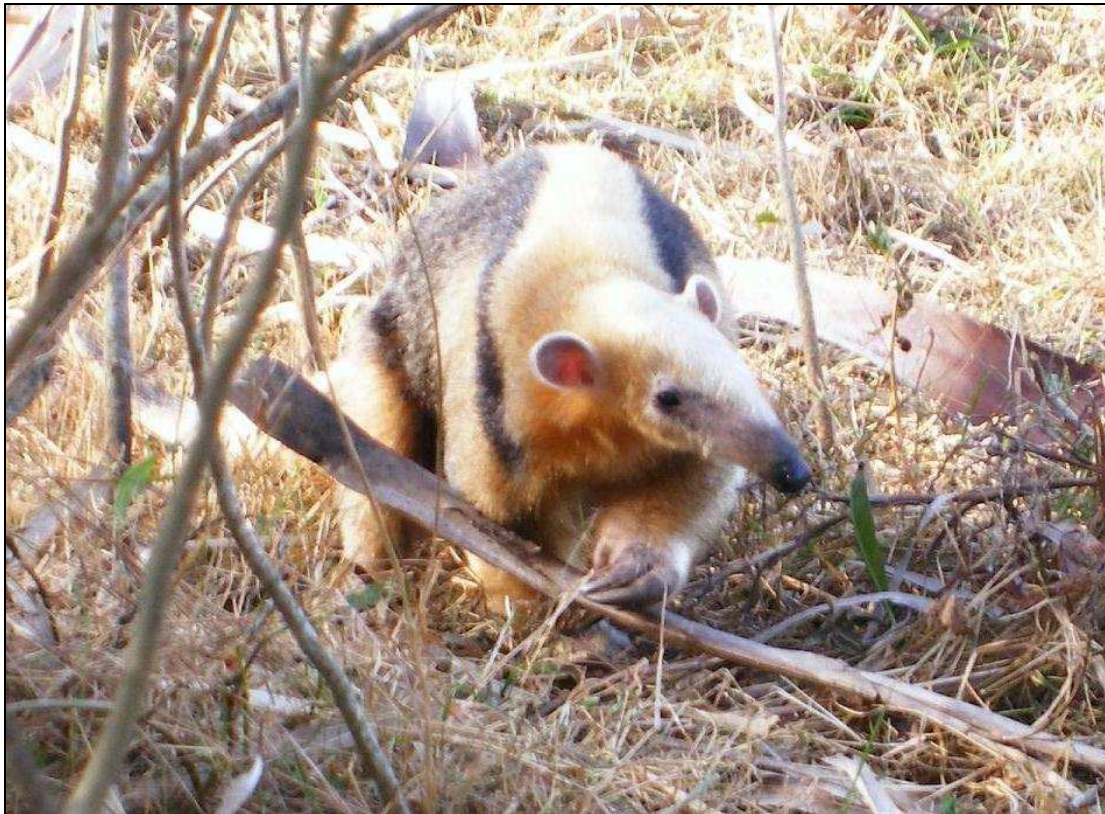
### **Estado de conservación de *M. tridactyla***

A nivel mundial según la IUCN *Red List of Threatened Species* su estado de conservación es “vulnerable” (Miranda y Medri 2010), y también está incluido en el Apéndice II de CITES -Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres-, categoría que incluye comercio internacional regulado (UNEP-WCMC 2007). En Argentina, su estado de conservación es menos auspicioso, una primera categorización producto del consenso de la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM), ubica a la especie como “Amenazada de extinción” (Reca et al. 1996), y actualmente se lo considera “En peligro” en el “Libro Rojo, Mamíferos Amenazados de la Argentina” (Díaz y Ojeda 2000; 2012). Se trata por lo tanto, de una especie prioritaria para desarrollar planes de conservación (Goin y Davis 1999); haciéndose así necesario poseer un sólido conocimiento biológico de esta especie.

#### **1.2.1.2. *Tamandua tetradactyla* (Oso Melero)**

El oso melero, *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus 1758), se caracteriza por exhibir una coloración dorada y negra, con este último color dispuesto en forma de "chaleco" (Nowak 1999; Eisenberg 1989) (Figura 7). Posee un tamaño que varía de 47cm a 77cm de longitud cabeza-cuerpo que se incrementa, por su cola prensil, entre 40,2 a 67,2 cm y un peso de entre 3,4 y 7 Kg (Eisenberg 1989; Nowak 1999). Esta especie presenta hábitos tanto diurnos como nocturnos con un *home range* de aproximadamente 3,75 km<sup>2</sup> (Wetzel 1985; Montgomery 1985; Nowak 1999). En la región de simpatria con individuos de *T. mexicana* exhiben un alto grado de variación en la conformación del “chaleco”.



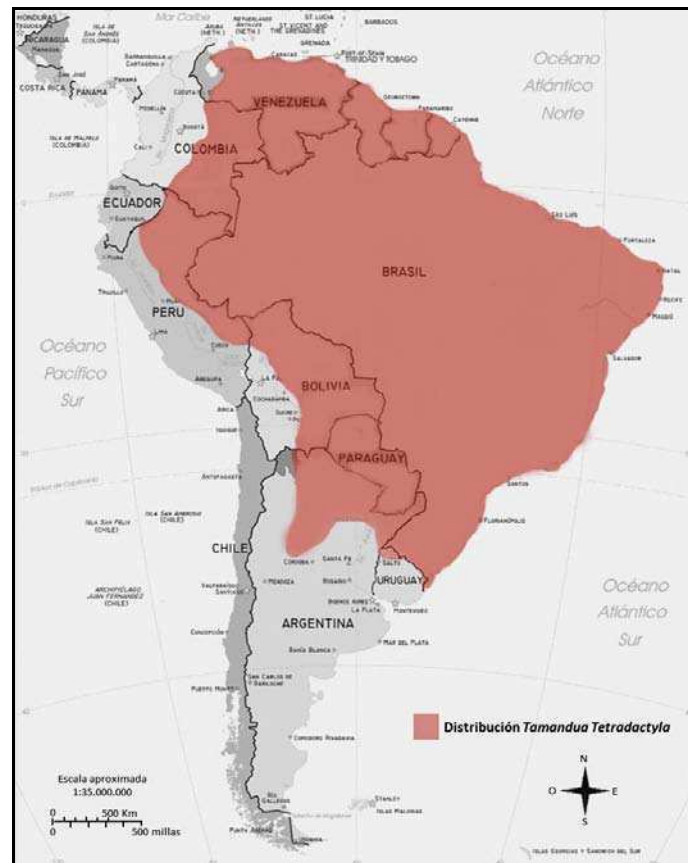


**Figura 7:** Ejemplar de *T. tetradactyla*. Foto gentileza Pérez Jimeno G.

Las hembras dan a luz una sola cría después de un período de gestación de 4 a 5 meses, aunque ocasionalmente se ha reportado la presencia de gemelos. El periodo de gestación es de alrededor de 160 días (Merritt 1975; Redford y Eisenberg 1992). Los juveniles son llevados sobre la espalda de la madre durante varios meses, e incluso hasta un año (Parera 2002), durante el cual las crías empiezan a comer la misma dieta que utiliza su madre e incluso pueden adoptar sus preferencias dietarias (Redford y Eisenberg 1992).

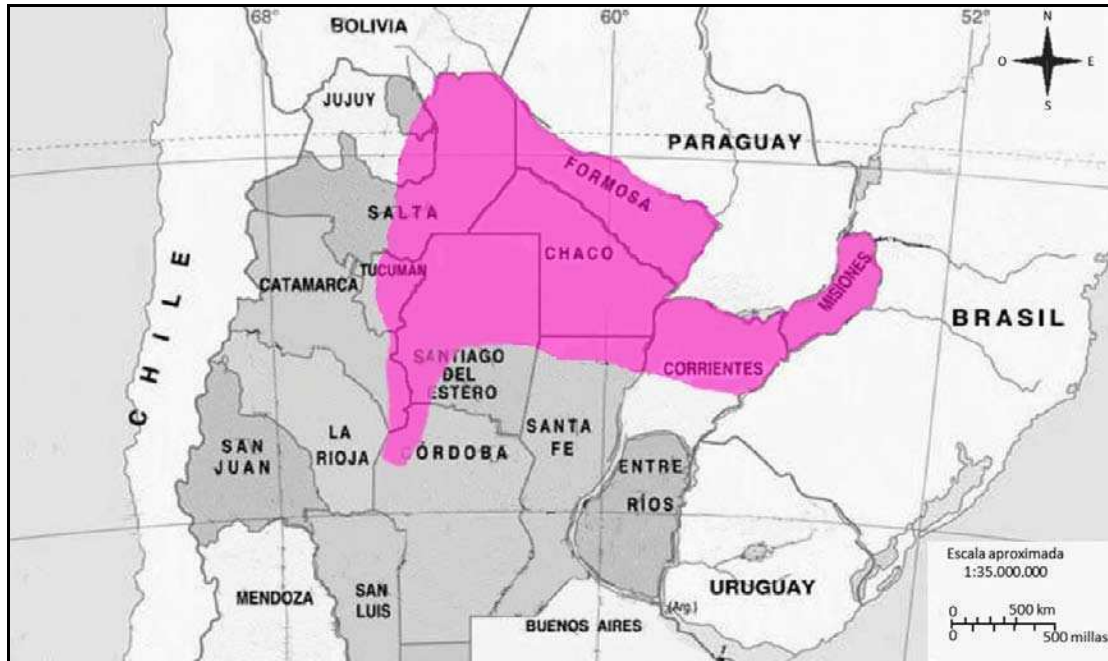
## Distribución geográfica

*Tamandua tetradactyla* se encuentra al este de los Andes de Colombia, Venezuela, la isla de Trinidad, y las Guayanas (Guyana Francesa, Guyana y Suriname), al sur su distribución llega hasta el norte de Uruguay y el norte de Argentina (Figura 8).



**Figura 8:** Distribución geográfica de *T. tetradactyla* (Miranda y Medri 2010).

La distribución señalada en la Argentina comprende las provincias de Corrientes, Chaco, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán y Catamarca (Juliá et al. 1994; Díaz y Bárquez 2002; Vizcaíno et al. 2006; Chébez 2009). En el 2009 Torres et al. proponen una ampliación del límite austral debido a registros en la Prov. de Córdoba, ampliando la distribución conocida de esta especie unos 280 km hacia el sur.



**Figura 9:** Distribución geográfica en Argentina de *T. tetradactyla* (Torres et al. 2009)

### Estado de Conservación

La pérdida de su hábitat, los incendios forestales y accidentes en carreteras representan una amenaza importante en algunas áreas de su distribución. En algunas partes es cazado por su carne, por perros domésticos, o indebidamente es utilizado como mascota (Aguiar y Fonseca 2008; Noss et al. 2008); además esta especie es confundida, y por lo tanto perseguida, con el “Pombero o Pomberito” personaje multifacético de la mitología guaraní.

...“durante sus andanzas nocturnas despierta a las mujeres con el suave y escalofriante roce de sus manos, especialmente a aquellas que en verano duermen al sereno. A veces las secuestra y las posee, y después de saciarse las deja ir, generalmente embarazadas, en cuyo caso el hijo nacerá muy parecido al Pombero”...



Actualmente se la considera “Potencialmente Vulnerable” en el “Libro Rojo, Mamíferos Amenazados de la Argentina” (Díaz y Ojeda 2012).

#### **1.2.1.3. *Tamandua mexicana***

*Tamandua mexicana* (Saussure 1860), se distribuye desde el sur de México hasta la región peruana de los cordillera de los Andes (Eisenberg 1989) siendo de menor tamaño en relación a *T. tetradactyla*, con un tamaño aproximado de 56 cm cabeza-cuerpo, 54 cm de cola, y su peso entre 3,2 a 5,4 Kg (Eisenberg 1989). El carácter distintivo entre las dos especies del género *Tamandua* es el número de forámenes infraorbitarios difícil de determinar en el animal vivo. Su biología es muy similar a la de su especie hermana de *T. tetradactyla*, anteriormente descripta.

#### **1.2.1.4. *Cyclopes didactylus* (hormiguero pigmeo)**

El hormiguero pigmeo, *Cyclopes didactylus* (Linnaeus 1758), es el más pequeño de los “osos hormigueros”, el tamaño del cuerpo es 15 a 17 cm, más 18-20 cm de cola, la cual tiene un extremo prénsil (Eisenberg 1989, Nowak 1999). Su pelaje es fino, debido a esta característica en inglés se lo denomina “silky anteater” (hormiguero sedoso), es de color marrón en el dorso y grisáceo en la región ventral. El hocico es pequeño en relación al tamaño del cuerpo (Eisenberg 1989; Nowak 1999). El pequeño tamaño y su cola prénsil favorecen mayormente una especialización de tipo de vida arbórea, con incursiones raras en el suelo (Eisenberg 1989). El área de distribución

geográfica se extiende desde el sur de México hasta la selva amazónica en Brasil, también se encuentra en zonas de la costa atlántica en fragmentos de bosque ubicados en algunos estados de la región Nordeste de Brasil (Bloch et al. 1976; Eisenberg 1989). Al igual que otras especies de la familia, *C. didactylus* presenta hábitos solitarios, excepto durante el período de apareamiento. Sus hábitos son nocturnos y permanecen en los árboles durante el día (Bloch et al. 1976; Eisenberg 1989; Nowak 1999).

### **1.3. Citogenética**

#### **1.3.1. Rearreglos cromosómicos y especiación**

Desde que Sutton (1902) y Boveri (1904) propusieron los cromosomas como 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 en el aislamiento reproductivo de las especies (White 1977; Karlin y Nevo 1986; King 1993). El estudio de los cromosomas permite definir especies ya que, cada una de éstas se encuentra determinada por un cariotipo especie específico (White 1973). Entre especies relacionadas, los cariotipos pueden diferenciarse sólo por rearrreglos cromosómicos (White 1973). Estas similitudes y diferencias pueden ser aclaradas mediante el análisis del origen de las características cromosómicas de cada especie (Jackson 1971). 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).

Los rearrreglos cromosómicos, involucran autosomas y cromosomas sexuales, pudiendo o no tener efecto visible en el fenotipo y pudiendo o no ser factor determinante para la nueva especie. Ciertos tipos de cambios cromosómicos únicos pueden promover la especiación en el momento dado en que interfieren con la fertilidad de los individuos (Redi y Capanna 1988). Los portadores del rearrreglo cromosómico al ser heterocigotos para la anomalía citogenética, no tendrían una meiosis normal y provocarían la formación de gametos anormales (Redi y Capanna 1988).

Con el fin de establecer implicancias evolutivas, las relaciones de los organismos, pueden ser redefinidas a partir de la información brindada por los cromosomas, comparando los cariotipos de especies relacionadas entre sí (Reig 1984). A su vez, la identificación precisa de los cromosomas o de los segmentos cromosómicos que participan en los reordenamientos, permite la diferenciación de las especies y variaciones especie-específicas.

Es importante distinguir los tipos de variaciones cromosómicas en una especie considerando los polimorfismos cromosómicos intrapoblacionales, producto de alteraciones o rearrreglos estructurales, que pueden existir en un estado “flotante” en las poblaciones (Bianchi et al. 1979). Los híbridos cariológicos intraespecíficos son producidos 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 resultantes heterocigotas para determinados rearrreglos (Bianchi et al. 1979).

La fijación de un rearrreglo cromosómico depende de las características y del tamaño de la población en la cual se origina el cambio cromosómico. Un cariotipo es adaptativo cuando la selección favorece la incorporación de esta nueva forma cromosómica (Bickham y Baker 1979). El mecanismo principal a través del rearrreglo

cromosómico involucrado en el proceso evolutivo en una especie es dependiente principalmente de la posibilidad de fijación de dicho rearrreglo.

Los datos cromosómicos han sido utilizados en distintos taxones 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. Así, la comparación de los patrones de bandas G entre los cariotipos de diferentes especies se puede utilizar para relacionar grupos hermanos entre los diferentes taxones (Bianchi et al. 1985). 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).

Los estudios citogenéticos en animales silvestres, especialmente aquellos en peligro de extinción, son herramientas valiosas para los ecologistas. Permite la identificación de rearrreglos genéticos tales como deleciones, translocaciones e inversiones, cuya fijación génica podrían ser atribuidos por ejemplo a la endogamia en poblaciones pequeñas. Si estos animales se mantuvieran en la mismo area y se los intentara reproducir, podría ponerse en peligro la descendencia. La gestión de la reproducción de los animales silvestres, por ejemplo en la conservación ex-situ, obliga a conocer el genotipo y el cariograma de los individuos a reproducir para que este patrimonio genético se conserve y la reproducción no se vea amenazada por la hibridación, falta de segregación u otros factores que parecían que pueden reducir la viabilidad de la población.

La citogenética tradicional y molecular ayuda a hacer posible esa caracterización genética respetando así la identidad de los cariotipos a reproducir.

### 1.3.2. Citogenética en Xenarthra

El primer estudio citogenético en Xenarthra fue realizado, en 1964 por Saez et al. quienes 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 de armadillos del género *Dasypus* (*D. hybridus* y *D. septemcinctus*), que involucraban pares metacéntricos medianos y acrocéntricos pequeños. En 1969, Benirschke et al. (en su libro “Comparative Mammalian Cytogenetics”) informó el cariotipo de otras 5 especies de armadillos *D. hybridus*, *D. novemcinctus* (ambos  $2n=64$ ), *Euphractus sexcinctus* ( $2n=58$ ), *Chaetophractus villosus* ( $2n=60$ ) y *Cabassous centralis* ( $2n=62$ ). También, en el mismo año, Corin-Frederic describieron, 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 del sexo de tipo X0 y no del tipo de XY como el resto de los mamíferos. Posteriormente fueron realizados varios trabajos donde se describieron cariotípicamente varias de las especies de armadillos: *Tolypeutes matacus* ( $2n=38$ ) y *Zaedyus pichiy* ( $2n=62$ ) (Meritt y Benirschke 1973); *E. sexcinctus* ( $2n=58$ ), *Ch. villosus* ( $2n=60$ ), *D. novemcinctus* ( $2n=62$ ), *D. hybridus* ( $2n=60$ ) y *Z. pichiy* ( $2n=62$ ) (Jorge et al. 1977); *Chlamyphorus truncatus* ( $2n = 58$ ) (Jorge et al. 1982); Barroso y Seunánez (1991) confirmaron los datos de Benirschke et al. (1969) y de Jorge et al. (1985a) en armadillos del género *Dasypus*, *Euphractus* y *Cabassous*. En 1985 Jorge et al. describieron especies de perezosos de la familia Bradipodidae y Jorge et al. (1985a) y Jorge (2000) analizaron el cariotipo del oso hormiguero sedoso, *Cyclopes didactylus* ( $2n = 64$ ).

De esta manera la constitución cariotípica de los Xenarthra presenta una variación en un rango de  $2n=38$  a un  $2n= 64$  cromosomas. De las 31 especies conocidas de

Xenarthra en sólo 19 se conocen el cariotipo, en 14 a nivel alfa y solamente en 5 a nivel gama (Benirschke et al. 1969; Jorge et al. 1977; Jorge 1982; Jorge et al.1985).

### 1.3.2 Citogenética en Myrmecophagidae

El cariotipo de *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* fue descrito originalmente, sin las figuras ni representaciones de los cromosomas, por Hsu (1965) en los cuadernos "Mammalian chromosome and somatic cell genetic". En el suborden Vermilingua los cariotipos varían entre un  $2n=54$  y un  $2n=64$  (Hsu 1965; Jorge et al. 1977; Dobigny et al. 2005; Pereira et al. 2004). Mecanismos de fusión-fisión y translocaciones recíprocas, fueron propuestas por Pereira et al. (2004) para explicar la variabilidad observada entre *M. tridactyla* y *T. tetradactyla*. Sin embargo, no se utilizaron técnicas de bandeos y/o figuras meióticas esenciales para este tipo de demostración. Debido a esto, aún no se han determinado las relaciones cromosómicas íter-específicas e intergenéricas entre ellos. En parte, esto puede ser debido a la complejidad citogenética de la Familia, pero fundamentalmente es por la vulnerabilidad de las especies y la imposibilidad de obtener muestras (Corin-Frederic 1969; Jorge 1981; Jorge et al.1985; Dobigny et al. 2005). Es importante destacar que no existen en la literatura trabajos de figuras meióticas que permitan identificar los cromosomas sexuales como tampoco las características de los cromosomas autosómicos para estas especies.

## 1.4. Reproducción

### 1.4.1. Morfología del tracto reproductor

El sistema reproductor en *Xenarthra* exhibe varias características peculiares. Los machos se caracterizan por presentar testículos internos (Kaudern 1914; Grassé 1955); variación del tamaño testicular e inhibición testicular estacional, demostrada en especies de armadillos (McCusker 1985; Torres et al. 1983; Luaces et al. 2012); además de distintivos espermatozoides en su forma y dimensiones (Cética et al. 1998). Asimismo, en hembras de armadillos se describieron folículos poliovulares, y en casi todas las especies un seno urogenital (Cética et al. 2005). Las hembras de armadillos del género *Dasybus* se caracterizan por presentar retraso de implantación (Fernández 1909), diapausa embrionaria (Talmage y Buchanan 1954; Storrs et al. 1989) y poliembriónia (Fernández 1909; Talmage y Buchanan 1954; Galbreath 1985; Loughry et al. 1998).

Aunque los primeros estudios anatómicos del sistema genital en *Myrmecophagidae* se llevaron a cabo hace unos 100 años (Kaudern 1914; Grassé 1955), los datos histológicos son todavía escasos. Algunos temas importantes, como los detalles histológicos de las glándulas anexas, gónadas y los conductos, siguen siendo desconocidos. Ningún trabajo se ha centrado en la morfología funcional de los órganos reproductores y no se sabe nada acerca de las funciones y el comportamiento de los tejidos eréctiles. Probablemente debido a los testículos internos, inusuales entre los mamíferos, no se conocen estudios sobre ellos y de la estructura fina de las células del epitelio seminífero, encontrándose sólo un trabajo con medidas pero sin ilustraciones de la morfología espermática (Hay et al., 1994) para *T. tetradactyla*.

Las diferencias morfológicas entre los espermatozoides son importantes ya que están muy vinculadas a la evolución de los sistemas reproductores. No obstante, la naturaleza del trayecto que los gametos masculinos deben recorrer, es determinante en la existencia 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 + 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. Asimismo, es de especial ayuda en zoológicos y lugares de reproducción asistida para la aplicación de protocolos de biotecnología reproductiva en programas relacionados a manejo y conservación de fauna silvestre.

#### **1.4.2. Ciclo reproductivo**

Los xenartros hasta ahora descritos, a diferencia de otros grupos de mamíferos placentarios, no poseen una vagina verdadera sino un senourogenital (Cética et al. 2005). La presencia de un seno urogenital imposibilita estudiar el ciclo reproductivo en estos animales, a través de la citología vaginal exfoliativa. Así, las determinaciones hormonales de esteroides en heces fueron un método apropiado para este tipo de estudios (Hay et al. 1994). El ciclo reproductivo fue descrito en especímenes en cautiverio de *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* a través de la determinación del perfil de hormonas sexuales y en estos se demostró que las hembras son poliéstricas con un ciclo de aproximadamente 45 días de duración en *T.*



*tetradactyla* (Hay et al. 1994; Kusuda et al. 2011) y aproximadamente 51 días en *M. tridactyla* (Patzl et al. 1998). En machos, Grassé (1955) describió variaciones en el tamaño del tracto reproductor que las atribuía a los períodos de celo.

## **Objetivos e hipótesis de trabajo**

## **2. Objetivos e hipótesis de trabajo**

### **2.1. Objetivos generales**

Determinar a través de la caracterización citogenética la correcta posición filogenética de las especies *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* pertenecientes a la distribución argentina de Myrmecophagidae en el árbol de los Xenarthra; y asignar a los individuos portadores de rearrreglos cromosómicos un rol (subfertilidad, infertilidad o normalidad). Profundizar en la morfometría y ubicación de los órganos reproductivos, de ambos sexos, permitiendo avanzar en el conocimiento de la biología reproductiva de estas especies.

### **2.2. Objetivos particulares**

#### I. Citogenética clásica y molecular en Myrmecophagidae:

a. Caracterizar, a través de la citogenética clásica y molecular, individuos pertenecientes a las especies *M. tridactyla* y *T. tetradactyla*; identificando si existiera, los distintos cariogramas (variaciones cariotípicas) para cada una de las especies.

b. Obtener los cromosomas compartidos por las dos especies de la Flia. Myrmecophagidae.

#### II. Biología Reproductiva:

a. Tracto reproductivo: estudiar el aparato reproductor en Myrmecophagidae mediante estudios anatómicos e histológicos (mediante microscopía óptica y electrónica).

b. Ciclo reproductivo en hembras: esclarecer mediante el estudio de los valores hormonales de esteroides en materia fecal, el ciclo reproductivo en hembras de Myrmecophagidae en Argentina.

### **2.3. Hipótesis de trabajo**

La especiación en Myrmecophagidae es prevalentemente cariotípica con mecanismos de inversiones, translocaciones robertsonianas, translocaciones recíprocas, y fusiones.

El superorden Xenarthra retuvo un gran número de caracteres primitivos y carece de nuevos rasgos presentes en los mamíferos placentarios. La identificación de caracteres citogenéticos y reproductivos en Myrmecophagidae permitirá esclarecer las relaciones intergenéricas entre las especies de esta familia y a su vez con otras especies del superorden Xenarthra.

# **Materiales y Métodos**

### **3. Materiales y Métodos**

Se estudiaron un total de 68 ejemplares de Myrmecophagidae: 39 correspondieron a la especie *M. tridactyla* (n=20 machos y n=19 hembras) y 29 a la especie *T. tetradactyla* (n =17 machos y n=12 hembras).

Se obtuvieron muestras de sangre periférica en 37 individuos de *M. tridactyla*, en condiciones de esterilidad. En un individuo macho de *M. tridactyla* muerto por causas naturales se trabajó también material testicular para el estudio de la meiosis. Además se obtuvo el tracto reproductor en formol al 10% de 2 individuos machos de *M. tridactyla* procedentes de la localidad de Gral. Pizarro de la Provincia de Salta.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica en 22 individuos de *T. tetradactyla*, en condiciones de esterilidad. En ejemplares adultos, 4 machos y 5 hembras, muertos por causas naturales o encontrados atropellados, se obtuvieron los tractos reproductores para el estudio de su morfología. La tabla VI-VII del anexo resume la información detallada de las especies estudiadas, número de ejemplares, sexo, procedencia.

#### **3.1. Citogenética**

##### **3.1.1. Línea Somática**

###### **3.1.1.4. Extracción de sangre**

Los animales fueron inmovilizados por sus respectivos cuidadores y anestesiados por profesionales veterinarios según los procedimientos habituales de cada institución. Las muestras fueron obtenidas de ejemplares alojados en diferentes Zoológicos, centros de crías y lugares de reinscripción de Fauna. La extracción de sangre periférica fue

realizada 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*, 1993). 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 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 de las localidades de proveniencia, el número dado al animal 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).

### **3.1.1.2. Cultivo de sangre**

La obtención de cromosomas de la línea somática se realizó a través del cultivo de linfocitos de sangre periférica, siguiendo la técnica de 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  $\text{mm}^3$ , 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  $6.10^5$  -  $1,2.10^6$  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- estreptomicina 10mg/mL), fitohemoaglutinina Sigma (400 $\mu$ g/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.

### **3.1.1.3. Sacrificio del cultivo**

El tiempo para el sacrificio del cultivo fue determinado evaluando a partir de 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 más tarde (72 hs de cultivo), de lo contrario se procedió al sacrificio a las 96 hs. Para el sacrificio, la muestra se trató con un antimetabólico para detener el ciclo celular en estado de metafase, colchicina Sigma (concentración final 1  $\mu$ g/mL de cultivo), y se continuó la incubación durante 2-3 horas a 34°C. Se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm, descartándose el sobrenadante. Al botón celular se le agregó, 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 otros 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 su



coloración. Por último, fueron realizadas cinco o más series de lavados con fijador fresco y frío.

#### **3.1.1.4. Preparación de los extendidos**

Una vez finalizados los lavados, se tomaron portaobjetos previamente seleccionados y tratados. 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 dejaron caer de 3 a 5 gotas de suspensión sobre el portaobjetos, logrando que ellas 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).

#### **3.1.1.5. 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.

#### **3.1.1.6. Bandas G**

Las bandas G fueron realizadas según el protocolo de Seabright (1971) modificado. Los preparados se incubaron 5 a 10 min. en PBS (buffer 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.

### **3.1.1.7. 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)<sub>2</sub> 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.

### **3.1.1.8. Técnica para la detección y ubicación del NOR**

Se utilizó la técnica de Howell y 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.

### 3.1.1.9. Captura y procesamiento de las imágenes con microscopio de campo claro

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

### 3.1.1.10. 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 taxones 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.

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

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

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

**LT** = largo total del complemento haploide

A base de 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:

| <b>Morfología</b>    | <b>IC</b>   |
|----------------------|-------------|
| 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 un programa de edición de imágenes Adobe Photoshop CS5.1, 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 a un gráfico donde el cero correspondió a la región centromérica.

### **3.1.2. Línea germinal**

Dada la dificultad de obtención de muestras de estas especies sólo se pudo obtener material testicular en condiciones óptimas de un individuo de la especie *M. tridactyla*.

### 3.1.2.1. Microextendidos de complejos sinaptonémicos (C/S)

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  $-70^{\circ}\text{C}$  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% (0.1% (v/v) Tween 20 en PBS 10%), realizando 3 lavados de 10 minutos cada uno, luego se procedió a la incubación con anticuerpos primarios a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24 hs. 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 (Inmunofluorescencia indirecta - IFI), que contiene auto-anticuerpos para proteínas del cinetocoro. 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- CREST) y el otro marcado con TRITC (emisión de fluorescencia roja- SMC3). 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  $0,2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 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.

### **3.1.2.2. 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 un programa de edición de imágenes Adobe Photoshop CS5.1.

## **3.2. Biología Reproductiva**

### **3.2.1. Estudios de morfología del tracto reproductor**

Para realizar la descripción morfológica, se obtuvieron los tractos reproductores completos de individuos machos y hembras de *T. tetradactyla*; y de machos y hembras de *M. tridactyla*. Bajo observación directa se realizó la disección anatómica e identificación macroscópica. Para la realización de los estudios histológicos, los tejidos fueron fijados en formol 10% y las diferentes regiones de interés fueron deshidratadas e incluidas en parafina para luego realizar secciones de 5  $\mu$ m. Los preparados histológicos fueron teñidos con las técnicas de rutina: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y PAS.

Para Microscopía electrónica de transmisión, en un macho de *T. tetradactyla*, se obtuvo una pequeña fracción del parénquima testicular que 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% OsO<sub>4</sub> Otras partes fueron incluidas en Maraglas. También se realizaron secciones de cortes semifinos de 0,5 mm 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 μm 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.

### **3.3.2. Estudio del ciclo reproductivo en hembras**

La condición reproductiva de hembras de ambas especies se evaluó midiendo la concentración de hormonas esteroideas (progesterona y estradiol) en materia fecal. Diferentes métodos para preservar las muestras de materia fecal fueron evaluados con el objetivo de encontrar el más adecuado para la adecuada estimación de los valores hormonales.

Muestras de heces frescas, obtenidas inmediatamente 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.

Los perfiles hormonales anuales de animales de cautiverio fueron estudiados en heces secas que se obtuvieron a partir de 2 hembras en cautiverio de *T. tetradactyla* y de 2 hembras *M. tridactyla*. Las muestras fueron recolectadas, dos veces por semana, después de observar la defecación. Las mismas fueron disecadas antes de ser guardadas a -20 °C.

#### *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) y se agitaron durante 10 min por tres veces. El sobrenadante de éter fue decantado en tubos de vidrio y evaporado a seco bajo N<sub>2</sub> atmosférico a temperatura ambiente. Los residuos se almacenaron a -70°C hasta que se realizaron las determinaciones por RIA. 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-<sup>3</sup>H]-progesterona y [2, 4, 6, 7-<sup>3</sup>H]-17β-estradiol fueron obtenidas de NEN-Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Migliore Laclustra 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 estándar. 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 estriol y 10 % estrona. La 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.

#### *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 recalcular la media y eliminar los valores bajo el mismo criterio, hasta que no se registraron valores por encima de la media más 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.

El grado de significación fue  $P < 0.05$ . Todos los cálculos fueron realizados usando el programa Statistix 9.0

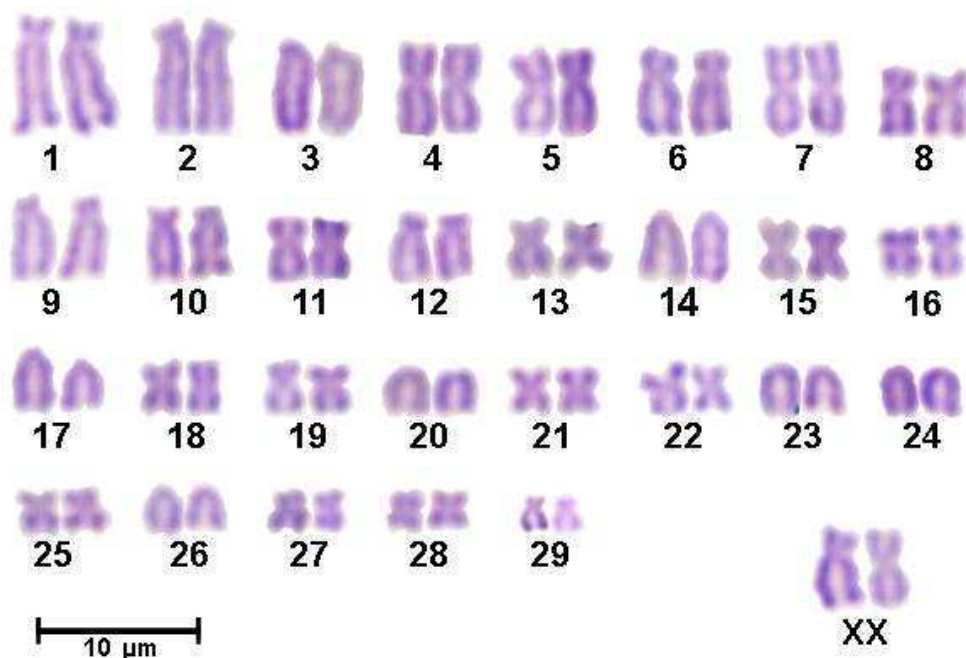
# **Resultados**

## 4. Resultados

### 4.1. Citogenética

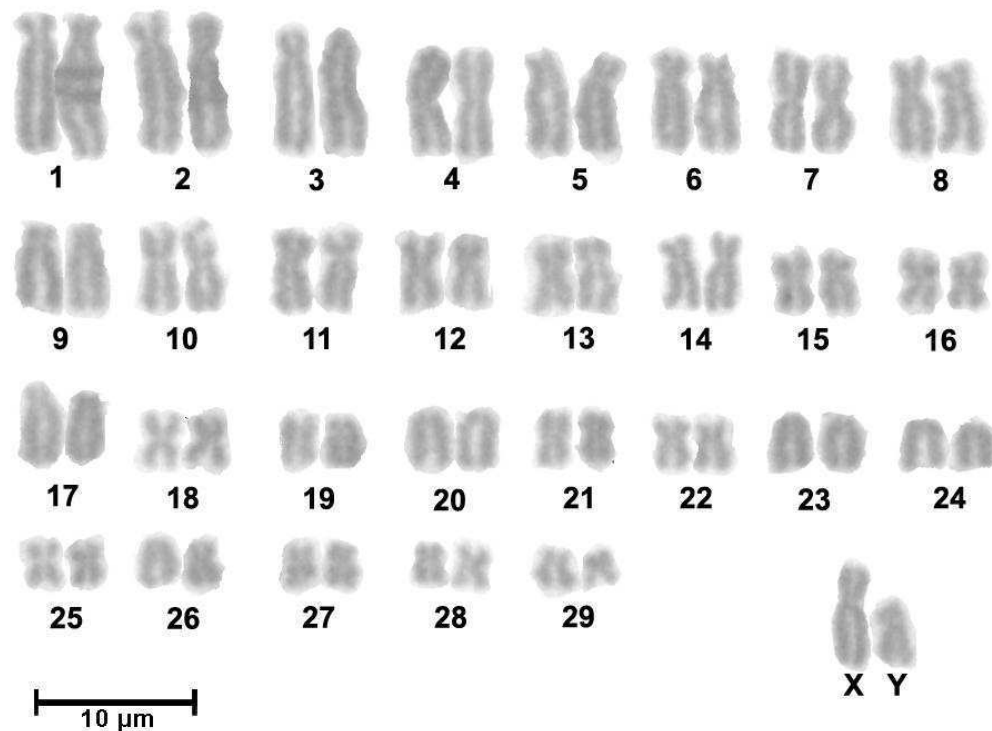
#### 4.1.1. *Myrmecophaga tridactyla* (Oso hormiguero)

En los ejemplares estudiados de la especie *M. tridactyla* (n=20 machos y n=19 hembras) se llevó a cabo la caracterización citogenética a nivel gamma a partir de tinción con carbol-Fucsina, Bandas G, Bandas C y NOR. El número diploide establecido fue de  $2n=60$  XX/XY. Veinticuatro pares estuvieron constituidos por elementos bibraquiados, de ellos 12 metacéntricos (4,7,13, 15, 16, 18, 19, 21, 22,23, 28 y 29), 12 submetacéntricos (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 25, 27) y los restantes 5 pares fueron acrocéntricos (incluyendo el par 14 que varió en su morfología entre los individuos analizados).



**Figura 10:** Cariotipo de un ejemplar hembra de *M. tridactyla* ( $2n=60$ , XX/XY; NF= 110). Prov. de Jujuy (Distribución I). Tinción carbol fucsina.

El número fundamental (NF) por lo tanto, resultó variable en los distintos individuos según la zona de distribución de la cual provenían. En los 13 individuos (5 individuos machos y 8 individuos hembra) de la distribución I correspondiente a las localidades de las provincia de Salta, Jujuy (TablaVI, Fig. 43 anexo) el par 14 fue acrocéntrico en condición de homocigosis simple (SH) con un NF=110 (Fig. 10). Y en los 26 individuos (14 individuos machos y 12 individuos hembra) estudiados procedentes de la distribución II correspondiente a ejmplares de las localidades de Santiago del Estero , Chaco etc (Tabla VI, Fig.43 anexo) donde el par cromosómico 14 evidenció un pequeño brazo siempre en los dos elementos del par condición de doble homocigosis (DH) consecuentemente con un NF=112, (Fig.11). En el par sexual, el cromosoma X resultó submetacéntrico mediano ( $4.67 \pm 0.29$ ) siendo el cromosoma Y ( $2.60 \pm 1,08$ ) submetacéntrico (Tabla II, Fig. 11).

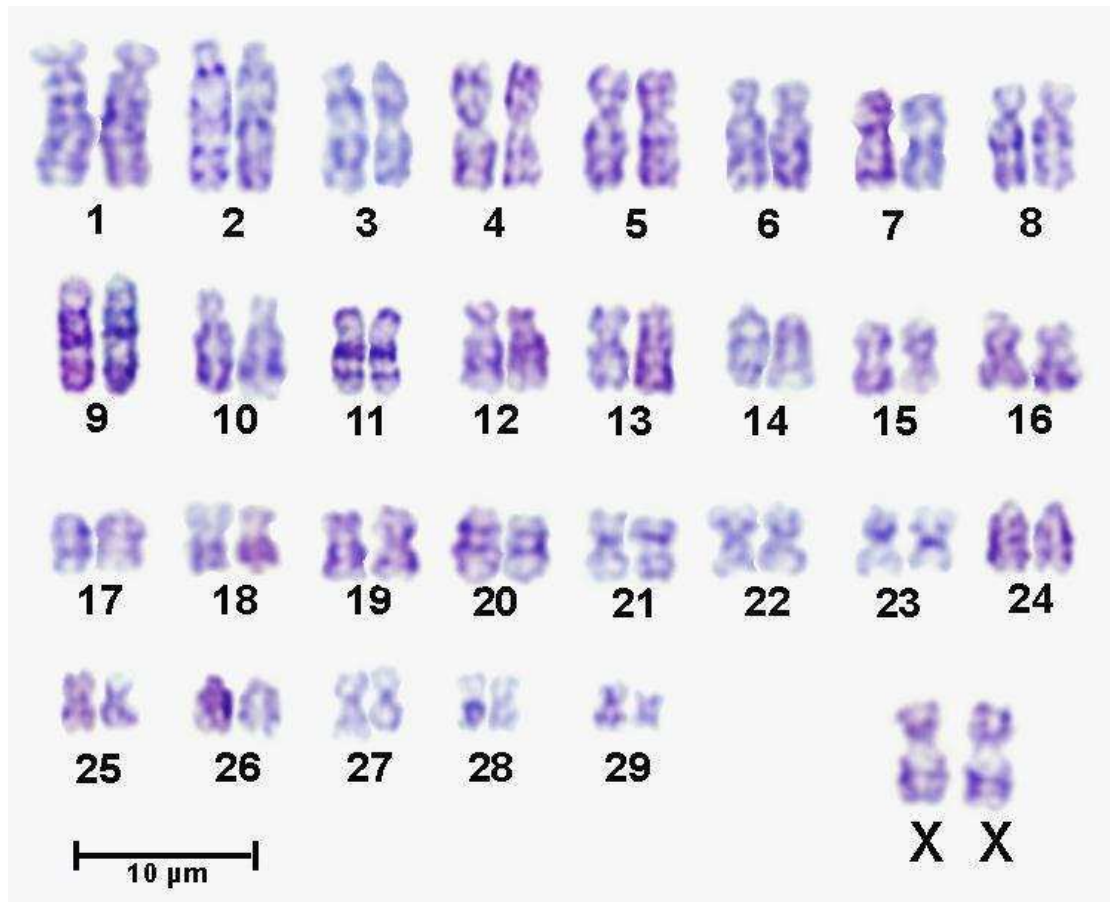


**Figura 11:** Cariotipo de un ejemplar hembra de *M. tridactyla* ( $2n=60$ , XX/XY; NF = 112) proveniente de la localidad de Monte Quemado, Prov. de Santiago del Estero (Distribución II). Tinción carbol fucsina.

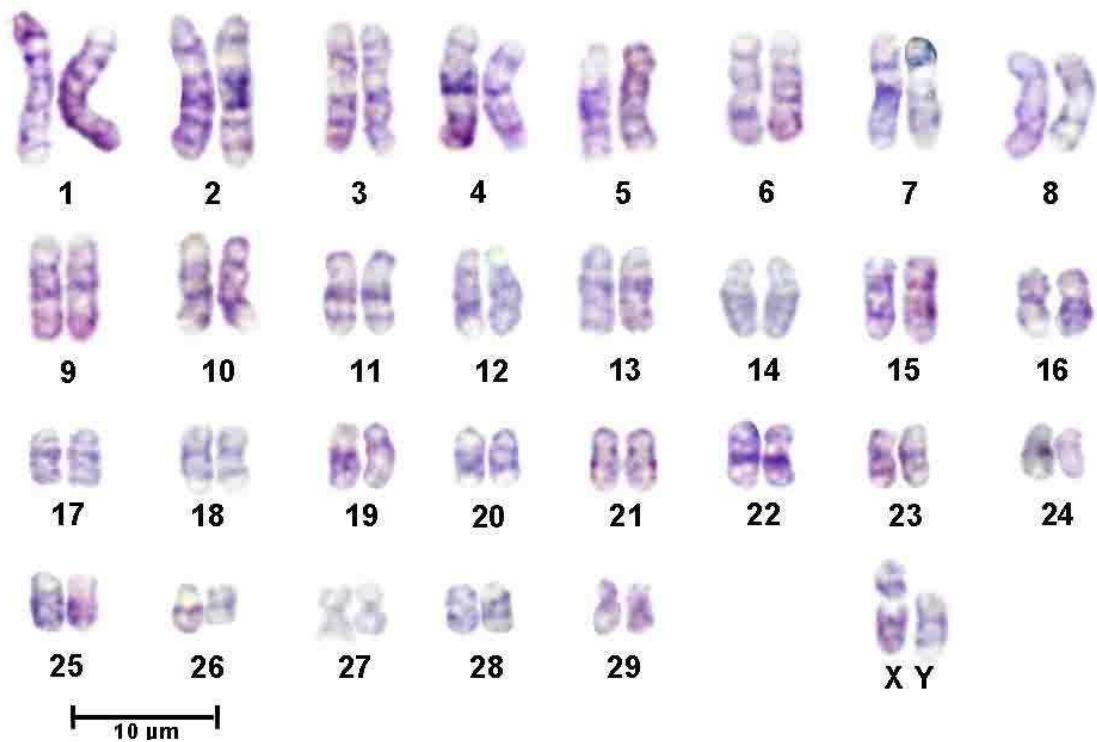
| <b>Nº</b> | <b>LT</b> | <b>p</b>      | <b>q</b>      | <b>RB</b> | <b>IC</b> |    |
|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|-----------|----|
| <b>1</b>  | 6,48      | 1,08 +/- 0,10 | 5,42 +/- 0,39 | 0,19      | 0,17      | SM |
| <b>2</b>  | 5,97      | 1,19 +/- 0,39 | 4,80 +/- 0,55 | 0,25      | 0,2       | SM |
| <b>3</b>  | 5,55      | 1,18 +/- 0,26 | 4,29 +/- 0,30 | 0,27      | 0,15      | SM |
| <b>4</b>  | 4,95      | 2,28 +/- 0,19 | 2,76 +/- 0,30 | 0,83      | 0,45      | M  |
| <b>5</b>  | 4,87      | 1,40 +/- 0,36 | 3,44 +/- 0,36 | 0,41      | 0,29      | SM |
| <b>6</b>  | 4,51      | 1,17 +/- 0,18 | 3,32 +/- 0,38 | 0,35      | 0,26      | SM |
| <b>7</b>  | 4,49      | 1,97 +/- 0,34 | 2,49 +/- 0,28 | 0,79      | 0,44      | M  |
| <b>8</b>  | 4,18      | 1,26 +/- 0,32 | 2,89 +/- 0,46 | 0,44      | 0,3       | SM |
| <b>9</b>  | 4,01      | 0,76 +/- 0,23 | 3,21 +/- 0,39 | 0,24      | 0,19      | SM |
| <b>10</b> | 3,66      | 1,14 +/- 0,33 | 2,47 +/- 0,32 | 0,46      | 0,32      | SM |
| <b>11</b> | 3,61      | 1,27 +/- 0,17 | 2,43 +/- 0,28 | 0,52      | 0,34      | SM |
| <b>12</b> | 3,6       | 0,61 +/- 0,34 | 2,95 +/- 0,38 | 0,21      | 0,17      | SM |
| <b>13</b> | 3,37      | 1,33 +/- 0,22 | 2,01 +/- 0,31 | 0,66      | 0,4       | M  |
| <b>14</b> | 3,15      | 0,57 +/- 0,24 | 2,56 +/- 0,38 | 0,22      | 0,18      | A  |
| <b>15</b> | 3,11      | 1,43 +/- 0,33 | 1,76 +/- 0,30 | 0,81      | 0,45      | M  |
| <b>16</b> | 2,93      | 1,25 +/- 0,12 | 1,63 +/- 0,15 | 0,77      | 0,43      | M  |
| <b>17</b> | 2,82      | -             | 2,82 +/- 0,21 | 0         | 0         | A  |
| <b>18</b> | 2,76      | 1,28 +/- 0,15 | 1,46 +/- 0,13 | 0,88      | 0,47      | M  |
| <b>19</b> | 2,68      | 1,24 +/- 0,12 | 1,42 +/- 0,12 | 0,87      | 0,47      | M  |
| <b>20</b> | 2,62      | -             | 2,62 +/- 0,12 | 0         | 0         | A  |
| <b>21</b> | 2,56      | 1,13 +/- 0,22 | 1,42 +/- 0,14 | 0,8       | 0,44      | M  |
| <b>22</b> | 2,46      | 1,14 +/- 0,16 | 1,29 +/- 0,12 | 0,88      | 0,47      | M  |
| <b>23</b> | 2,46      | 1,06 +/- 0,13 | 1,37 +/- 0,20 | 0,77      | 0,44      | M  |
| <b>24</b> | 2,46      | -             | 2,46 +/- 0,16 | 0         | 0         | A  |
| <b>25</b> | 2,41      | 0,90 +/- 0,17 | 1,47 +/- 0,29 | 0,61      | 0,38      | SM |
| <b>26</b> | 2,32      | -             | 2,32 +/- 0,19 | 0         | 0         | A  |
| <b>27</b> | 2,11      | 0,82 +/- 0,22 | 1,31 +/- 0,18 | 0,63      | 0,38      | SM |
| <b>28</b> | 2,1       | 0,94 +/- 0,20 | 1,12 +/- 0,17 | 0,84      | 0,46      | M  |
| <b>29</b> | 1,93      | 0,86 +/- 0,15 | 1,05 +/- 0,13 | 0,82      | 0,45      | M  |
| <b>X</b>  | 4,67      | 1,50 +/- 0,09 | 3,17 +/- 0,14 | 0,47      | 0,32      | SM |
| <b>Y</b>  | 2,6       | 0,89 +/- 0,36 | 2,67 +/- 0,97 | 0,33      | 0,34      | SM |

**Tabla II:** Proporción de los cromosomas de *M. tridactyla* respecto de largo total del complemento autosómico. LT=Largo total; p= brazo corto; q= Brazo largo; RB= Índice de brazos; IC= índice centromérico.

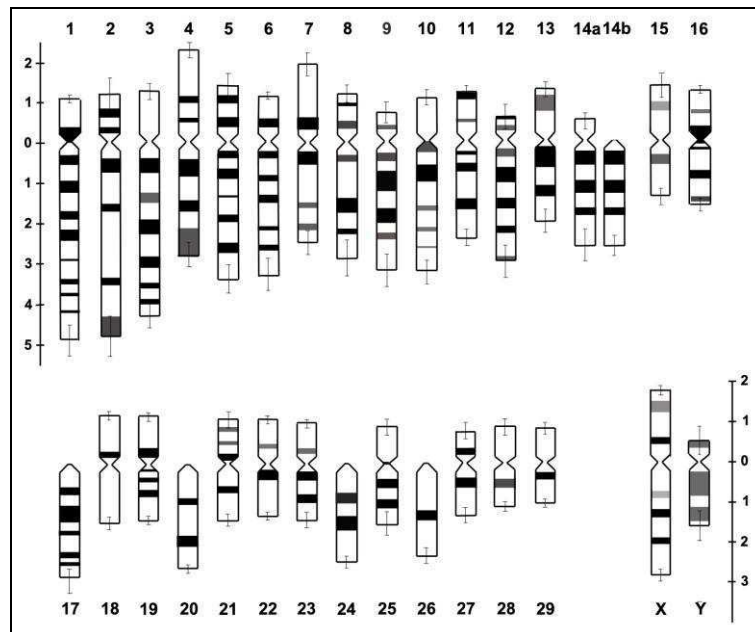
El patrón de bandas G (Fig. 12) permitió a individualizar cada par con su patrón de bandas característico y definido para él mismo y a su vez homologar sus elementos, individualizando también el patrón de bandas de los cromosomas sexuales X e Y (Fig. 12). Al caracterizar el par 14, permitió en el cariotipo de todos los individuos detectar la presencia o ausencia de un brazo que así en algunos resultó polimórfico para el mismo (Fig. 13). La longitud en relación al complemento total haploide de los cromosomas de *M. tridactyla* (Tabla 2) se ilustra en el ideograma de la figura 14 donde también se encuentra incorporado el ideograma del patrón de bandas G.



**Figura 12:** Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de un ejemplar hembra de *M. tridactyla* proveniente de la localidad de Santa Victoria, Prov. de Salta. Par 14 Acrocéntrico

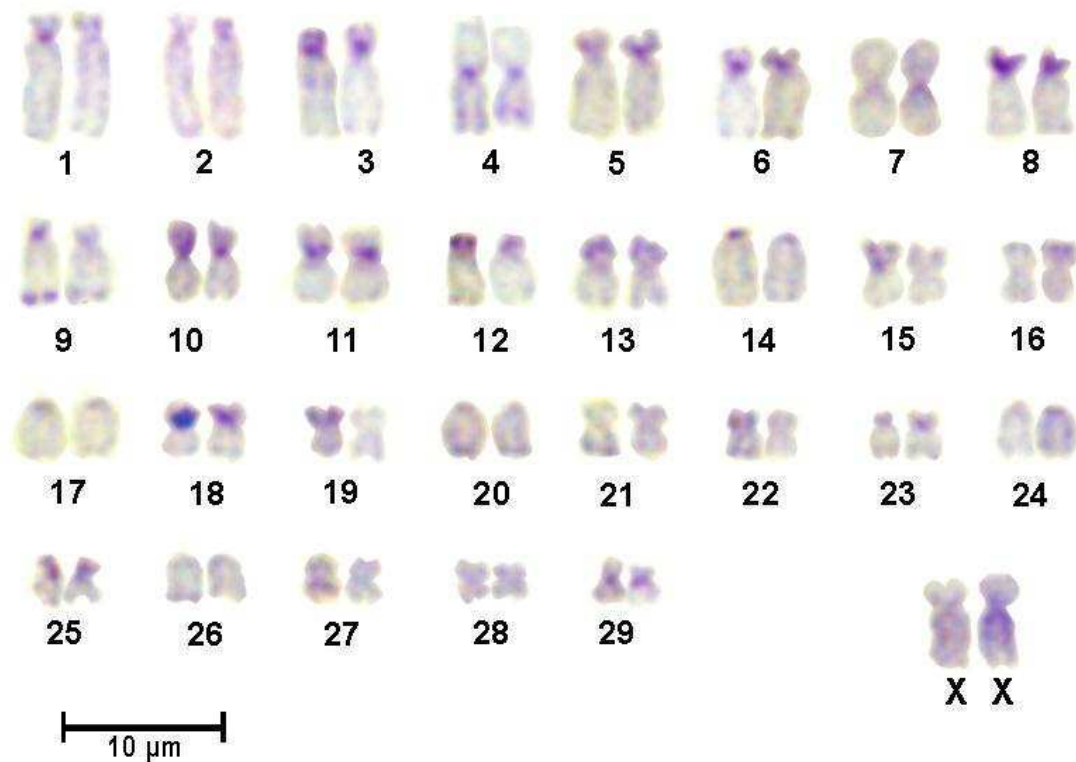


**Figura 13:** Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de un ejemplar macho de *M. tridactyla* proveniente de la localidad de Monte Quemado, Prov. de Santiago del Estero. Par 14 Submetacéntrico.



**Figura 14:** Ideograma representativo del cariotipo de *M. tridactyla* (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.

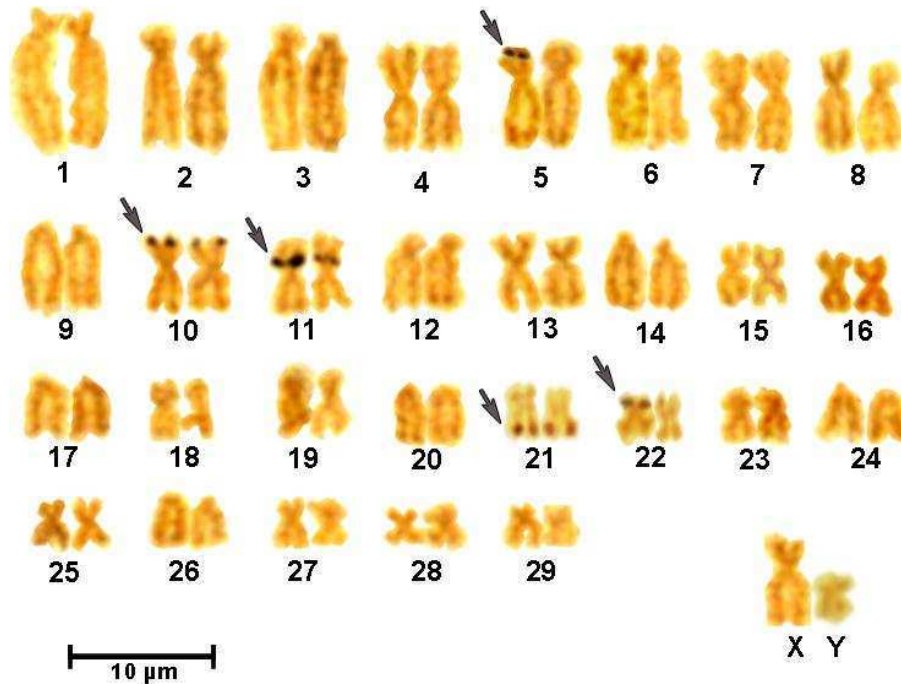
Las bandas C permitieron detectar zonas de heterocromatina repetitiva en las regiones pericentroméricas en los pares cromosómicos 1, 3, 4, 5, 6, 9, 15, 23, 29 (Fig. 15). Estas regiones de heterocromatina se hicieron extensivas al brazo “p” de los pares 8, 10, 13, 14, 18. Además, el par 9 y el 16 mostraron regiones de banda C, con heterocromatina repetitiva extensiva en las regiones teloméricas. En los pares 2, 7, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 26, 27 y 28 no se pudieron evidenciar bandas C con la metodología utilizada. El cromosoma X al igual que el cromosoma Y presentaron banda C centromérica pequeña.



**Figura 15:** Cariotipo mostrando el patrón de bandas C de un ejemplar macho de *M. tridactyla*, Prov. de Jujuy.



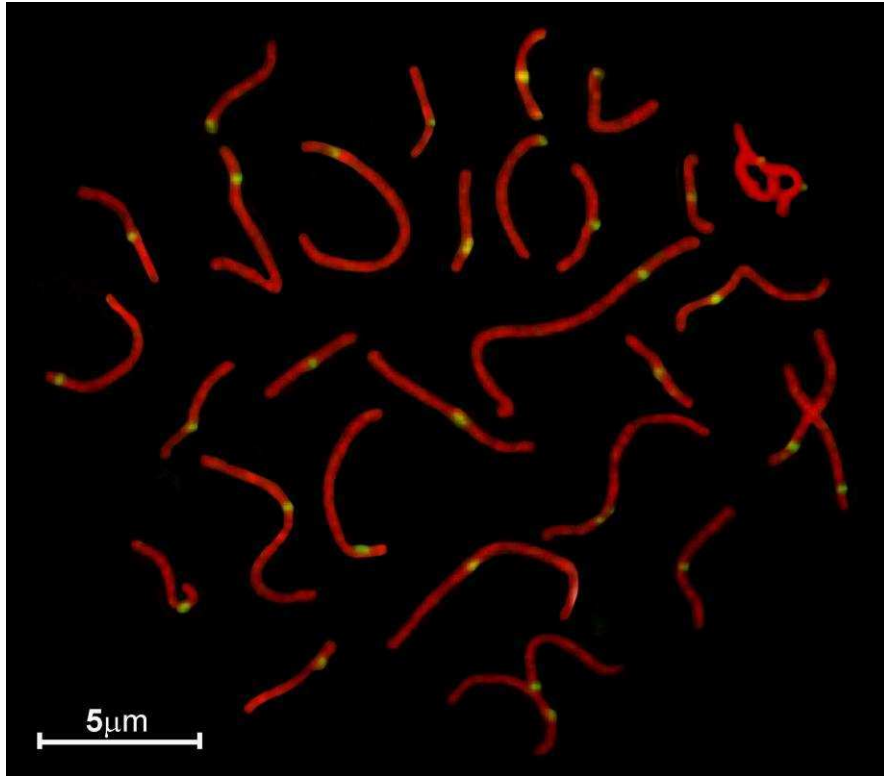
La técnica de tinción argéntica permitió la localización de los organizadores nucleolares en el brazo “p” de los pares: 5, 10, 11 y 22; y en el brazo “q” del cromosoma 21 del cariotipo mitótico (Fig. 16).



**Figura 16:** Cariotipo mostrando la localización de los organizadores nucleolares de un ejemplar macho de *M. tridactyla* de la localidad de Santa Victoria, Pcia. de Salta. Tinción argéntica.

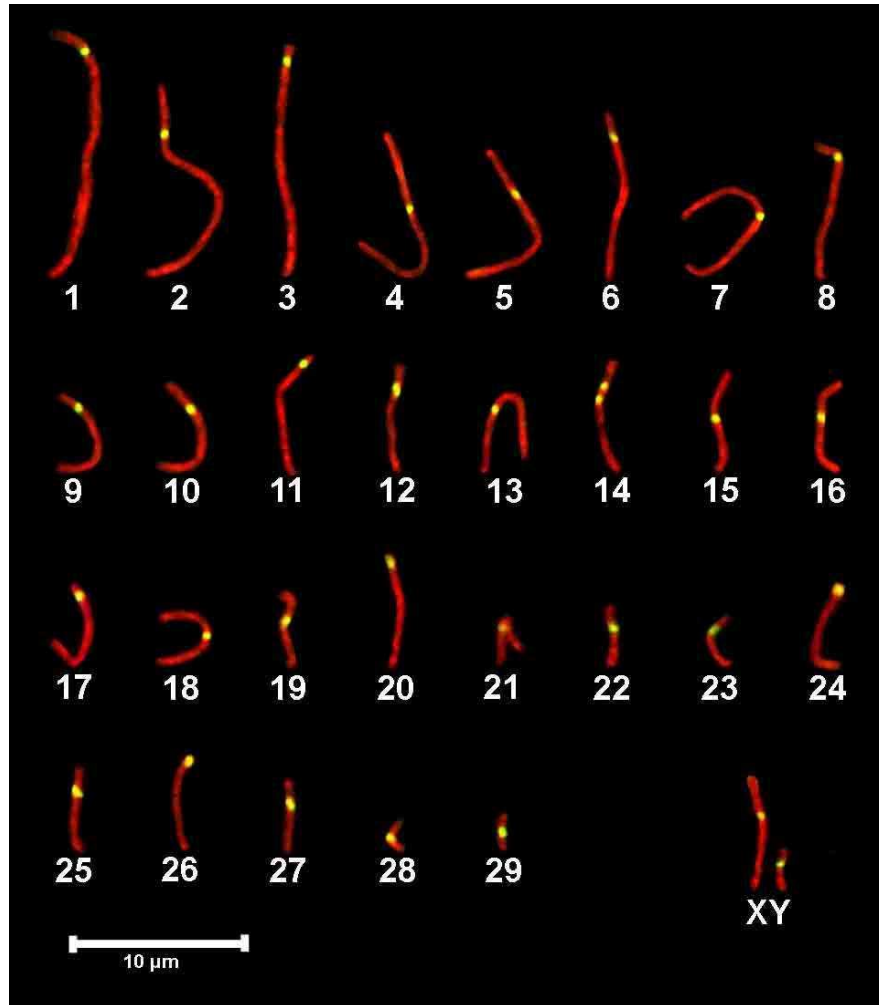
*Línea germinal – Técnica de complejo sinaptonémico*

Se analizaron un total de 100 núcleos de espermatocitos en paquitene, con el objetivo de evidenciar claramente la región centromérica. A través de inmunodetección, con anticuerpo en suero CREST, se marcaron los centrómeros en espermatocitos de paquitene, previamente inmunomarcados con SMC3 que permitieron evidenciar los ejes correspondientes a cada bivalente (Fig. 17).



**Figura 17:** Espermatozoido en paquíteno con inmunolocalización marcando los ejes de los bivalentes y las regiones del cinetocoro.

Se observaron 29 bivalentes autosómicos completamente apareados y el cuerpo XY (Fig. 18). Se pudo corroborar la morfología y el NF obtenido en el cariotipo mitótico de la especie. Así la ubicación de los centrómeros fueron claramente establecidos y se pudo verificar y clarificar acorde al cariotipo mitótico el número de componentes bibráquios autosómicos (12 metacéntricos y 13 submetacéntrico) y el número de elementos acrocéntricos (4). La posición de los cinetocoros en los cromosomas sexuales fue claramente establecida, y mediante esta técnica se pudo confirmar que ambos cromosomas presentan una morfología submetacéntrica (Fig. 18).

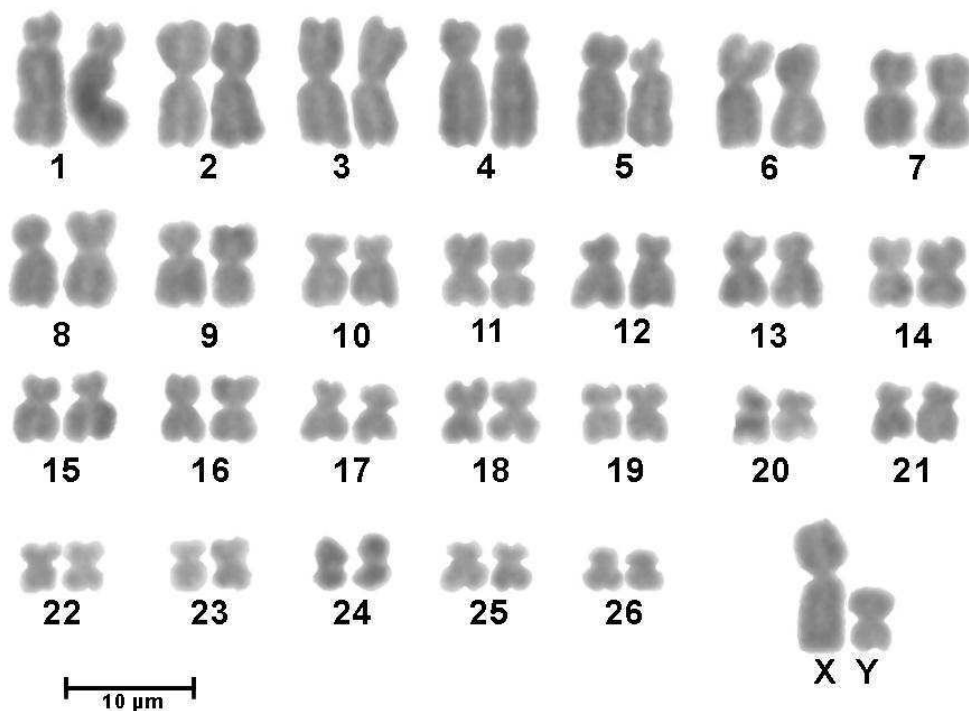


**Figura 18:** Cariotipo de complejo sinaptonémico de *M. tridactyla*. En rojo se marcan los ejes con anticuerpo anti-SMC3, superpuestos con la señal amarilla del anticuerpo que reconoce las proteínas del cinetocoro, suero CREST.

El cromosoma X al igual que en el cariotipo mitótico correspondió a un elemento submetacéntrico mediano, mientras que el cromosoma Y corresponde a un elemento submetacéntrico. El bivalente correspondiente al par cromosómico 14 para metafases mitóticas presentó una doble señal desfasada para cinetocoro, donde se pudo apreciar un centrómero próximo al telómero acrocéntrico y otro más intersticial submetacéntrico.

#### 4.1.2. *Tamandua tetradactyla* (Oso Melero)

Al igual que en la especie anterior se llevó a cabo la caracterización citogenética a nivel gama, con técnicas de tinción diferencial de bandeado G, C, NOR en 29 ejemplares, 17 machos y 12 hembras, de *T. tetradactyla*. El número diploide establecido para esta especie fue de  $2n=54$  XX/XY, con un NF=108 para todos los individuos estudiados. Todos los pares de cromosomas fueron bibraqueados. Los pares 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, y 28 fueron metacéntricos, los pares 1, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 19, 20 fueron submetacéntricos. Los cromosomas sexuales resultaron submetacéntricos; el cromosoma X con  $5,89 \pm 0,66\%$  y el cromosoma Y con un  $2,53 \pm 0,39$  (Tabla III, Fig. 19).

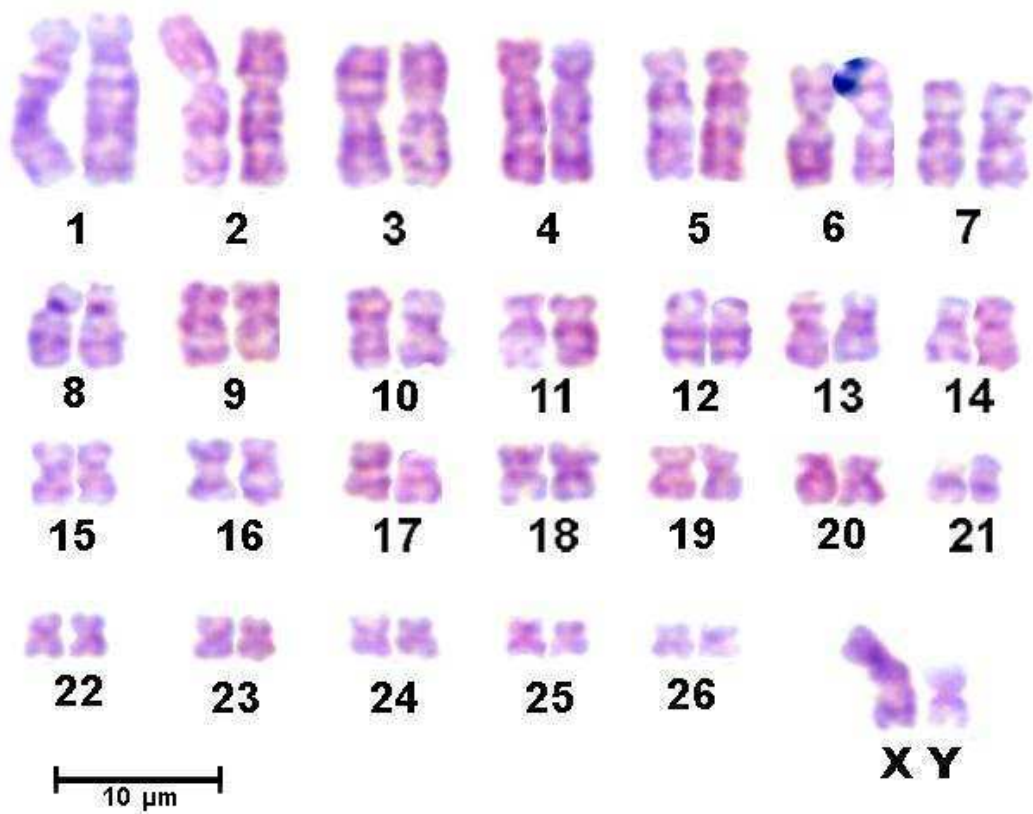


**Figura 19:** Cariotipo de un ejemplar macho de *T. tetradactyla*. ( $2n=54$ , XX/XY; NF= 108). Pampa del Infierno, Prov. de Jujuy. Tinción carbol fucsina.

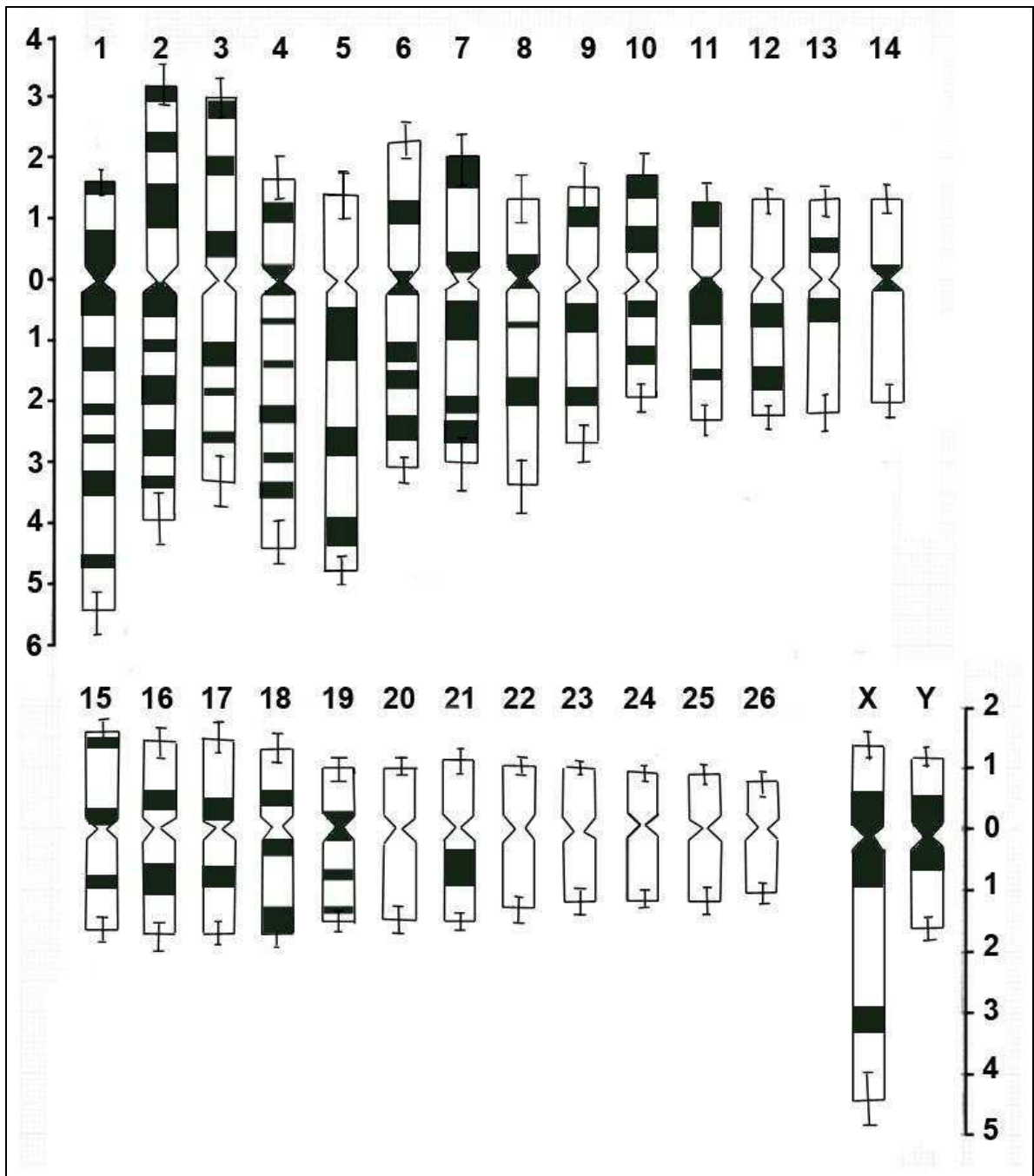
| <b>N°</b> | <b>LT</b> | <b>p</b>    | <b>q</b>    | <b>RB</b> | <b>IC</b> |    |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-----------|-----------|----|
| <b>1</b>  | 7,05      | 1,60 ± 0,24 | 5,45 ± 0,32 | 0,29      | 0,23      | SM |
| <b>2</b>  | 7,16      | 3,17 ± 0,29 | 3,91 ± 0,37 | 0,81      | 0,44      | M  |
| <b>3</b>  | 6,31      | 3,00 ± 0,28 | 3,30 ± 0,44 | 0,91      | 0,48      | M  |
| <b>4</b>  | 6,16      | 1,74 ± 0,30 | 4,43 ± 0,44 | 0,39      | 0,28      | SM |
| <b>5</b>  | 6,10      | 1,30 ± 0,36 | 4,8 ± 0,26  | 0,85      | 0,21      | SM |
| <b>6</b>  | 5,36      | 2,29 ± 0,30 | 3,10 ± 0,22 | 0,74      | 0,43      | M  |
| <b>7</b>  | 5,04      | 1,99 ± 0,40 | 3,04 ± 0,41 | 0,65      | 0,39      | M  |
| <b>8</b>  | 4,21      | 1,29 ± 0,31 | 3,27 ± 0,35 | 0,39      | 0,29      | SM |
| <b>9</b>  | 4,15      | 1,52 ± 0,39 | 2,70 ± 0,26 | 0,56      | 0,37      | SM |
| <b>10</b> | 3,64      | 1,74 ± 0,32 | 1,98 ± 0,33 | 0,88      | 0,48      | M  |
| <b>11</b> | 3,60      | 1,27 ± 0,26 | 2,27 ± 0,24 | 0,56      | 0,35      | SM |
| <b>12</b> | 3,57      | 1,30 ± 0,19 | 2,25 ± 0,22 | 0,58      | 0,36      | SM |
| <b>13</b> | 3,50      | 1,32 ± 0,20 | 2,21 ± 0,26 | 0,60      | 0,38      | M  |
| <b>14</b> | 3,40      | 1,33 ± 0,19 | 2,04 ± 0,25 | 0,65      | 0,39      | M  |
| <b>15</b> | 3,20      | 1,45 ± 0,18 | 1,75 ± 0,22 | 0,83      | 0,45      | M  |
| <b>16</b> | 3,22      | 1,56 ± 0,15 | 1,65 ± 0,20 | 0,95      | 0,48      | M  |
| <b>17</b> | 3,17      | 1,47 ± 0,24 | 1,68 ± 0,22 | 0,88      | 0,46      | M  |
| <b>18</b> | 3,01      | 1,28 ± 0,16 | 1,70 ± 0,22 | 0,75      | 0,43      | M  |
| <b>19</b> | 2,80      | 1,00 ± 0,15 | 1,80 ± 0,17 | 0,55      | 0,32      | SM |
| <b>20</b> | 2,63      | 0,95 ± 0,18 | 1,68 ± 0,24 | 0,56      | 0,36      | SM |
| <b>21</b> | 2,52      | 1,12 ± 0,19 | 1,40 ± 0,20 | 0,80      | 0,44      | M  |
| <b>22</b> | 2,43      | 1,05 ± 0,14 | 1,32 ± 0,22 | 0,80      | 0,43      | M  |
| <b>23</b> | 2,21      | 1,02 ± 0,11 | 1,18 ± 0,23 | 0,86      | 0,46      | M  |
| <b>24</b> | 2,13      | 0,93 ± 0,16 | 1,19 ± 0,18 | 0,78      | 0,44      | M  |
| <b>25</b> | 2,19      | 0,89 ± 0,14 | 1,28 ± 0,15 | 0,70      | 0,41      | M  |
| <b>26</b> | 1,86      | 0,75 ± 0,19 | 1,06 ± 0,20 | 0,71      | 0,40      | M  |
| <b>X</b>  | 5,89      | 1,52 ± 0,2  | 4,26 ± 0,46 | 0,35      | 0,25      | SM |
| <b>Y</b>  | 2,53      | 0,90 ± 0,19 | 1,40 ± 0,20 | 0,64      | 0,35      | SM |

**Tabla III:** Proporción de los cromosomas de *T. tetradactyla* respecto de largo total del complemento autosómico. LT=Largo total; p= brazo corto; q= Brazo largo; RB= Índice de brazos; IC= índice centromérico.

El patrón de bandas G permitió individualizar cada par y homologar sus elementos, individualizando también el patrón de bandas de los cromosomas sexuales X e Y (Fig. 20). La longitud en relación al complemento total haploide de los cromosomas de *T. Tetradactyla* se ilustra en el ideograma donde también se encuentra incorporado el ideograma del patrón de bandas G (Fig. 21).

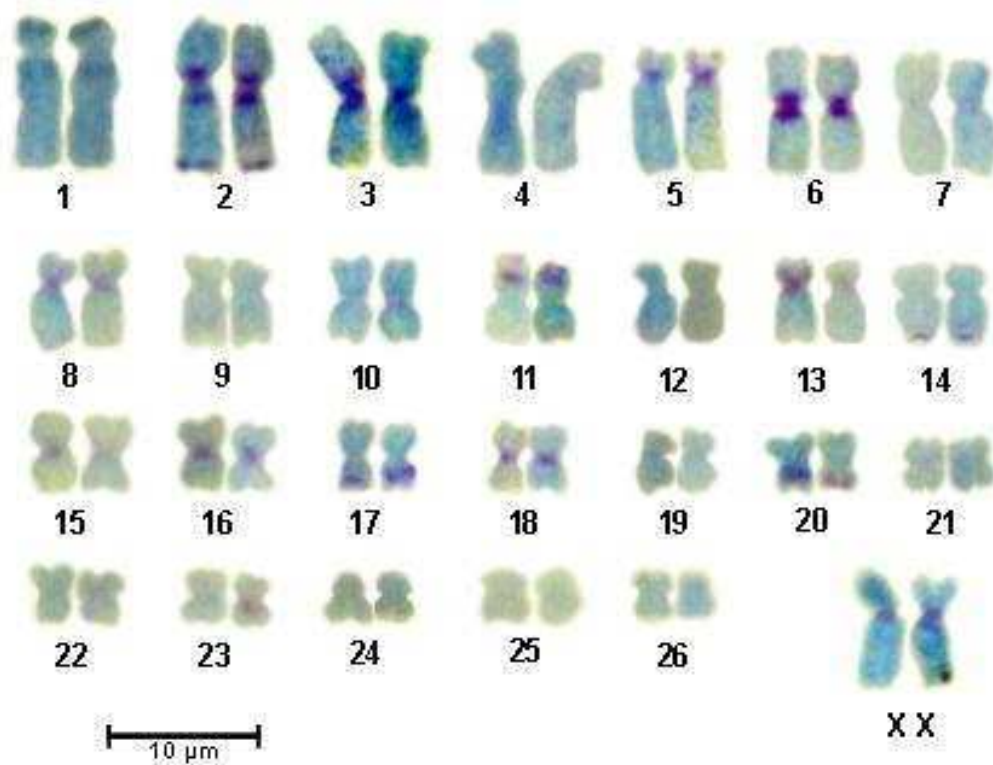


**Figura 20:** Cariotipo mostrando el patrón de bandas G de un ejemplar macho de *T. tetradactyla* proveniente de la localidad de Tartagal, Prov. de Salta.



**Figura 21:** Ideograma representativo del cariotipo de *T. tetradactyla* (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.

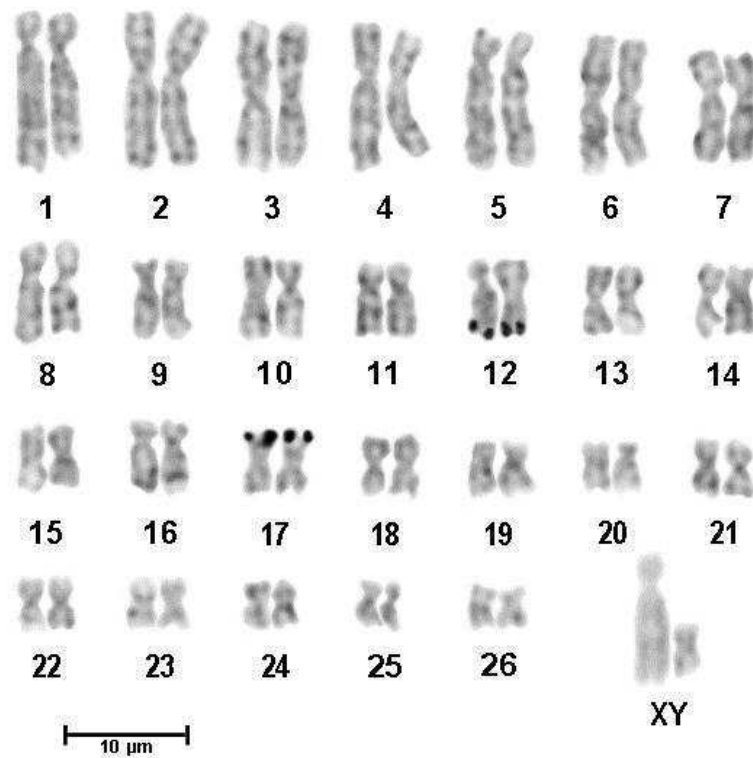
La técnica de bandas C reveló regiones heterocromáticas pericentroméricas y además zonas C positivas en regiones teloméricas e intersticiales en algunos de ellos. El par 2 presentó heterocromatina altamente repetitiva de ubicación centromérica y en el mismo par se evidenció una banda telomérica en el brazo “q”. Se evidenciaron regiones grandes repetitivas de heterocromatina centromérica en los pares 3, 6, 13, 16, 18; y en los pares 1, 5, 7, 8, 15, 21 bandas C con regiones heterocromáticas pericentroméricas pequeñas. Los pares 1, 2, 11, 14, 17, 20 presentaron zonas C positivas en regiones teloméricas e intersticiales. Los cromosomas 4, 7, 9, 10, 12, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26 no exhibieron bandas C (Fig. 22). El cromosoma X al igual que el cromosoma Y presentaron banda C centromérica pequeña.



**Figura 22:** Cariotipo mostrando el patrón de bandas C de un ejemplar hembra de *T. tetradactyla*, localidad de Iguazú, Prov. de Misiones.



La técnica de tinción argéntica permitió la localización de los organizadores nucleolares en el brazo “q” del cromosoma 12 y en el brazo “p” del cromosoma 17 del cariotipo mitótico (Fig. 23).

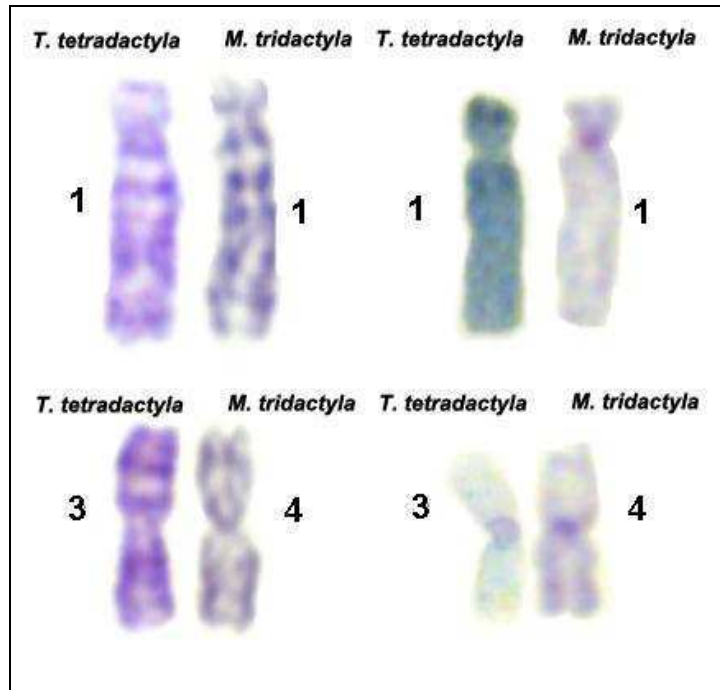


**Figura 23:** Cariotipo mostrando la localización de los organizadores nucleolares en un ejemplar macho de *T. tetradactyla*, localidad de Salvador Mazza, Prov. de Salta.

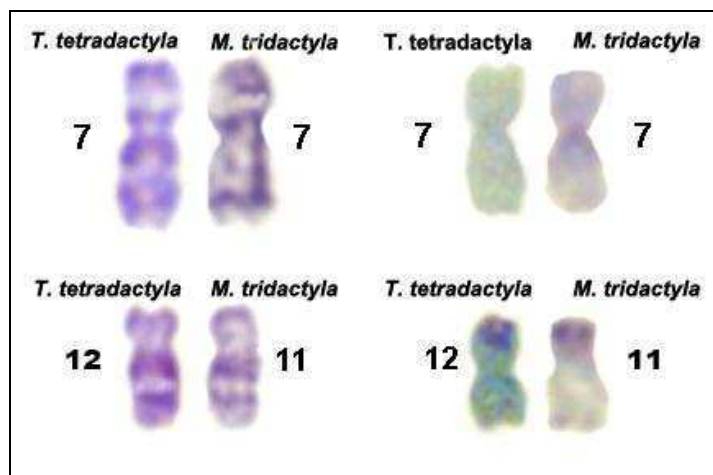
#### 4.1.3. Homeologías cromosómicas entre ambas especies

Los cromosomas 1/1, 3/4, 7/7, 12/11, resultaron con el patrón de bandas G ser los mismos y estar compartidos en su totalidad entre *T. tetradactyla* y *M. tridactyla* respectivamente (Fig. 24, 25); además los pares 15/15, 16/16, 18/18, 19/19, 21/21, 22/22, 24/27, 25/28, 26/29 también presentan un patrón de bandas homólogos (Fig. 26). El par 2 de *T. tetradactyla* fue la resultante de la fusión centromérica de los pares de cromosomas 9 y 20 de *M. tridactyla* (Fig. 27). El par 6 metacéntrico de *T. tetradactyla*

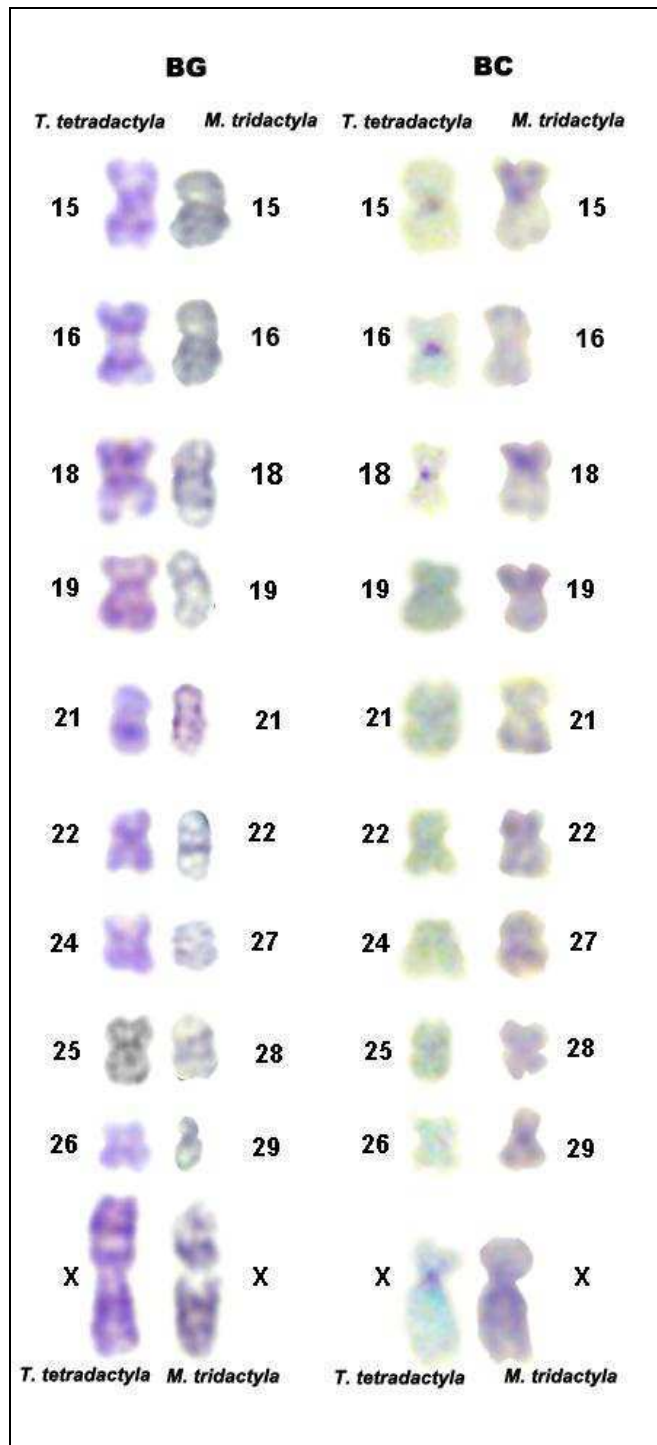
fue la resultante de la fusión de los elementos acrocéntricos 14, y 17 de *M. tridactyla* (Fig. 28).



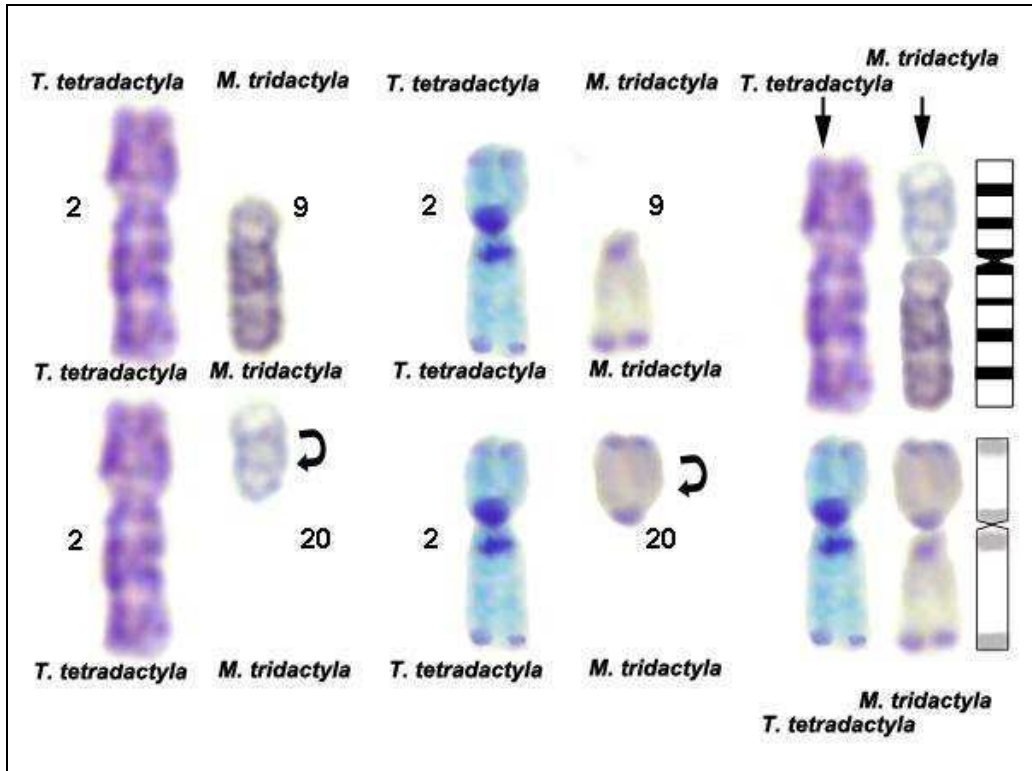
**Figura 24:** Homeología total entre los pares 1 de ambas especies y el par 3 de *T. tetradactyla* y con el 4 de *M. tridactyla*.



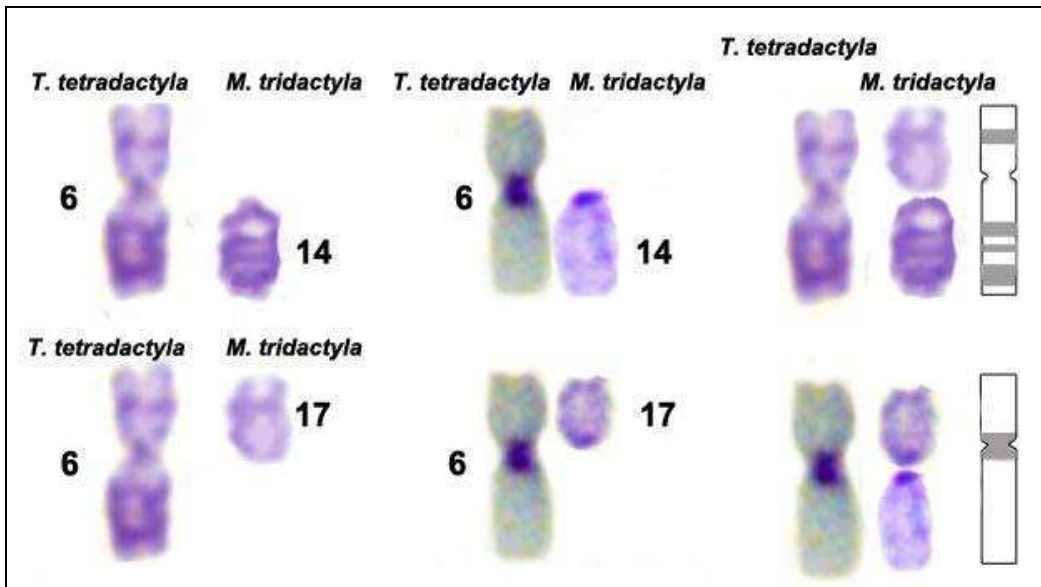
**Figura 25:** Homeología total entre los pares 1 de ambas especies y el par 3 de *T. tetradactyla* con el 4 de *M. tridactyla*.



**Figura 26:** Homeología total entre los pares 15/15, 16/16, 18/18, 19/19, 21/21, 22/22, 24/27, 25/28, 26/29 *T. tetradactyla* y *M. tridactyla* respectivamente.



**Figura 27:** Homeología cromosómica revelando una fusión entre el cromosoma 9 y 20 de *M. tridactyla* con respecto al par cromosómico 2 de *T. tetradactyla*.



**Figura 28:** Homeología cromosómica revelando una fusión entre el cromosoma 9 y 20 de *M. tridactyla* con respecto al par cromosómico 6 de *T. tetradactyla*.

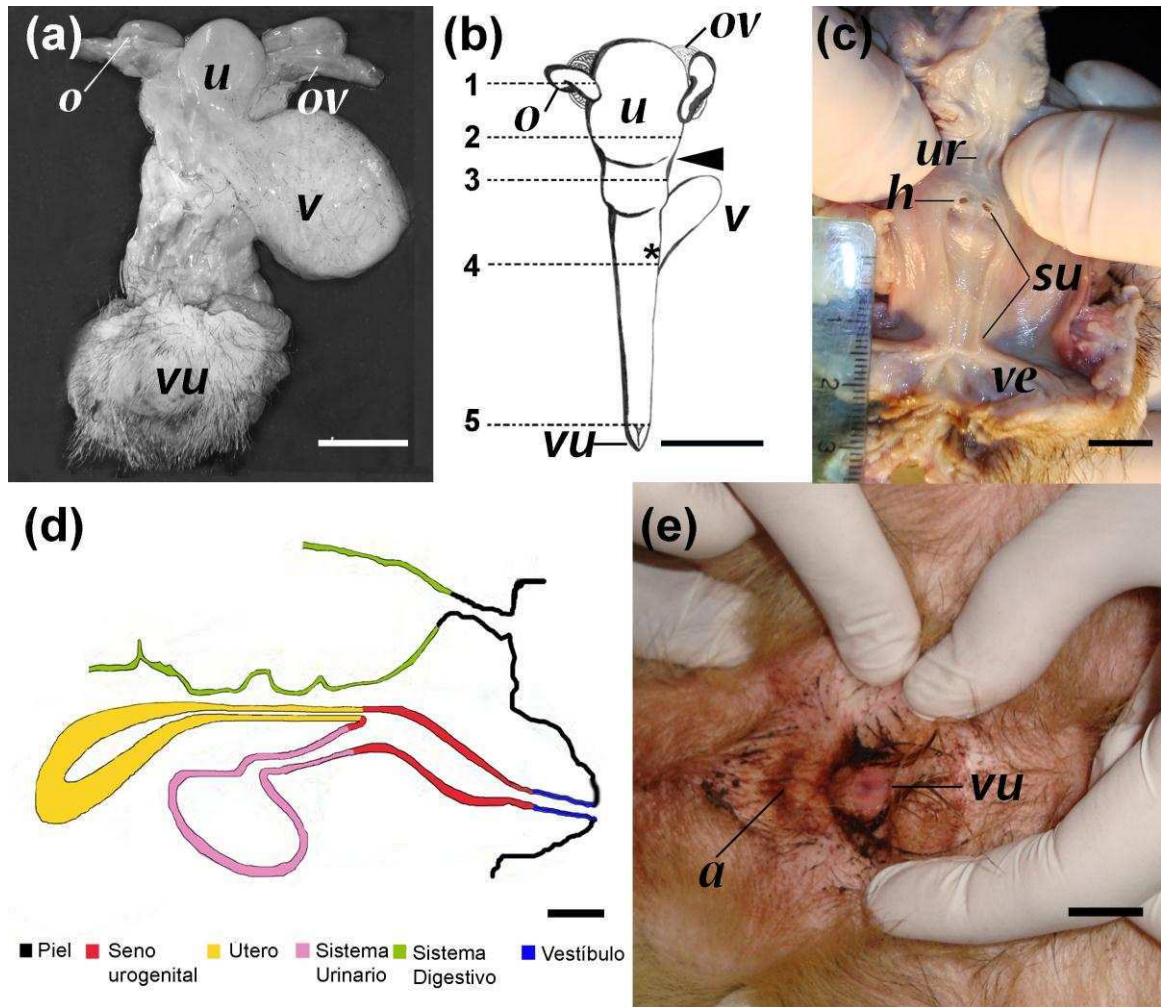
Mediante los sistemas utilizados no fue posible encontrar las homeologías entre los pares 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 20, 23 de *T. tetradactyla* y 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 23, 24, 25, 26, 8, 11, 24, 25, 26, de *M. tridactyla*. El tamaño del complemento compartido fue de un 83%.

## **4.2. Reproducción**

### **4.2.1. Hembras**

#### **4.2.1.1. Ovarios**

Macroscópicamente, los ovarios son estructuras ovoides (Fig. 29 a, b). Presentan una serosa ovárica con epitelio simple cúbico, túnica y una médula rodeada por la corteza, los grandes vasos y nervios penetran en el ovario de forma centralizada desde el mesovario y se ramifican a la periferia en las proximidades de los folículos (Fig. 30 a, b). La corteza se compone de un estroma que contiene los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo. Se observaron folículos típicos con un único ovocito rodeado por una capa simple de células escamosas o cúbicas del folículo o una capa estratificada de células cúbicas, folículos atrésicos, cuerpos lúteos y *corpus albicans* (Fig. 30 b-d).

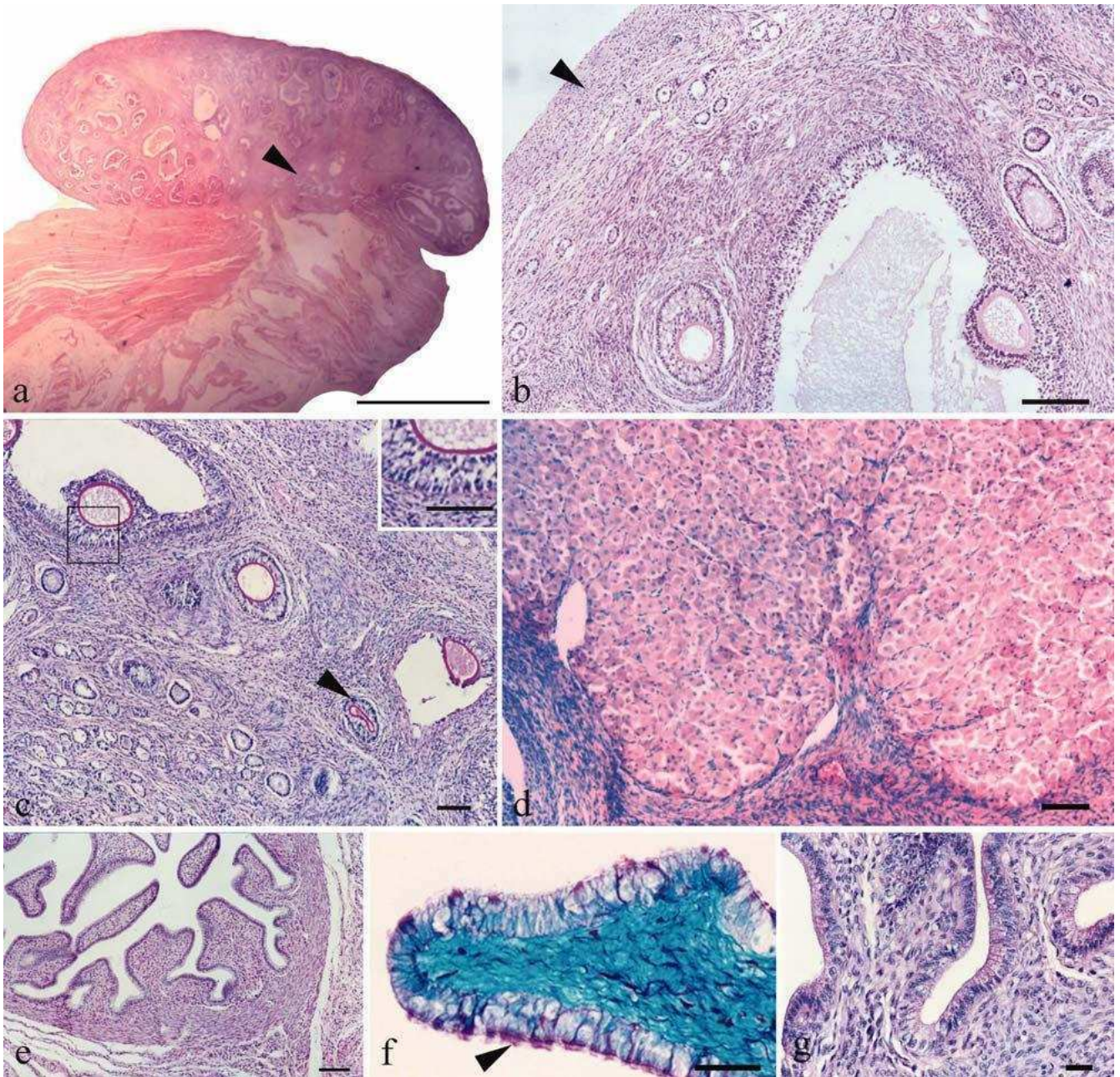


**Figura 29:** a: Tracto reproductor de hembra de *T. tetradactyla* donde se observa un útero simple y los ovarios de forma ovoides. b: Esquema del tracto genital que muestra los sitios en donde se realizaron cortes histológicos. Punta de flecha marca la transición entre el cuerpo del útero y el canal utero-vaginal. \* cuello de la vejiga. c: la disección anatómica del tracto genital mostrando el himen. d: bosquejo de la sección sagital que muestra la relación entre el aparato genital y el sistema urinario. e: Vulva de una hembra adulta. Escala de barras: 25 mm (a, b), 10 mm (c, d) y (e), 20 mm. Abreviaturas: a (ano); h (himen); o (ovario); ov (oviducto); su (seno urogenital); u (útero); ur (uréter); v (vejiga); vu (vulva).

#### **4.2.1.2. Oviductos**

Los oviductos son enrollados y filiformes, compuestos por tres partes características de las trompas (infundíbulo, ampolla e istmo) y se insertan en cada lado de la porción fúndica del útero. La longitud exacta del oviducto fue difícil de medir debido a su configuración anatómica. Histológicamente, la pared se compone de tres capas: la túnica mucosa, túnica muscular y túnica serosa (Fig. 30 e). La mucosa se caracteriza por un típico epitelio columnar con células columnares ciliadas y no ciliadas (secretoras), rodeado por una lámina propia (Fig. 31 f, g). Las células ciliadas son más frecuentes en el infundíbulo. La ampolla tiene pliegues altos y ramificados pliegues de la mucosa (Fig. 30 e), y el istmo tiene pocos pliegues y es más musculoso.





**Figura 30:** Ovario y oviducto de *Tamandua tetradactyla*. a: Sección del ovario mostrando organización típica, médula central y la corteza externa. Punta de flecha marca la médula central. Tinción H-E. b: corteza ovárica con folículos típicos en diferentes etapas de desarrollo. Punta de flecha marca túnica albuginea. Tinción H-E. c: corteza ovárica. Punta de flecha marca folículo atrésico. Tinción PAS. Recuadro: detalle que muestra zona pelúcida, las células granulares y la capa tecal. d: cuerpo lúteo. Tinción H-E. e: Sección transversal de la ampolla que muestra pliegues y corion celular. Tinción H-E. f: ampolla mostrando epitelio ciliado (punta de flecha). Coloración tricrómico de Masson. g: pliegues de mucosa del oviducto que muestran un epitelio columnar simple. Tinción H-E. Escala de barras: 5 mm (a), 100  $\mu$ m (b, c, e), 50  $\mu$ m (f) y 20  $\mu$ m (g).

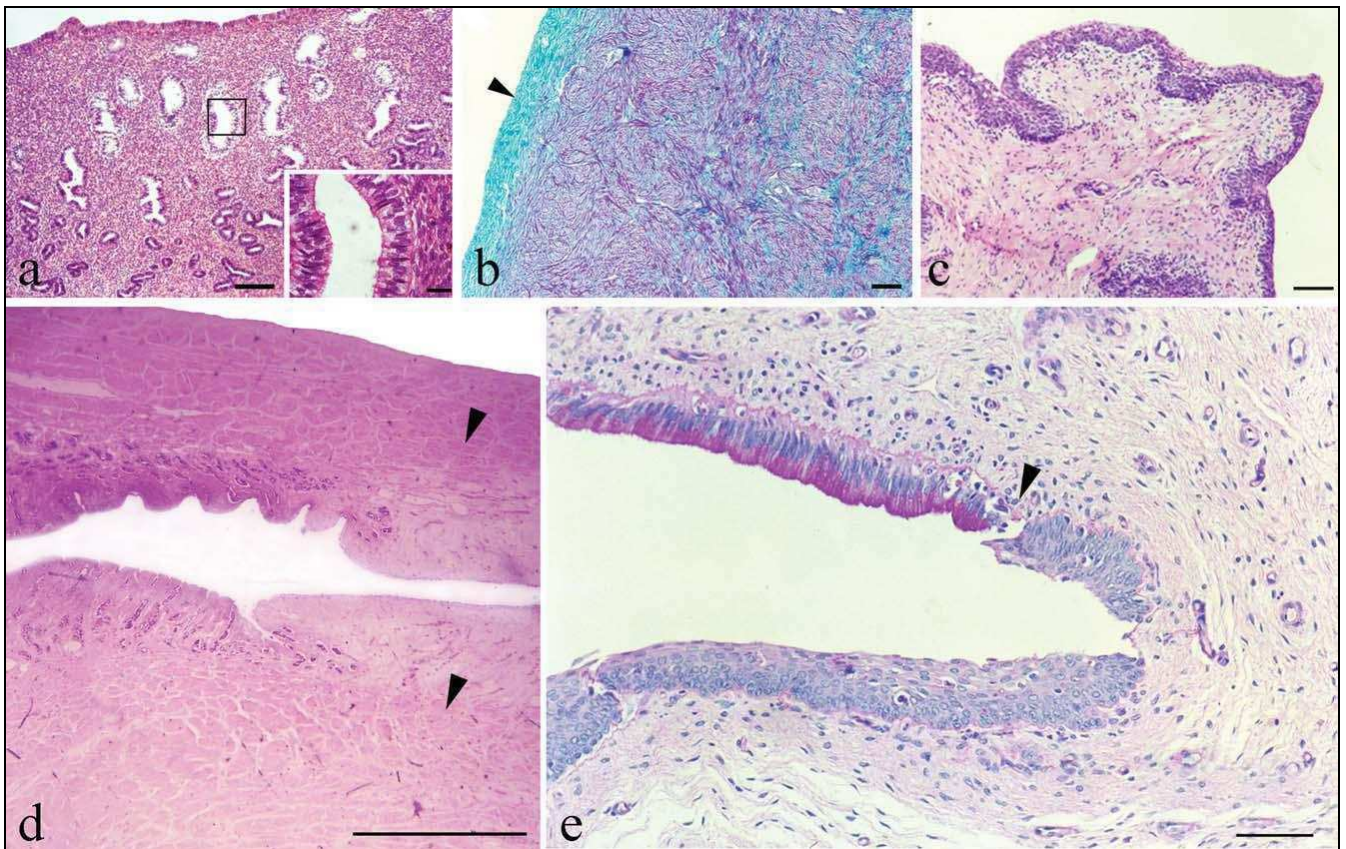


**Tabla VI:** Morfometría del tracto reproductor de hembras de *T. tetradactyla*. Los valores están expresados en milímetros X = media, SD= desvío estándar, D= derecha, I= izquierda

| Hembra Nº | Ovarios |       |       |      |         |      | Cuerpo del Utero |               |                  | Canal Uterovaginal | Seno Urogenital | Vestibulo |
|-----------|---------|-------|-------|------|---------|------|------------------|---------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------|
|           | Largo   |       | Ancho |      | Espesor |      | Largo            | Porcion ancha | Porcion estrecha |                    |                 |           |
|           | D       | I     | D     | I    | D       | I    |                  |               |                  |                    |                 |           |
| 1         | 15      | 20    | 7     | 9    | 5       | 5    | 30               | 15            | 10               | 60                 | 42              | 7         |
| 2         | 18      | 21    | 7     | 5    | 4       | 5    | 25               | 21            | 19               | 63                 |                 |           |
| 3         | 19      | 23    | 8     | 10   | 7       | 10   | 25               | 24            | 20               | 63                 | 31              | 15        |
| 4         | 7       | 5     | 5     | 4    | 5       | 4    | 32               | 17            | 11               | 43                 |                 |           |
| 5         | 20      | 17    | 6     | 7    | 4       | 4    | 19               | 10            | 0                | 67                 | 21              | 10        |
| X         | 15,69   | 17,27 | 6,43  | 7,04 | 4,98    | 5,46 | 26,36            | 17,44         | 11,94            | 59,00              | 31,27           | 10,73     |
| SD        | 5,18    | 7,20  | 1,31  | 2,57 | 1,18    | 2,58 | 5,07             | 5,49          | 8,10             | 9,19               | 10,37           | 4,15      |

#### 4.2.1.3. Útero

Los especímenes estudiados presentan un útero simple en forma de pera, dorso-ventralmente aplanado y en el fondo posee una superficie convexa (Fig 29 a, b). El útero en su más amplia región mide 10-24 mm y se reduce a 5-20 mm en la región caudal (Tabla IV). La longitud del cuerpo del útero es de unos 19-32 mm (Tabla IV). El endometrio muestra un epitelio columnar simple con un mucosa compuesta de glándulas tubulares (Fig. 31 a). El tejido conectivo del endometrio presenta extensas capas de sinusoides grandes anastomosadas. El miometrio está compuesto de músculo liso organizado en capas con haces mal definidos de fibras entretrejidas en varias direcciones (Fig. 31 b).

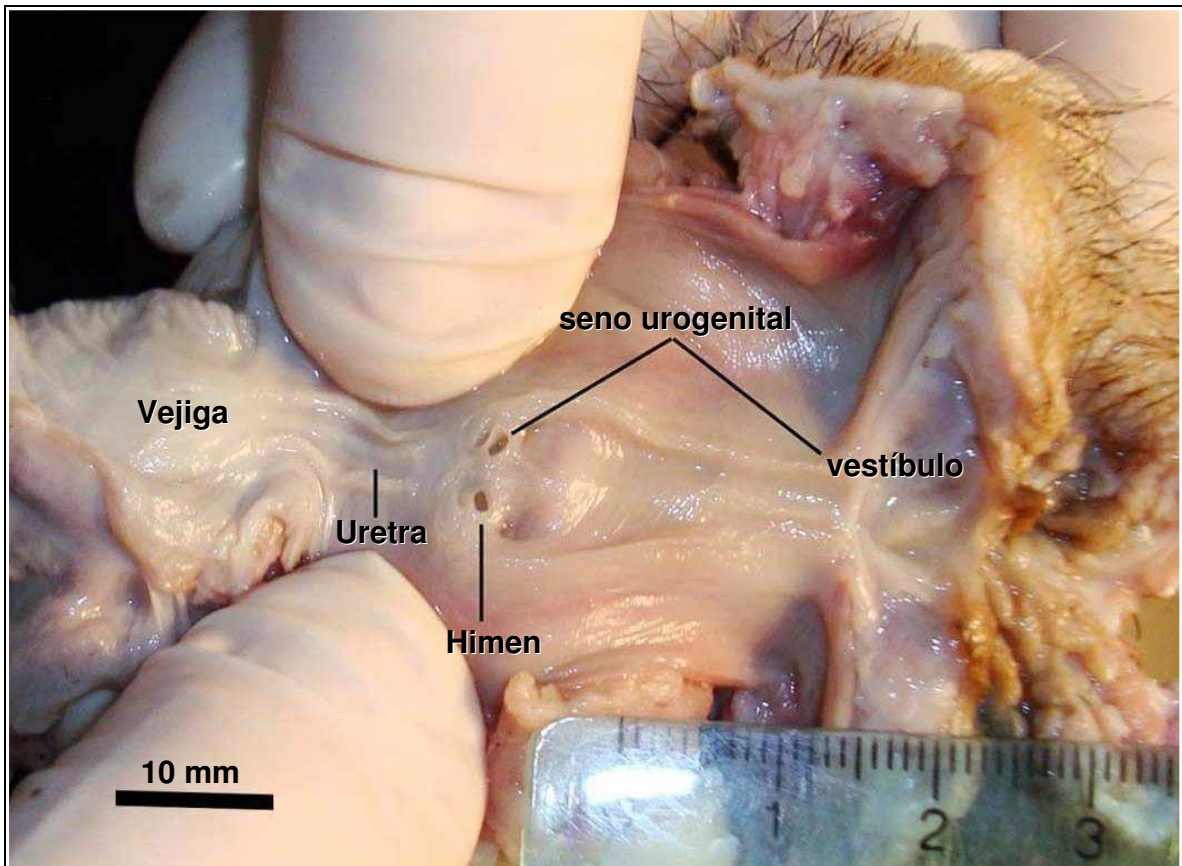


**Figura 31:** Útero, canal utero-vaginal y parte baja del tracto genital de *Tamandua tetradactyla*. a: mucosa uterina que muestra glándulas tubulares simples. Tinción H-E. Recuadro: detalle que muestra el epitelio glandular del endometrio. b: miometrio uterino, haces de fibras musculares lisas entrelazadas en varias direcciones. Punta de flecha marca la serosa del útero. Tinción tricrómica de Masson. c: seno urogenital que muestra epitelio de transición. Tinción H-E. d: Sección longitudinal de la transición entre el cuerpo del útero y el canal útero-vaginal, punta de flecha señala la capa de músculo liso continuo a lo largo del órgano. Tinción H-E. e: transición desde el epitelio columnar del canal utero-vaginal, mostrando células secretoras de mucus, a epitelio transicional de seno urogenital (punta de flecha). Tinción PAS. Barras de escala: 200 µm (a), 100 µm (b, c), 5 mm (d), 50 µm (e), y 20 µm (detalle A).

#### 4.2.1.4. Parte inferior del tracto genital

El sistema urogenital puede ser descrito, desde el orificio externo, formado por tres tubos o zonas: la zona del seno urogenital ubicado cranealmente para unir dos tubos: un tubo ventral, la uretra, que conduce a la vejiga y un tubo dorsal, el canal útero-vaginal. El canal útero-vaginal (43-67-mm de largo, la tabla 1) es un tubo ligeramente

arqueado anteroposteriormente, presenta pliegues musculares longitudinales que conectan el cuerpo del útero con el seno urogenital (Fig. 31 d). Está recubierto por un epitelio columnar simple con una franja PAS-positivo evidenciando la presencia de moco (Fig. 31 e). En el límite entre el canal útero-vaginal y el seno urogenital, se observó la presencia de un tabique membranoso que presentó la característica de encontrarse biperforado en todos los ejemplares estudiados; se puede observar que este tabique se asemeja a un himen (Fig. 32). El himen consiste en un grueso pliegue de la mucosa de forma redondeada con dos pequeñas aberturas (Fig. 29 c). En las muestras estudiadas, el himen se encontraba siempre intacto. El epitelio columnar simple del canal útero-vaginal termina abruptamente en el himen donde empieza el epitelio de transición del seno urogenital (Fig. 31 c, e).



**Figura 32:** Disección del tracto de una hembra donde se aprecia el himen como una membrana biperforada, a la altura de la transición entre el canal útero vaginal y el seno urogenital.

La longitud de la uretra es de 14-19 mm y presenta un típico epitelio de transición que se encuentra rodeado por músculo estriado. El seno urogenital (31-21 mm de largo, Tabla IV) es una cavidad flácida y distensible, con un amplio lumen; longitudinalmente está cubierto por pliegues recubiertos por epitelio de transición (Fig. 31 c). La lámina propia contiene tejido conectivo denso con abundantes fibras colágenas y con escasas fibras elásticas. También tiene un tejido eréctil altamente vascular que rodea parcialmente la uretra. Esta serie de sinusoides que se anastomosan libremente se conecta con los sinusoides del cuello del útero. El seno urogenital se abre al exterior a través de una hendidura vestibular (10-15 mm de largo, Tabla IV). Cerca del orificio externo, se observan en forma gradual los cambios del epitelio del seno urogenital hasta el epitelio escamoso estratificado queratinizado de la vulva. En la hembra estudiada viva, la vulva fue de 15 mm de largo (Fig. 29 a, b, e).

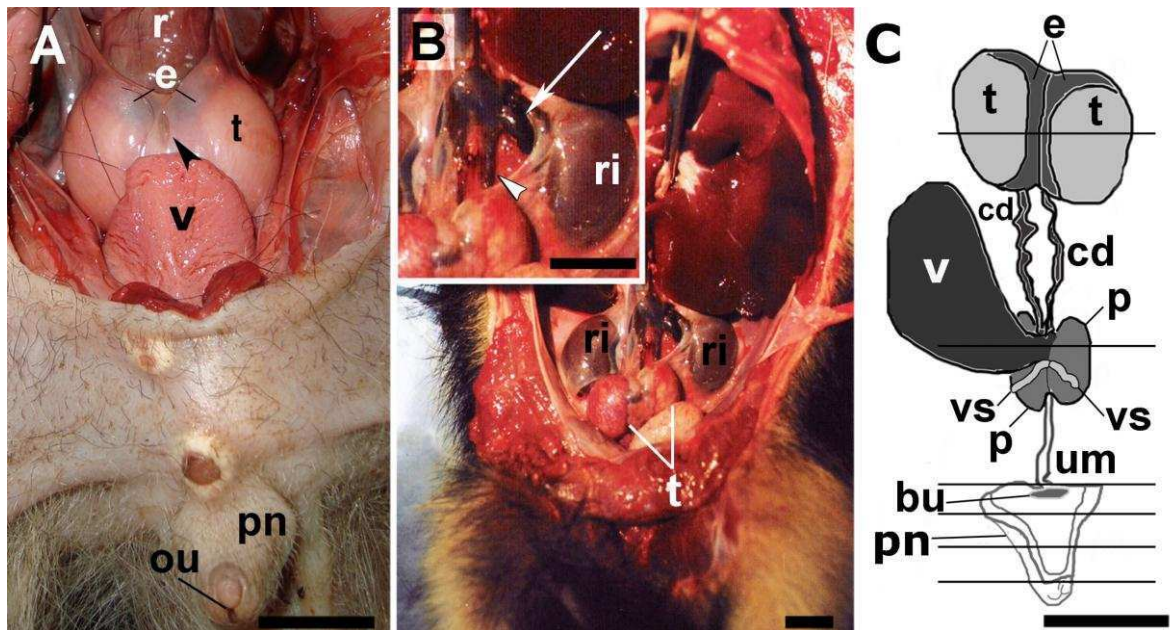


## 4.2.2. Machos

### 4.2.2.1. Tracto Genital

La anatomía general del tracto genital masculino del oso melero se muestra en la Fig. 33 (a-c). Los testículos están localizados en la cavidad pélvica, entre la vejiga y el recto, y se encuentran unidos medialmente entre sí por una delgada capa de peritoneo visceral (Fig. 33 a).

Los riñones están situados en posición craneal respecto de los testículos y junto a ellos. Se observa que la vena renal llega a la vena cava caudal, lo hace en un ángulo agudo, indicando la posición caudal de los riñones en esta especie (Fig. 33 b, véase el recuadro).



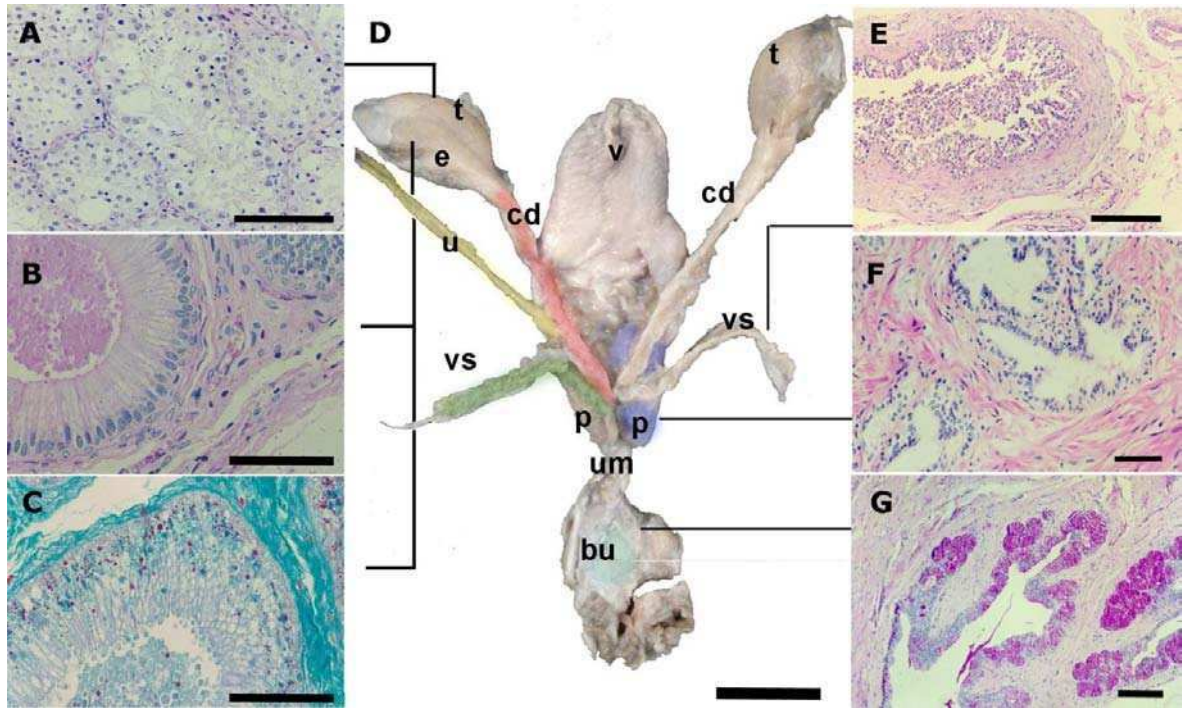
**Figura 33:** Características anatómicas del tracto genital masculino de *Tamandua tetradactyla* (vista ventral). (a) Disección donse se observa la ubicación de los testículos, flecha señala el peritoneo visceral que conecta ambos testículos. (b) Posición de los testículos en la cavidad pélvica. Recuadro: detalle que ilustra la vena renal izquierda (flecha), punta de flecha marca la vena testicular izquierda. (c) Dibujo esquemático del tracto genital que muestra los sitios en donde se realizaron los cortes histológicos. Escala: 2 cm. Abreviaturas: r, recto, v, vejiga, ri, riñón, t, testículos, e, epidídimo, cd, conducto deferente; p, próstata, vs, vesícula seminal, bu, glándulas bulbo-uretrales, pn, pene, ou, orificio uretral; um, uretra membranosa

Los testículos son alargados de forma ovalada en dirección cefalocaudal (Fig. 33 a-c). Se encuentran revestidos por una capa bien desarrollada de tejido conectivo, que corresponde a la túnica albugínea. La rete-testis constituye un sistema de canales interconectados que se extienden desde el mediastino a la túnica albugínea. A partir de los túbulos seminíferos a la red testicular, hay una conversión desde el típico epitelio estratificado germinal (Fig. 34 a) a un epitelio simple cilíndrico. Los conductos eferentes, emergen desde el polo craneal testicular y presentan un alto grado de enrollamiento antes de la apertura en el epidídimo.

Los conductos deferentes, son alargados (4.25-4.49 cm de longitud); en sección transversal se observa la luz del conducto en forma de estrella. Se encuentran revestidos por un epitelio columnar pseudoestratificado (Fig. 33 c). Los conductos deferentes tienen una típica lámina propia y están rodeadas por dos capas delgadas de músculo liso y una adventicia de naturaleza fibroelástica. Los conductos deferentes se abren en el conducto eyaculador, que desemboca en la uretra membranosa (Fig. 34 d).

La uretra está revestida por un epitelio polimórfico (Fig. 34). Se divide en dos segmentos: la uretra membranosa (2,8 cm de longitud), que va desde la vejiga hasta la base del pene y la uretra del pene (4.6 cm de longitud) (Fig. 35 g-i) que corre a lo largo de la longitud del pene en su superficie ventral, desde la unión con los conductos eyaculadores.

Las vesículas seminales (1,8-2,3 cm de longitud) son glándulas alargadas, delgadas y en espiral ubicadas dorsalmente a la glándula de la próstata (Fig. 34 d). Estas glándulas se componen de alvéolos revestidos por células cuboidales o columnares epiteliales (Fig. 34 e).



**Figura 34:** Anatomía e histología del testículo (a, d), epidídimo (b-d) y glándulas sexuales accesorias (d-f) de *T. tetradactyla*. (a) testículo que muestra túbulos seminíferos con espermátidas alrededor del lumen. H-E. (b) Sección transversal del epidídimo mostrando gránulos PAS positivos en el lumen. PAS. (c) Epidídimo con secreción activa. Tricrómico de Masson. (d) Disección del tracto indicando la ubicación de las glándulas sexuales (vista dorsal). (e) Vesícula seminal. H-E. (f) Próstata. H-E. (g) Glándula Bulbouretral mostrando células secretoras de moco PAS-positivas. PAS.

La próstata (2,4 - 2,8 x 1,0 -1,4 x 0,4 a 0,7 cm) es de forma bilobulada y está situada dorsalmente a la uretra membranosa (Fig. 34 d). Está compuesta por alvéolos que están cubiertos por un epitelio simple columnar (Fig. 34 f). Los alvéolos desembocan en un conducto colector principal que discurre una corta distancia a través del tejido uretral y luego se une a los conductos deferentes (Fig. 34 d) para formar el conducto eyaculador común que termina en una estructura peculiar, el colículo seminal, a la altura de la uretra.

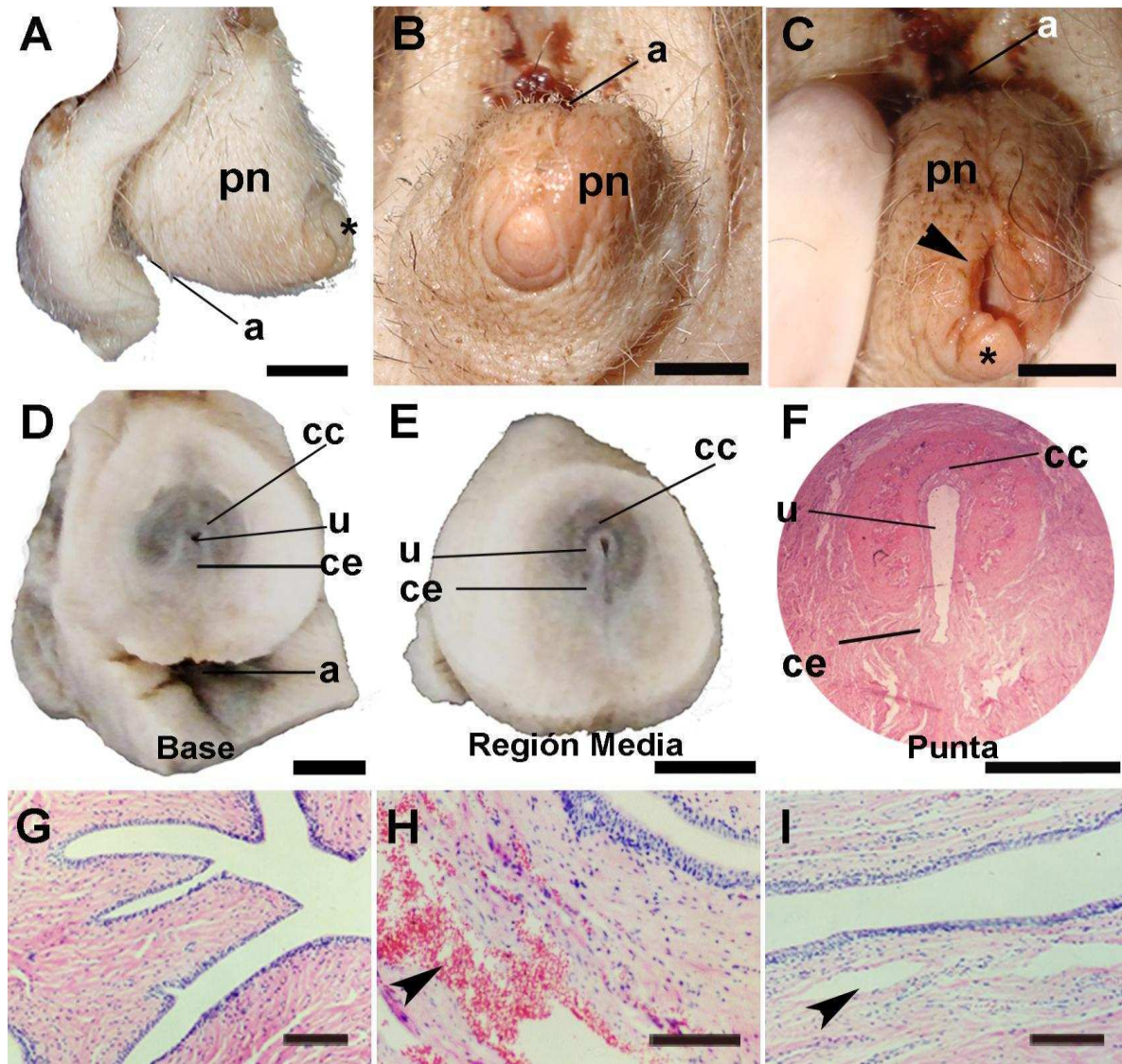
Las glándulas bulbouretrales, o de Cowper, son un par de cuerpos ovoides aplanadas (0,9 - 1,2 x 0,7 a 0,8, 0,5 a 0,6 cm) situado en la superficie ventral de la uretra peneana (Fig. 34 d). La superficie interior está dividida por amplios tabiques de tejido conectivo en numerosos alvéolos pequeños. El revestimiento epitelial se compone de

células cúbicas simples con núcleos que se caracterizan por presentar secreción PAS-positivo cerca de la superficie apical (Fig. 34 g). Los conductos glandulares surgen de la superficie medial de las glándulas ventralmente a la uretra peneana. Cada glándula está encapsulada por tejido conectivo y fibras estriadas correspondientes al músculo bulbocavernoso.

El pene está ventralmente dirigido hacia atrás contiguo al ano, por lo tanto no tiene un perineo visible (Fig. 35 a-d). En las muestras estudiadas, su longitud y diámetro fue de aproximadamente 2.0 - 3.6 cm y 1.6 - 2.0 cm, respectivamente (Tabla V, Fig. 35 a-c.). El órgano es de forma cónica y tienen un pliegue central (0.8 cm de longitud) que termina en el orificio externo de la uretra sobre el extremo distal del pene (Fig. 35 c). En secciones histológicas transversales se observa que mayormente se encuentra formado por tejido conectivo denso.

Los tejidos eréctiles, cuerpos cavernosos y esponjosos, se encuentran localizados centralmente en la base del pene, siendo estos situados dorsalmente en la parte medial. El cuerpo cavernoso tiene forma de herradura, y el cuerpo esponjoso que es reducido rodea a la uretra (una visión general de las estructuras del pene se puede apreciar en la fig. 35 d-f).





**Figura 35:** Genitales externos e histología del pene de *Tamandua tetradactyla*. (a) Pene en vista lateral. (b) Pene en vista frontal que muestra la punta (\*). (c) Pene en vista frontal que muestra orificio uretral (punta de flecha). (d, e) Secciones transversales en la base del pene (d) y la porción media (e). (f) Corte histológico transversal en la punta del pene. Tinción H-E. (g) Uretra peneana que muestra el lumen en forma de estrella. Tinción H-E. (h) Sección proximal del pene mostrando un seno cavernoso pequeño (punta de flecha). Tinción H-E. (i). Sección distal del pene mostrando un seno cavernoso pequeño (punta de flecha). Tinción H-E. Escala de las barras 1 cm (a-f), 100  $\mu$ m (g-i).

Asimismo, la túnica albugínea que rodea el cuerpo cavernoso se continúa directamente con el tejido conectivo denso de la mayor parte del pene. El cuerpo esponjoso rodea la uretra (Fig. 35 d-i) y está presente a lo largo de toda la longitud del pene. Este tejido se hace cada vez más delgado y más débil en la parte superior del

órgano; como consecuencia su extremo distal no se expande para formar un glande verdadero, desde el punto de vista histológico y por lo tanto no se observa ningún pliegue de la piel o prepucio que lo cubra. Los tejidos eréctiles están constituidos mayormente por los senos cavernosos tapizados por endotelio y rodeado por un tejido conjuntivo denso irregular con la particular característica de presentar muy pocas células musculares lisas (Fig. 35 d-f)

#### **4.2.2.1 Histología testicular y estructura fina de la espermatogénesis**

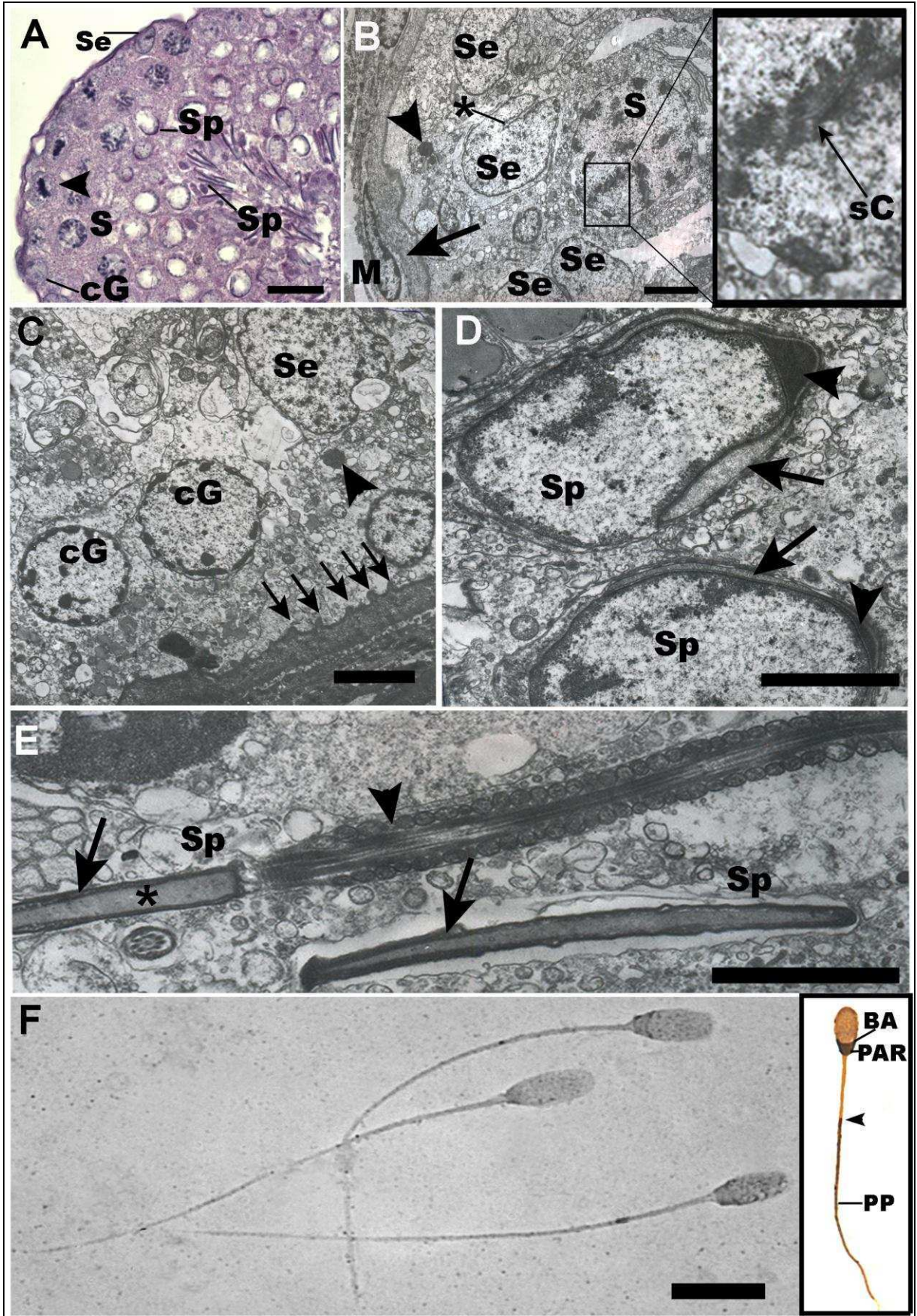
El parénquima testicular está formado por los túbulos seminíferos y el intersticio (con células de Leydig y las células del estroma) (Fig. 34 a). El epitelio seminífero está compuesto por las células de Sertoli y cuatro o cinco capas concéntricas de células germinales (Fig. 36 a). Se observó que la membrana basal de los túbulos seminíferos presenta periódicas indentaciones en el interior de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli tienen un núcleo ovoide y se encuentran principalmente cerca de la membrana basal, además, se caracterizan por presentar una invaginación que se extiende profundamente en el nucleoplasma (Fig. 36 b). El núcleo de estas células se caracteriza por presentar cromatina dispersa o por presentar pequeños "grupos" de heterocromatina unidos a la envoltura nuclear (Fig. 37 b, c), el complejo nucleolar no es evidente. En estas células, se puede observar gotas de lípidos en el citoplasma (Fig. 36 b, c). Junto a las células de Sertoli, tienen espermatogonias-B sobre la membrana basal que presentan cromatina como costra. Su núcleo redondo se caracteriza por grumos de cromatina oscuros principalmente unidos a alrededor de la envoltura nuclear (Fig. 36 c). Pueden ser reconocidos espermátocitos en diferentes etapas de maduración, en la etapa paquitene se observaron complejos sinaptonémicos que son claramente identificados ya que se encuentran bien definidos (Fig. 36 b, ver recuadro). En el compartimiento

adluminal, espermátidas redondas se encuentran con un gránulo único grande cerca del núcleo, que correspondería a la fase de Golgi de la transformación acrosomal. Espermátidas redondas muestran pequeños grupos de heterocromatina en todo el núcleo (datos no presentados). En otros túbulos seminíferos, se observaron espermátidas con forma ovalada formadas de cromatina densa que se extiende lateralmente y recubre una pequeña porción nuclear. Este es el comienzo de la fase de la tapa de espermátidas (Fig. 36 d). En algunos túbulos se observa una segunda capa de espermátidas, que muestran un núcleo alargado cubierto por un acrosoma bien desarrollado (Fig. 36 e). En estas la cromatina es homogénea y gris, lo que indica un estado avanzado de maduración (Fig. 36 e).

#### **4.2.2.2. Morfología espermática**

Los espermatozoides presentan un cabeza de forma oval y centralmente a la base se encuentra la inserción de la cola (Fig. 36 f). Las medias y desviaciones obtenidos para la longitud y el ancho de las cabezas de los espermatozoides fueron  $9,50 \pm 0,66 \mu\text{m}$  y  $4,65 \pm 0,34 \mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 36 f). El acrosoma cubre una gran parte de la cabeza, que representó el 70,3% de la cabeza (Fig. 36 f). La longitud de la cola fue de  $59,18 \pm 1,78 \mu\text{m}$  y el de la pieza intermedia fue  $14,67 \pm 0,76 \mu\text{m}$  (Fig. 36 f). El promedio de la longitud total fue de  $67,33 \pm 1,60 \mu\text{m}$  (Fig. 36 f). El estudio de MET mostró que el espesor de la cabeza de los espermatozoides fue en promedio  $0,23 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , y tuvo un gradual aumento, de la punta a la base. El volumen nuclear de los espermatozoides se estimó en  $9,98 \pm 0,63 \mu\text{m}^3$ .



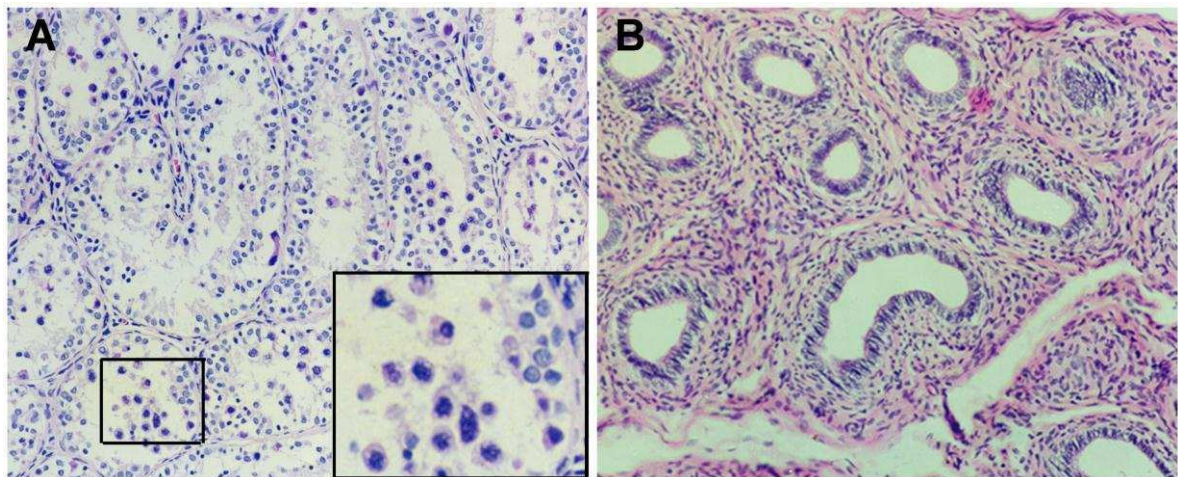


**Figura 36:** Microscopía óptica (a) y estructura fina (b-e) del epitelio seminífero y morfología de los espermatozoides (f) de *Tamandua tetradactyla*. (a) Túbulo seminífero en sección transversal, punta de flecha señala la mitosis de espermatogonias. Tinción PAS. (b) Células de Sertoli con hendiduras nucleares (\*) y gotas de lípidos (punta de flecha), espermatocito (recuadro muestra los complejos sinaptonémicos) y células mioepiteliales en la membrana basal (flecha). (c) Células de Sertoli con gotas de lípidos (punta de flecha) y las células espermatogonias con corteza. Flecha marca invaginaciones de la membrana basal. (d) Espermatidas con núcleo en forma oval y material denso proacrosómico (punta de flecha) que se extiende lateralmente, saco acrosómico (flecha). (e) Espermatidas alargadas con núcleo cubierto por un acrosoma bien desarrollado (flecha), cromatina homogénea (\*) y pieza intermedia con mitocondrias notables (punta de flecha). (f) Izquierda, espermatozoides en contraste de fase, derecha, espermatozoides teñidos con nitrato de plata. Punta de flecha marca el final de la pieza intermedia. Escala de barras: 10  $\mu\text{m}$  (a); 3  $\mu\text{m}$  (b-e); 10  $\mu\text{m}$  (f). Abreviaturas: se, células de Sertoli; e, espermatocito; Cs, complejos sinaptonémicos; M, células mioepiteliales; Ec, espermatogonias costrosas; Es, espermatidas; BA, límite del acrosoma; PAR, región post-acrosomal; PP, pieza principal.

#### 4.2.2.3. Variaciones morfológicas del tracto genital entre los individuos

Hubo ejemplares que no presentaron espermatozoides en el epidídimo y mostraron un epitelio seminífero desorganizado, con abundantes figuras de apoptosis y la presencia de células libres en el lumen, que carecían de los tipos celulares finales de la espermatogénesis (espermatidas redonda y espermatidas alargadas) (Fig. 37 a). Los testículos de estos especímenes fueron clasificados como inactivos, y su volumen fue siempre menor respecto al de los machos considerados activos (Ejemplares 3, 4, 5 y 6 de la Tabla V). Lo mismo sucedió con los diámetros del epidídimo en los machos considerados inactivos (Ejemplares 1 y 2 de la tabla V) dado que fueron menores en comparación con los otros machos (Ejemplares 3 y 4 de la Tabla V), la histología del epidídimo (Fig. 37 b) mostró menor diámetro de la luz en los túbulos y fue rico en tejido conectivo intertubular en los machos 1 y 2 con respecto a los machos 3 y 4 (ver tabla V).





**Figura 37:** Testículo (a) y epidídimo (b) de un individuo inactivo (macho 1). (a) Sección transversal de un testículo inactivo muestra degeneración parcial de los túbulos seminíferos. El recuadro muestra células libres en el lumen con figuras apoptóticas. Tinción H-E. (b) Sección transversal del epidídimo de un individuo con gónadas inactivas que no muestran espermatozoides en el lumen. Tinción H-E. Escala de la barra 100  $\mu\text{m}$ .

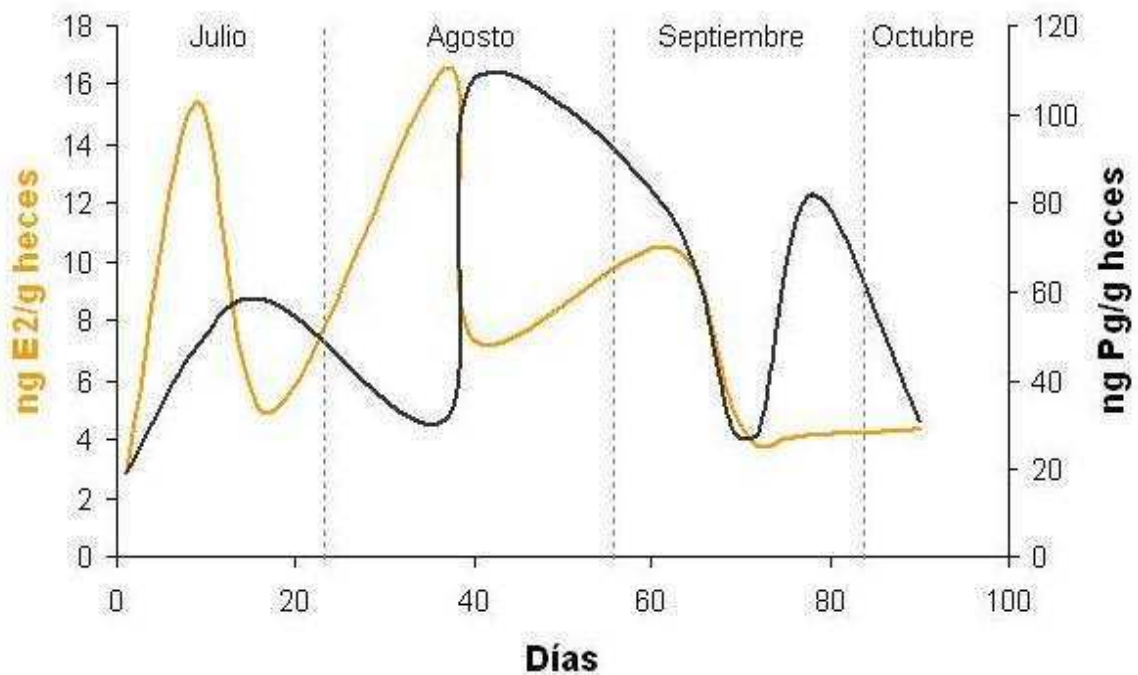
**Tabla V:** Morfometría del tracto reproductor de machos de *T. tetradactyla*. Los valores están expresados en cm. S/d: sin datos

| Individuo | Peso | Estación                  | Testículos |            |              |                            | Epididimos | Pene  | Espermatozoide |
|-----------|------|---------------------------|------------|------------|--------------|----------------------------|------------|-------|----------------|
|           |      |                           | Largo (cm) | Ancho (cm) | Espesor (cm) | Volumen (cm <sup>3</sup> ) | Diámetro   | Largo |                |
| 1         | 4.1  | Verano<br>(12/02/1999)†   | 2.0        | 1.0        | 0.8          | <b>1.0</b>                 | 0.4        | 2.0   | No             |
| 2         | 4.0  | Invierno<br>(01/08/1999)† | 2.0        | 1.3        | 0.8          | <b>1.8</b>                 | 0.4        | 2.6   | No             |
| 3         | 5.2  | Invierno<br>(21/07/1999)† | 3.5        | 2.0        | 1.5          | <b>7.3</b>                 | 0.6        | S/d   | Si             |
| 4         | 4.0  | Otoño<br>(04/04/2009)†    | 2.7        | 1.8        | 1.3          | <b>4.5</b>                 | 0.6        | 3.6   | Si             |
| 5         | 4.5  | Verano<br>(18/02/2010)    | 3.1        | 1.9        | S/d          | <b>5.8</b>                 | S/d        | 3.3   | S/d            |
| 6         | 4.5  | Verano<br>(18/02/2010)    | 3.6        | 2.4        | S/d          | <b>10.8</b>                | S/d        | 3.5   | S/d            |

## **4.3. Hormonas Sexuales**

### **4.3.1. *Myrmecophaga tridactyla***

Los niveles hallados de progesterona oscilaron entre 18.89 y 108.33 ng/g de peso, mientras que para los 17- $\beta$ -estradiol oscilaron entre 2.29 y 16.86 ng/g de peso. En el caso del 17- $\beta$ -estradiol se observaron oscilaciones durante los meses julio, agosto y septiembre, sin embargo no se observó un patrón similar para la progesterona. El método permitió observar importantes diferencias entre los niveles hormonales hallados a lo largo del periodo de muestreo asociados al ciclo reproductivo, sobre todo con los estrógenos, aportando de esta forma resultados preliminares que nos permitirán en un futuro caracterizar el estado reproductivo (Fig. 38). La metodología empleada fue eficaz para la detección de las hormonas sexuales y los datos obtenidos permitieron obtener un perfil hormonal sugiriendo un ciclo en hembras con una periodicidad de 25-30 días aproximadamente.

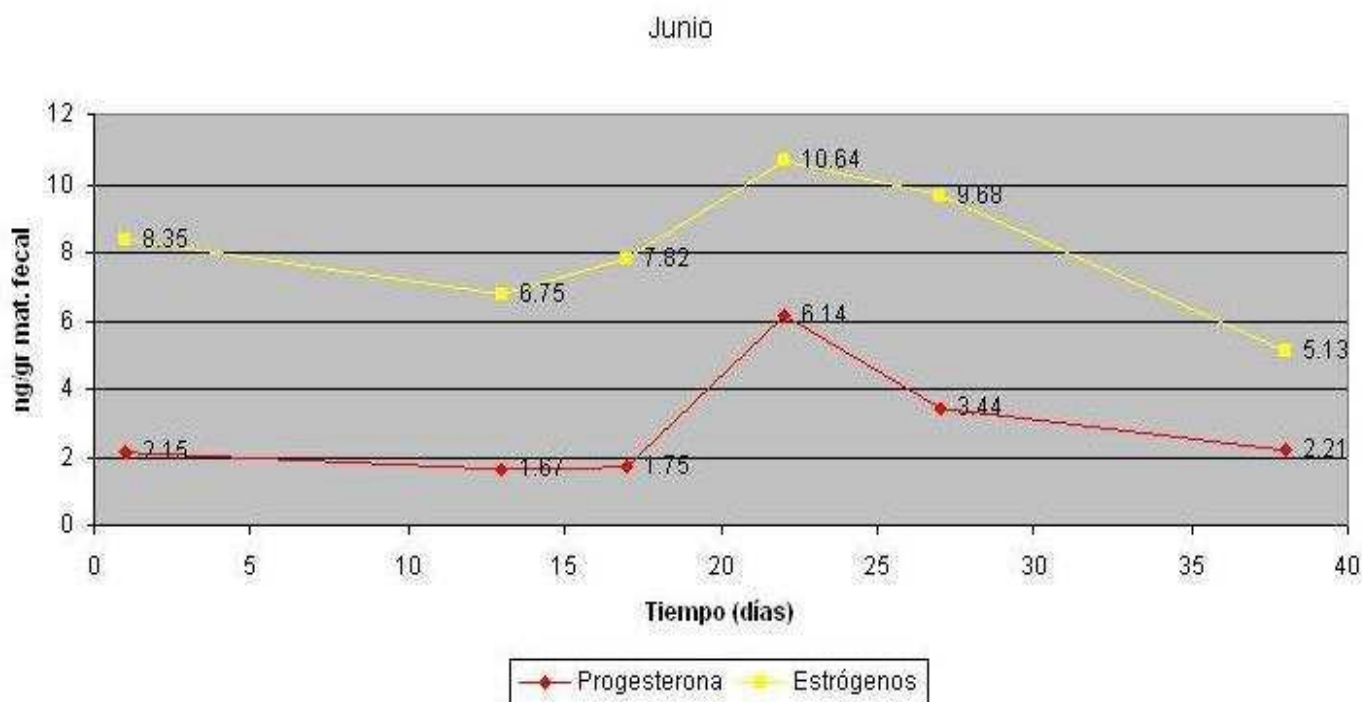


**Figura 38:** Curvas de correlación entre concentraciones de progesterona plasmática y estrógenos en muestras de heces frescas de *M. tridactyla*.

#### 4.3.2. *Tamandua tetradactyla*

Las diluciones óptimas resultaron variar para progesterona en los meses de abril y junio, mientras que para estrógenos fueron de 1:5 en ambos meses. Los niveles hallados de progesterona para abril oscilaron entre 1.94 y 4.36 ng/mg de peso, y para junio entre 1.67 y 6.14 ng/mg de peso, mientras que para los estrógenos oscilaron entre 3.30 y 20.20 ng/mg de peso en abril y entre 5.13 y 10.64 ng/mg de peso para junio. Ambos ejemplares se encuentran sincronizados en sus ciclos reproductivos. El método permitió cuantificar diferencia entre hormonas debiendo seguir por más tiempo para caracterizar en forma completa el ciclo (Fig. 39).





**Figura 39:** Curvas de correlación entre concentraciones de progesterona plasmática y estrógenos en muestras de heces frescas de *T. tetradactyla*.

# Discusión

## **5. Discusión**

### **5.1 Citogenética**

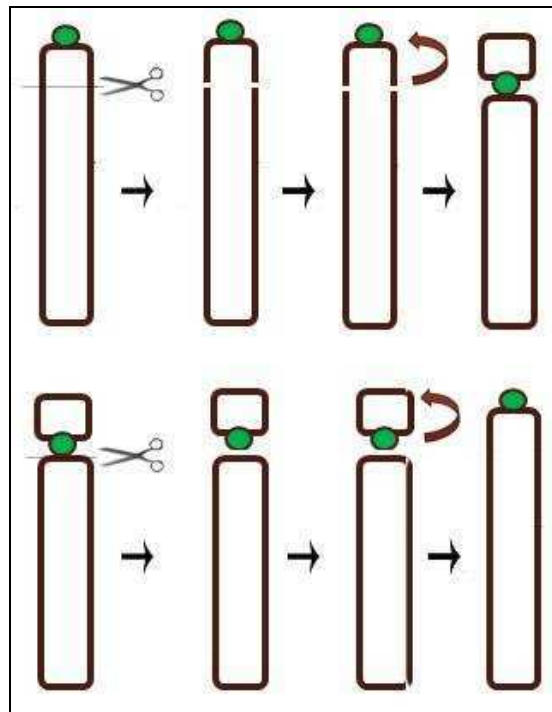
La nomenclatura en *Xenarthra* ha sufrido sucesivas modificaciones desde las primeras descripciones del grupo, tanto en sus formas fósiles o vivientes. En los últimos años los estudios de filogenia molecular han realizado aportes significativos acerca de la posición filogenética del grupo y de sus relaciones con los restantes mamíferos placentados (Delsuc et al. 2003; 2004). Los estudios citogenéticos no han ayudado a comprender la historia evolutiva de *Xenarthra*, esto puede ser debido a que hasta el momento ellos carecen de profundidad y extensión necesarias

#### **5.1.1 *Myrmecophaga tridactyla***

La caracterización del cariotipo de *M. tridactyla* cobra especial importancia debido a que se han identificado genéticamente dos diferentes razas cariotípicas en nuestro territorio. Esta variación se debe a rearrreglos cromosómicos del par 14, probablemente correspondiente a una inversión pericéntrica (Fig. 40), que podría afectar a los individuos heterocigotos (resultado de la unión de dos individuos con variación cariotípica) (Merani et al. 1980).

El cariotipo encontrado coincide con el  $2n$  al descrito por Hsu (1965) y Pereira et al. (2004). Siendo la descripción de los ejemplares de este último autor la correspondiente a la forma doble homocigota, con ambos elementos del par 14 con

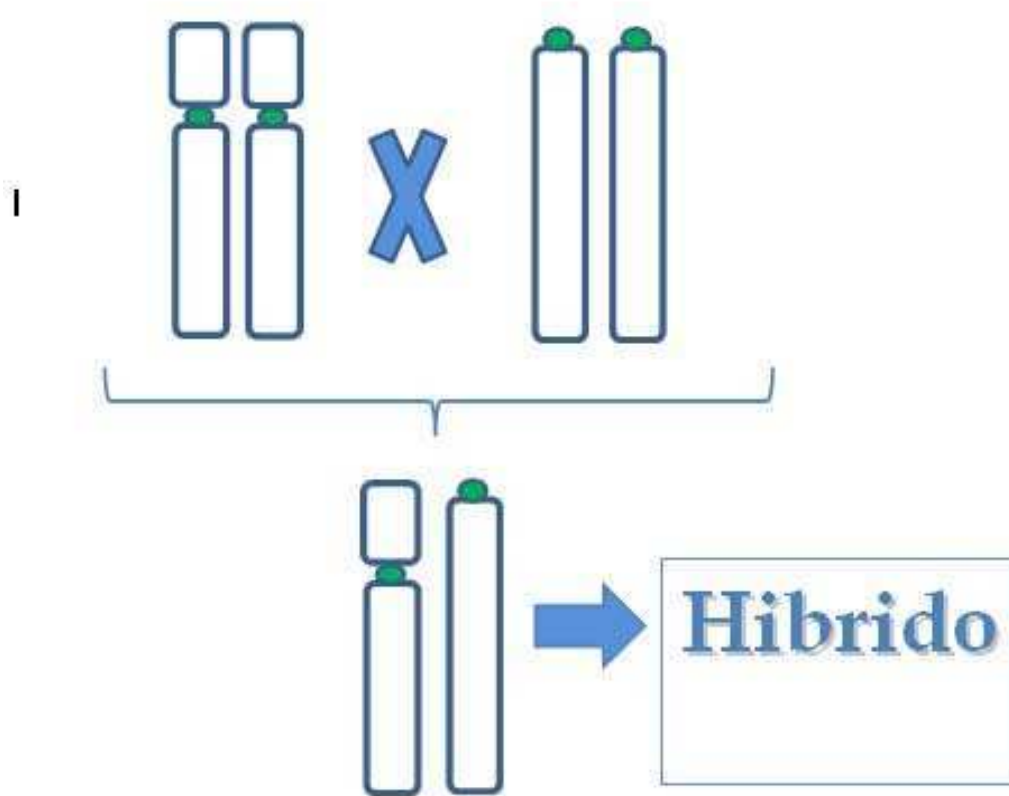
brazos pequeños “p” (DH), con un número fundamental equivalente por lo tanto al NF=112 encontrado para la distribución II. No obstante, en el ejemplar en el que se realizó la detección inmunológica del CS, se observó que este par presentaba una posible sinapsis. Sería importante poder realizar estudios meióticos y ver como ocurre la segregación en individuos que presenten este reordenamiento, y sobretodo en individuos de la progenie de estos y evaluar así su posible subfertilidad.



**Figura 40.** Inversión pericentromérica, explicando el mecanismo de reordenamiento encontrado en *M. tridactyla*.

Los estudios de Mathey, ya en 1949, en sus conclusiones, demostraron que las variaciones cromosómicas encontradas en la naturaleza, pueden ser de diversos tipos, involucrando distintos reordenamientos estructurales como: inversiones y translocaciones en estados de homo y heterocigosis; a esto, se sumaba la posibilidad de que los híbridos (heterocigotas para un reordenamiento) tuvieran una potencial fertilidad reducida asociada a

mecanismos de aislamiento post-cigóticos (Fig. 41). Es conocido en mamíferos que cuando las razas cariotípicas toman contacto entre sí y se hibridizan, producen un cariotipo heterocigota (White 1973). Este cariotipo heterocigota, puede sufrir una disminución de la fertilidad (Searle 1986). La alteración de la fertilidad puede representar un gran impacto en la disminución del flujo génico entre las dos razas cromosómicas, evolucionando probablemente cada una de ellas en especies distintas (White 1978). En condiciones de bioterio se ha podido cruzar especies como la musaraña enana y el ratón con variaciones cariotípicas de tipo Robertsoniano (Searle 1983; Searle 1988, Redi y Capanna 1988) con la producción de heterocigotas Robertsonianos. En ellas se ha demostrado la aparición de subfertilidad del heterocigota, por la producción de gametas no balanceadas, resultado de la no disyunción en la anafase I de la meiosis y por el parcial o completo arresto de la gametogénesis del macho (Gropp y Winking 1981; Redi y Capanna 1988; Merani y Capanna 1980). En vez, en los akodontinos, donde se trata de una fisión con inversión pericentromérica (Merani et al. 1980) ha sido demostrado que no sólo los heterocigotas presentaban una mala segregación, sino que también la presentaban los doble homocigotas, en los cuales, incluso era más evidente en la Metafase II de la Meiosis. Es posible que en *M. tridactyla* en las zonas marginales de diferentes áreas de distribución donde individuos entren en contacto y se forme el heterocigota, haya una reducción de la fertilidad similar a las que ha sido demostrada en especies modelos.



**Figura 41:** Hibrido heterocigota producto del cruzamiento de individuos de una especie con variaciones cariotípicas para un par cromosómico.

En el presente trabajo de tesis se demuestra que la existencia de un nuevo cariotipo es evidente. Sin embargo, será imprescindible aclarar si los individuos de las distintas distribuciones, o los híbridos que se formen de ellos pueden presentar un estado de subfertilidad, o si estos rearrreglos cromosómicos, son fluctuaciones que se dan naturalmente en la especie a lo largo de su distribución, sin ocasionarles mayores problemas.

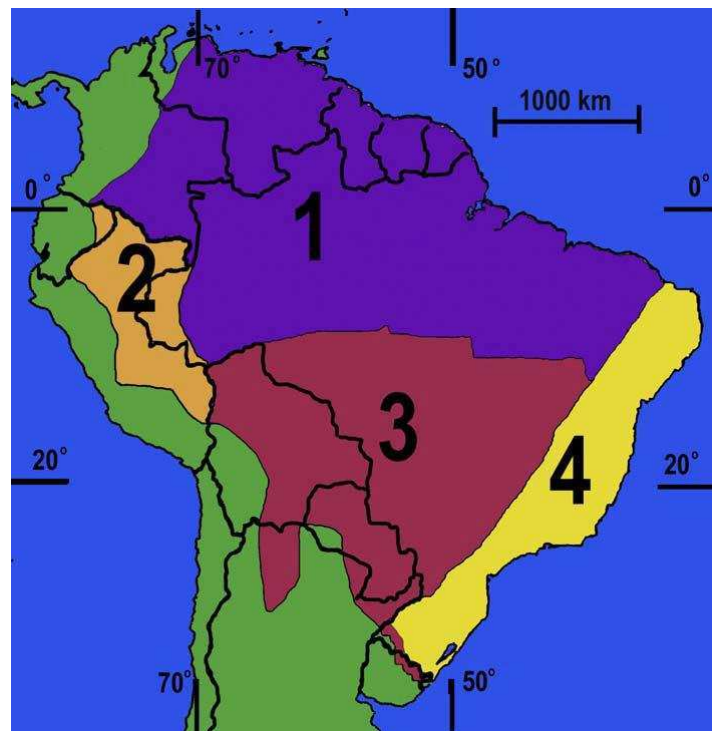
### *Cromosomas Sexuales*

En ejemplares representativos de la distribución Argentina, no se obtuvieron resultados coincidentes respecto a la morfología de los cromosomas sexuales con los publicados para esta especie por Pereira et al. (2004). Según nuestros estudios el cromosoma X es submetacéntrico, mientras que Pereira et al. (2004) lo definen como metacéntrico mediano. Tampoco coinciden nuestros estudios con la morfología mostrada por ellos para el cromosoma Y. Utilizando los sistemas de bandas y a través de inmunodetección de espermatozoides en paquitene quedó claramente demostrado que el cromosoma Y es de morfología submetacéntrica a diferencia de la forma acrocéntrica publicada por Pereira et al. (2004)

#### **5.1.2. *Tamandua tetradactyla***

La caracterización del cariotipo de *T. tetradactyla* con los diferentes tipos de bandeos es de importancia ya que la variabilidad de color de pelaje en esta especie ha conducido a un gran número de especies nominales no válidas y descripciones subespecíficas; en gran medida basados en la distribución del color negro en el cuerpo de esta especie. Turner (1853) describe a *Tamandua longicaudata* refiriéndose a la variante totalmente amarillenta que carecen del “chaleco” negro en el pelaje; también fueron descritas *T. nigra* (Geoffroy 1803) y *T. quichua* (Lönnerberg 1942) referidas a las variantes que poseían pelaje totalmente negro. Recientemente Gardner et al. en el 2007

reconocen cuatro subespecies; *Tamandua tetradactyla tetradactyla* (Linnaeus 1758; este y sur de Brasil), *Tamandua tetradactyla nigra* (Geoffroy 1803; norte de Brasil, Colombia, Venezuela, Trinidad, y las Guayanas), *Tamandua tetradactyla quichua* (Thomas 1911; Perú, Ecuador y extremo oeste de Brasil) y *Tamandua tetradactyla straminea* (Cope 1889; Sur de Brasil, Paraguay, Bolivia y Argentina (Fig. 42).



**Figura 42:** Distribución geográfica de las cuatro subespecies de *T. tetradactyla* Subespecies: 1, *T. t nigra*; 2, *T. t. quichua*; 3, *T. t. straminea*; y 4, *T. t. tetradactyla*. Mapa modificado de Gardner (2007) (Hayssen 2011).

Además los datos citogenéticos han sido fundamentales en la descripción de la sistemática de los osos Meleros. Antes de 1975, fueron reconocidas dos especies de oso melero: *T. tetradactyla* y *T. longicaudata*. A través del análisis citogenético de estas dos “especies”, se demostró que ambas poseían idénticos números diploides ( $2n = 54$ , Hsu et al. 1965; Jorge et al. 1977). Estos resultados apoyan los datos sobre la distribución geográfica y la morfología obtenidos por Wetzel (1975) que analizando caracteres



craneanos determinó que *T. tetradactyla* e *T. longicaudata* eran una sola especie agrupándolas en *T. tetradactyla*.

En 1969, Hsu y Benirschke describieron por primera vez el cariotipo de un ejemplar macho *T. tetradactyla*, proveniente de Chiapas, México con un número diploide de  $2n = 54$ . Sin embargo, en 1975 Wetzell divide a *T. tetradactyla* en dos especies: *T. tetradactyla* ampliamente distribuida en América del Sur, y *T. mexicana* desde el centro de México hasta la parte norte de América del Sur. Así, el individuo descrito por Hsu y Benirschke (1969) fue en realidad *T. mexicana*. En el año 2004 Pereira et al. identifican un nuevo cariotipo en el género *tamandua* con un  $2n = 56$  sugiriendo una nueva especie que presenta una distribución específica referida a “La Mata Atlántica” (Bioma distribuido entre Brasil, Paraguay y Argentina). Nuestros resultados son coincidentes en el  $2n=54$  con los estudios previos (Hsu y Benirschke, 1969; Jorge et al. 1977) para *Tamandua tetradactyla* pudiendo aclarar además por sistemas de bandeos y respetando la convención de Denver (1960), el ordenamiento de los elementos criteriosamente. Además nuestros estudios realizados en ejemplares de diferentes zonas representativas de la distribución Argentina muestran una uniformidad propia del cariotipo de *T. tetradactyla* tanto en regiones correspondientes al “Chaco Argentino” como en ejemplares provenientes de la “Mata Atlántica” argentina. En este punto no podemos revalidar los estudios previos obtenidos por Pereira et al. (2004). Los autores sólo muestran las figuras correspondiente al cariotipo sin sistemas de bandeos y con un  $n$  muy bajo ( $n=1$ ) lo que hace más difícil poder interpretar si este ejemplar con un  $2n=56$  es parte solamente de un nuevo cariograma de una nueva especie o si son realmente dos razas cariotípicas.

El cromosoma X, presentado por Pereira et al. (2004), es un elemento metacéntrico grande y no corresponde al X descrito por nosotros, para *T. tetradactyla* de morfología submetacéntrica y que se encuentra entre los elementos medianos del cariotipo ( $5,89 \pm 0,66\%$ ). Jorge et al. (1977) en una hembra de *T. tetradactyla*, también describen erróneamente el par sexual, tal como en el trabajo de Pereira et al. (2004). 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, 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 anteriores. El cromosoma 2 estudiado por nosotros, muestra el mismo patrón de bandas C que el X descrito por Jorge et al. (1977). Además Pereira et al. (2004) describen un cromosoma sexual Y correspondiente a un elemento acrocéntrico, y que tampoco corresponde al cromosoma Y descrito por nosotros de morfología submetacéntrico (dentro de los de menor tamaño para la especie  $2,53 \pm 0,39$ ). Esta morfología de los cromosomas sexuales definida por nosotros coincide con la descrita primariamente por Hsu et al. (1965).

Asimismo, la morfología que observamos para los cromosomas sexuales es afín con la misma morfología de los cromosomas sexuales obtenidos para *M. tridactya* tanto en el cariotipo mitótico como la de los complejos sinaptonémicos. Además, las descripciones de los cromosomas sexuales para la especie *T. tetradactyla* (Jorge et al. 1977; Hsu y Benirshke 1965) muestran ser coincidentes con nuestras descripciones, al igual que para *Cyclopes didactylus* (Jorge 2000) (la especie mas cercana). De esta manera, podemos afirmar que los cromosomas sexuales de *T. tetradactyla* y *M.*

*tridactylas* son característicos y conservados para Myrmecophagidae, y también para Vermilingua.

### **5.1.3 Homeologías cromosómicas entre *M. tridactyla* y *T. tetradactyla***

El cariotipo con bandas G realizado nos permitió analizar los cromosomas para poder homologar los pares cromosómicos, detectar reordenamientos cromosómicos, y realizar las homeologías de los cromosomas entre *M. tridactyla* y *T. tetradactyla*. Se pudo corroborar varias homeologías cromosómicas, identificando reordenamientos cromosómicos caracterizados por fusiones que no habían sido detectadas en la literatura (Hsu 1965; Jorge 1977; Pereira et al. 2004). Sin embargo, no hemos podido detectar y de esta manera poder aclarar, si hubo eventos de reordenamientos como translocaciones o deleciones entre las especies. Además, mediante el Bando G no se pudo esclarecer cómo son las homeologías en los pares cromosómicos de menor tamaño, por lo que sería importante poder desarrollar otros tipos de técnicas, como por ejemplo son la hibridación in situ, y de esta manera corroborar que otros tipos de eventos pueden haber sucedido en la especiación citogenética entre especies de los generos *Tamandua* y *Myrmecophaga*.

Es sabido que el patrón de bandas C de los respectivos cromosomas puede variar entre homólogos dentro de un individuo, así como entre individuos (Verma y Babu 1989). Esta variación es comúnmente conocida como polimorfismos de bandas C. Sin embargo, para los ejemplares de *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* estudiados se encontró un patrón de BC igual, tanto dentro como entre los individuos estudiados. Se sabe que la

variación de tamaños de las bandas C es continua pero no discreta, y que estas pueden clasificarse en 5 categorías, nivel 1 a nivel 5 (muy pequeñas, pequeñas, intermedias, grandes y muy grandes) (París conference 1971). A base de esta clasificación se podría decir que *M. tridactyla* presenta en la mayoría de pares cromosómicos un patrón de bandas-C de tamaño pequeño a intermedio. En *T. tetradactyla* se evidenciaron regiones grandes repetitivas de heterocromatina centromérica en 6 pares cromosómicos (2, 3, 6, 13, 16, 18) donde se pudieron apreciar homeologías correspondientes a fusiones con *M. tridactyla* correspondiente a fusiones. Las bandas C también pueden ser heteromórficas en su posición en relación a la constricción primaria de esta modo pueden ser clasificadas también en 5 niveles (sin inversión, SI; con inversión parcial menor, IPM; con inversión media, IM; con inversión parcial mayor y con inversión completa, IC) (Verma et al. 1979). Así en *M. tridactyla* solamente en dos pares de cromosomas (1, 9) se presentaron bandas C teloméricas, mientras que en *T. tetradactyla* sucedió en 5 pares (2, 11, 14, 17, 20) que presentaron bandas teloméricas e intersticiales.

Se conoce que, desde las plantas a los mamíferos los cariotipos más ancestrales dentro del clado están constituidos esencialmente por mayor cantidad de elementos acrocéntricos (Benazzi 1973). Nuestros resultados cariológicos soportarían que las especies del género *Tamandua* serían las más derivadas dentro de los vermilinguas, siendo un aporte esencial a los estudios fragmentarios e incompletos de estas especies. Estos posibilitarán proponer relaciones filogenéticas, y patrones de evolución intra-inter específica, genérica y superiores en Xenarthra.

## 5.2 Reproducción

### 5.2.1. Tracto reproductor de las hembras

El análisis de las características anatómicas e histológicas del tracto genital femenino del oso melero mostraron diferencias importantes con respecto a otras especies de Xenarthra.

Los ovarios son de forma ovoide y presentan una organización típica, como en la mayoría de los mamíferos con médula central y corteza externa (Weichert 1967; Kluge 1977; McDonald 1989). Además se observó presencia de folículos ováricos con un único ovocito, en todos los casos. Esto contrasta con las descripciones morfológicas de otras especies de xenartros como son los armadillos *Chaetophractus vellerosus*, *Chaetophractus villosus*, *Zaedyus pichiy*, *Tolypeutes matacus*, *Cabassous chacoensis*, y *Chlamyphorus truncatus*, que poseen una polarización longitudinal de la corteza y la médula en el ovario; y presencia de folículos que contienen grupos de ovocitos (Cética et al. 2005).

El útero tiene forma de pera y se clasifica como simple, esta característica también fue observada en el oso hormiguero (*M. tridactyla*) por Schauerte (2005). De apariencia es groseramente similar al útero derivado de primates en lugar del tipo bicorne más primitivo. Este tipo de útero (útero simple) también ha sido descrito en algunas especies de armadillos como *Dasypus novemcinctus*, *Dasypus hybridus*, *Tolypeutes matacus*, y *Tolypeutes tricinctus* (Enders y Buchanan 1959; Galbreath 1985; Cética et al. 2005). Esto difiere del típico útero bicorne encontrado en *Ch. vellerosus*, *Ch. villosus*, *Z.*

*pichiy*, *Ch. chacoensis* y *Ch. truncatus* (Cética et al. 2005), y del útero unicorno descrito en Bradypodidae y Megalonychidae (Benirschke y Powell 1985).

El canal úterovaginal es una cavidad distensible cubierta por un epitelio columnar alto. Debido a la naturaleza de su epitelio, esta estructura puede ser también llamada cuello uterino. Sin embargo, se prefiere usar el término canal úterovaginal porque no observamos un segmento anatómico en el cuerpo uterino que actúe como restricción a la expansión, que puede servir adecuadamente como un cuello uterino. Teniendo en cuenta esta observación, y el hecho de que esta estructura está limitada en su extremo caudal por un tabique que se asemeja a un himen, se sugiere que este tubo es la zona donde se esperaría anatómicamente la presencia de una vagina. En esta especie, *T. tetradactyla*, el cuello del útero no está bien desarrollado, y el epitelio vaginal no se estratifica como ocurre en la mayoría de los mamíferos (McDonald y Pineda 1989). Esta estratificación probablemente protegería a la vagina durante la penetración. Esto no parece suceder en *T. tetradactyla* debido a la naturaleza del epitelio y al hecho de que el “himen” estaba intacto en todas las muestras estudiadas.

### **5.2.2. Tracto reproductor de machos**

En esta tesis doctoral, se describe por primera vez, la morfología completa del tracto reproductor del oso melero, además de la estructura fina de la espermatogénesis de *T. tetradactyla*. Nuestros estudios histomorfológicos permiten el correcto reconocimiento de las glándulas accesorias y una descripción detallada de la estructura del pene y la genitalia del oso melero.

El oso melero, *T. tetradactyla*, no presenta como en varias especies de mamíferos diferencias de tamaño corporal o de pelaje, que permita distinguir un patrón de dimorfismo sexual característico (Ralls 1977; Wiig y Andersen 1986; Ventura et al. 2002). También es difícil diferenciarlos por sus genitales debido a la presencia de testículos internos, un perineo inexistente y poco desarrollo del pene de esta especie. En este aspecto, aquí se establece la presencia de un orificio uretral exclusivo en machos, sobre la punta del pene, distinguible del orificio vulvar en hembras constituyendo así un importante aporte para lograr la correcta identificación del sexo de esta especie para el ojo inexperto. El pene poco desarrollado coincide con descripciones de especies emparentadas como los osos hormigueros (Bartmann et al. 1991) y perezosos (Dos Santos Martins 2003). A través del análisis histológico de los tractos reproductivos y de las estructuras eréctiles descritas, podríamos inferir y comprender el tipo de cópula en esta especie. La disposición de estructuras eréctiles, cuerpo cavernoso y cuerpo esponjoso, dentro del pene puede variar según la especie. Por ejemplo, en la nutria (Stanley y Hillemann, 1960) y en el marsupial *Philander oposum* (Ribeiro y Nogueira) el cuerpo esponjoso y la uretra se ubican dorsalmente mientras que el cuerpo cavernoso se ubica ventralmente dentro del pene. El cuerpo cavernoso en el oso melero forma una unidad de mayor tamaño del lado proximal y se extiende lateralmente cubriendo parcialmente la parte ventral de la uretra mientras que el cuerpo esponjoso está pobremente desarrollado. La estrecha disposición del cuerpo esponjoso y de la uretra sugiere una funcionalidad de protección de la uretra y el mantenimiento de la luz de esta durante la intromisión del pene en la cópula. El tejido eréctil del pene, específicamente las células del músculo liso, desempeña un papel clave en el proceso eréctil (Dean y Lue 2005): Sin embargo el poco desarrollo del tejido muscular liso en las estructuras eréctiles del pene de esta especie podría estar indicando que el pene no aumentaría

mucho su tamaño durante la copula. Además, Según Wrobel y Bergmann (2006), basado en el predominio de tejido eréctil en el tejido conectivo y viceversa, los penes se pueden clasificar en tres tipos a saber: el tipo vascular, donde predominan las cavernas, el tipo fibroelástico, donde el tejido conectivo prevalece, y el tipo intermedio, que está entre los dos tipos anteriores. El pene del oso melero sería considerado del tipo "fibroelástico" ya que en corte transversal se puede observar el gran desarrollo de tejido conectivo denso ocupando la mayor parte de la sección del órgano. Este gran desarrollo de tejido conectivo denso también estaría limitando al proceso de erección. Todos estos datos histomorfológicos indicarían que durante la cópula en esta especie la intromisión del pene en el canal útero-vaginal de la hembra sería reducida en recorido. Nuestra hipótesis coincidiría con las conjeturas realizadas por Bartmann et al. (1991) en el oso hormiguero (*M. tridactyla*). Sin embargo, debemos destacar que la longitud exacta del pene erecto sólo puede ser demostrada en animales vivos o mediante electro estimulación. Por todo lo expuesto nuevos estudios serían necesarios para aclarar la estrategia exacta de transferencia de gametos de un individuo a otro en esta especie.

De nuestros resultados es apreciable una variación de tamaño en genitales de los machos durante ciertas épocas del año, esta característica también fue observada por Graseé (1955) (resto reproductiva), lo que hace más difícil distinguir los sexos en estos animales. Este fenómeno ha sido reportado en ambas especies de Myrmecophagidae (osos hormigueros y osos meleros) (Da Silveira 1968).

En *Xenarthra*, la estructura fina de las células del epitelio seminífero ha sido señalada sólo para el armadillo *Dasypus novemcintus* (Edmonds y Nagy 1973; Weaker 1977), y por nosotros en el armadillo *Ch. villosus* (Luaces et al. 2012). Siendo esta la primera descripción de las células del epitelio seminífero, con microscopía electrónica,



en una especie de Pilosa (*T. tetradactyla*). Las espermatogonias encontradas son similares a las espermatogonias B descritas por Weaker (1977), y las células de Sertoli presentan aspecto típico con profundas hendiduras nucleares. Se derivan de este trabajo aspectos generales del proceso de la espermatogénesis ya que se establecen las etapas típicas del desarrollo de las espermátidas a partir de la condensación de la cromatina y de la forma del núcleo. Era necesario enfrentar la descripción de la configuración normal del epitelio seminífero con la que se encuentra en algunos individuos con espermatogénesis incompleta. Las evaginaciones de la lámina basal que apuntan hacia los núcleos de las células de Sertoli se describe sólo en condiciones patológicas en seres humanos (Haider et al. 1986).

La forma de la cabeza de los espermatozoides coinciden con las descripciones previas realizadas por Hay et al. (1994) para la especie; sin embargo, la longitud de la cola de los espermatozoides fue significativamente menor en nuestro estudio. El largo total de los espermatozoides ( $67,00 \pm 1,60 \mu\text{m}$ ) fue similar a la media de los espermatozoides de muchos euterios ( $69,23 \pm 4,13 \mu\text{m}$ ) (Roldan et al, 1992), y, alejado de la media para los roedores ( $101,00 \pm 3,17 \mu\text{m}$ ) excepcionalmente largos (Roldan et al, 1992). Basamos nuestros resultados sobre varias medidas de espermatozoides maduros y bien conservados de dos individuos. Además, se dan imágenes para respaldar estos datos. Por lo que consideramos que el tamaño del gameto masculino que medimos es el correcto, al menos para los ejemplares de esta latitud. La morfología de los espermatozoides de *T. tetradactyla* es similar a la encontrada en el perezoso *Bradypus tridactylus*, sin embargo el tamaño del espermatozoide de esta especie considerablemente menor ( $33,2 \pm 0,75 \mu\text{m}$ ; Peres et al. 2008) al de los gametos de la mayoría de mamíferos incluyendo los Xenarthra (Roldan et al. 1992). En comparación

con otros xenartros, como los armadillos, la forma y el tamaño de los espermatozoides fueron similares a los de las especies filogenéticamente basales (género *Dasypus*; Cética et al 1998; Moller-Krull et al. 2007), siendo diferente de las especies más derivados (*Priodontes maximus*, *Cabassous unicinctus*, *Chaetrophractus vellerosus*, *Chaetrophractus villosus*, *Zaedyus pichiy*, *Euphractus sexcinctus*; Cética et al 1998, Moller-Krull et al. 2007), que presentan cabezas de espermatozoides extremadamente delgadas, grandes y en forma de cuchara (Cética et al., 1998).

### **5.2.1. Ciclo hormonal de las hembras**

La duración del ciclo estral basado en el intervalo entre picos séricos de estrógenos y progesterona por nosotros obtenidos fue de aproximadamente 25 días para *M. tridactyla*, estos resultados difieren de los publicados por Patzl et al. (1998) los cuales fueron alrededor de los 50 días y 40 días en hembras de *Tamandua* (Hay et al. 1994; Kusuda 2010). Sería importante lograr un mayor seguimiento de nuevos ejemplares para confirmar estos resultados y poder ver si es debido a algún factor relacionado con el cautiverio, u otros factores ambientales (como latitudes, fotoperíodo, etc.). A pesar de esta diferencia de duración queda verificado también por nosotros que las hembras de estas especies son poliéstricas anuales.

# **Conclusiones**

## 6. Conclusiones

### Conclusiones de citogenética

- La especiación en Myrmecophagidae es cariotípica
- *Myrmecophaga trydactyla* presenta un cariotipo más ancestral indicando que la evolución ocurrió en sentido *M. tridactyla* a *T. tetradactyla*
- *Myrmecophaga tridactyla* evidenció dos formas cariotípicas, posible causa de aislamiento reproductivo a tenerse en cuenta en planes de conservación

### Conclusiones de la biología de la reproducción

- El tracto reproductor de la hembra de *Tamandua tetradactyla* presenta características arcaicas compartidas con otras especies de Xenarthra.
- La ausencia de una vagina impide realizar estudios de los ciclos por métodos exfoliativos.
- La técnica de cuantificación de hormonas en materia fecal resultó una metodología no invasiva eficaz para medición de ciclos.
- Los machos de *Tamandua tetradactyla* presentan periodos de celo evidenciados por inhibición testicular.
- Existe una correlación entre la forma del espermatozoide y la morfología del tracto femenino en *Tamandua tetradactyla*, coincidente con *Dasypus hybridus*.

# **Bibliografía**

## 7. Bibliografía

- 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 Ciencia 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
- Aguiar JM y Fonseca GAB (2008) Conservation status of the Xenarthra. Pp. 215–231 in: *The Biology of the Xenarthra* (S. F. Vizcaíno & W. J. Loughry, eds.). University Press of Florida, Gainesville.
- Ameghino F (1908) Las formaciones sedimentarias de la región litoral de Mar del Plata y Chapadmalal. *Anales Museo Nacional de Buenos Aires, Serie 3a, X*, 843-428.
- Ameghino F (1908) Las formaciones sedimentarias de la región litoral de Mar del Plata y Chapadmalán. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural* 10: 343-428.
- 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
- 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 (*Dasybus novemcinctus*) captured in an endemic área of paracoccidioidomycosis. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58:12-505

- Barros M, Sampaio I, Schneider H (2003) Phylogenetic analysis of 16S Mitochondrial DNA data in sloths and anteaters. *Genet Mol Biol* 26: 5–11.
- Barroso CML, Seunánez H (1991) Chromosome studies on *Dasypus*, *Euphractus* and *cabassous* genera (Edentata: Dasypodidae). *Cytobios* 68:179-196
- Bartmann C, Beyer C, and Wissdorf H (1991) Topography of the organs pelvic cavity and histologic finding of the sex organs of a male giant anteater (*Myrmecophagatridentata*) with regard to fertility. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 104, 41–46
- Benazzi M (1973) Cytotaxonomy and Evolution: General Remarks. En: Chiarelli AB and Capanna E (eds) *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press. London NewYork. pp 3-14.
- Benirschke K, Low RJ, Ferm VH (1969) Cytogenetic studies of some armadillos. En: Benirschke K (ed) *Comparative mammalian cytogenetics*. Springer-Verlag, New York, pp 330-45
- Benirschke K, Powell HC (1985) On the placentation of sloths. In: Montgomery GG, editor. *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths, and Vermilinguas*. Washington: Smithsonian Institution. p 237–241.
- Bergqvist LP, Abrantes ÉAL, Avilla LS (2004) The Xenarthra (Mammalia) of São José de Itaboraí Basin (upper Paleocene, Itaboraian), Rio de Janeiro, Brazil. *Geodiversitas* 26: 323–337.
- 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

- Bianchi NO, Merani MS, Lizarralde M (1979) Cytogenetics of South American akodont rodents (Cricetidae). VI Polymorphism in *Akodon dolores* (Thomas). *Genetica* 50: 99-104.
- Bloch A, Sigelmann OB, Kapeller PJ, Alves N, Hazan IE, Filho MM, Niskier A, Ghivelder Z, Martins L, Moojen J, Welman D y Reis J (1976) Os desdentados. In: Os animais, v. 3, Bloch ed., Rio de Janeiro, 1220p.
- Boveri TH (1904) Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Fisher, Jena.
- Byrne PS (1962) Giant anteaters born in Zoo. *J. British Guiana Mus. Zoo Roy. Agric. Commerc. Soc.*, 36:28-29.
- Canadian Council on Animal Care, Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA (1993) Guide to the Care and Use of Experimental Animals, Volume 1, 2nd Edition. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada.
- Carlini AA y Scillato-Yané GJ (1996) Un Euphractini (Mammalia, Dasypodidae) del Pliceno de Chapadmalal (Buenos Aires, Argentina): consideraciones filogenéticas sobre los Euphractini. *Revista del Museo de La Plata (Argentina)* 9: 225-238.
- Carlini AA y Scillato-Yané GJ (2004) The oldest Megalonychidae (Xenarthra: Tardigrada); phylogenetic relationships and an emended diagnosis of the family. *Neues Jahrbuch Fur Geologie und Palaontologie-Abhandlungen*; Lugar: Stuttgart vol. 233 p. 423 – 443.
- Carr DH, Walker JE (1961) Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes. *Stain technology* 36:233-236.
- Cética P, Aldana Marcos HJ, Merani MS (2005) Morphology of female genital tracts in Dasypodidae (Xenarthra, Mammalia), a comparative survey. *Zoomorphology* 124(2):57-65.



- Cética 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.
- Chebez JC (2009) *Otros que se van*. 552 pp.. Edit. Albatros, Bs. As.
- Chebez JC (1994) *Los Que Se Van: Especies Argentinas En Peligro*. Editorial Albatros, 604 pp., Buenos Aires.
- Claussen U, Michela S, Mühlig P, Westermann M, Grummt U, 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.
- Convención de Denver (1960) A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet* 1:1063–1065.
- Cope ED (1889) The Edentata of North America. *The American Naturalist* 23:657-664.
- Corin-Frederic J (1969) Les formules gonosomiques dites aberrantes chez les mammifères Eutheriens. *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*. Baudouin, Paris.
- 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.

- Dean RC, and Lue TF (2005) Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. *Urol. Clin. North Am.* 32(4), 379–395.
- 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, Scally M, Stanhope MJ, de Jong WW, Catzefelis FM (2002) Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of characters and taxon sampling on the placental tree rooting. *Mol Biol Evol* 19: 1656-1671.
- 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.
- Delsuc F, Douzery EJ (2008) Recent advances and future prospects in xenarthran molecular phylogenetics, in Vizcaíno SF, Loughry WJ (eds): *The Biology of the Xenarthra*, pp 11–23 (University Press of Florida, Gainesville 2008).
- Delsuc F, Douzery EJ (2009) Armadillos, anteaters and sloths (Xenarthra), in Hedges SB, Kumar S (eds): *The Timetree of Life*, pp 475–478 (Oxford University Press, Oxford).

- Delsuc F, Superina M, Tilak M, Douzery EJ, Hassanin A (2011) Molecular phylogenetics unveils the ancient evolutionary origins of the enigmatic fairy armadillos. *Mol Phylogenet Evol* 62: 673-680.
- Díaz MM y Barquez RM (2002) *Los Mamíferos de Jujuy, Argentina*. L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina.
- Díaz GB y Ojeda RA (2000) *Libro Rojo de los mamíferos Amenazados de la Argentina*. 2000. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, SAREM.
- Díaz GB y Ojeda RA (2012) *Libro Rojo de los mamíferos Amenazados de la Argentina*. 2012. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, SAREM.
- 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-Smit MA and Robinson TJ (2005) Low rate of genomic repatterning in Xenarthra inferred from chromosome painting data. *Chromosome Research*. 13(7):651-663.
- Dos Santos Martins D (2003) *Morfología do sistema reprodutor masculino da preguicida de coleira (*Bradypus torquatus*, Illiger, 1811)*. Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Edmonds RH and Nagy F (1973) Crystalloid inclusion bodies in the epididymis of the Nine-banded Armadillo, *Journal of Ultrastructure Research* 42: 82-6.
- Eisenberg JF (1989) *Mammals of the Neotropics*. Volume 1. The Northern Neotropics. University of Chicago Press, USA.
- Enders AC, Buchanan JW (1959) Reproductive tract of the female nine-banded armadillo. *Texas Rep Bio Med* 17:323-340.

- 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.
- Fernández M (1909) Beiträge zur Embriologie der Gürteltiere. Zur Keimblü inversion und spezifischen Polyembrionie der Mulita (*Tatusia hybrida* Desm). Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch 39:302-333.
- Fonseca GAB y Aguiar JM (2004) The 2004 Edentate Species Assessment Workshop. *Edentata* 6: 1–26.
- 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.
- García HF (2001) Evolución cromosómica en Simiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- 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
- Gardner AL (2008) Magnaorder Xenarthra, En Gardner AL (ed): Mammals of South America, Vol 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats, pp 127–176 (The University of Chicago Press, Chicago 2008).
- 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 Biewener AA (1992) The functional morphology of xenarthrous vertebrae in the armadillo *Dasyus novemcinctus* (Mammalia, Xenarthra). *Journal of Morphology*. 214: 63-81.
- 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.
- Geoffroy St-Hilaire É (1803) *Catalogue des Mammifères du Muséum National d'Histoire Naturelle -Paris*.
- 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.
- Goin FJ, Davis M (1999) Comentario: Resultados del Primer Taller sobre Conservación ex-situ de Mamíferos del Cono Sur Sudamericano (La Plata, 19-21 de Mayo de 1999) *MASTOZOLOGIA NEOTROPICAL*; Año: 2001 vol. 8 p. 85 – 87.

- 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.
- Gropp A y Winking H (1981) Robertsonian translocations: Cytology, meiosis,  
 segregation patterns and biological consequences of heterozygosity. Symp zool Soc  
 Lond, 47, 141–181.
- Haider SG, Passia D, Servos G y Hettwer H (1986) Electron microscopic evidence for  
 deep invaginations of the lamina propria towards the seminiferous tubule lumen in a  
 patient with varicocele. Int. J. Androl. 9, 27–37.
- Hardin CJ (1976) Hand rearing a giant anteater *Myrmecophaga tridactyla* at Toledo  
 Zoo. International Zoological Yearbook, 15:199-200.
- Hay MA, Bellem AC, Brown JL y Goodrowe KL (1994) Reproductive Patterns in  
 Tamandua (*Tamandua tetradactyla*). En: Journal of Zoo and Wildlife Medicine  
 25(2). 1994. American Association of Zoo Veterinarians. Pp. 248 - 258. (R: P.J.).
- Hayssen V (2011) *Tamandua tetradactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). Mammalian  
 Species: Volume 43, Issue 1: pp. 64 – 74.
- 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.
- Hsu TC (1965) Chromosomes of two species of anteaters. Mammalian Chromosomes  
 Newsletter 15:108.
- Hsu TC, Arrighi FE, Klevecz RR, Brinkle BR (1965) The Nucleoli in mitotic divisions  
 of mammalian cells in vitro. The Journal of Cell Biology 26: 539-553.
- Hsu TC y Benirschke K (1969) *Tamandua tetradactyla*. An Atlas of Mammalian  
 Chromosomes 3:108.

- Hubálek Z y Rudolf I (2011) Microbial zoonoses and sapronoses. Dordrecht; New York: Springer.
- Jackson RC (1971) The karyotype in systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 2: 327-368.
- Jorge W (1982) Chromosome study in the “Pichiciego Argentino”, *Chlamyphorus truncates 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 y 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. Smithsonian Institution Press, Washington DC pp 121-129
- Jorge W (2000) Mitotic and meiotic chromosome studies in silky anteater *Cyclopes didactylus* (Myrmecophagidae: Xenarthra). Cytobios 101:95-100.
- Julia JP, Richard E y Samaniego J (1994) Nótulas Faunísticas, Nota sobre la distribución geográfica del Oso Melero (*Tamandua tetradactyla*, Xenarthra: Myrmecophagidae) en el Noroeste Argentino. N° 66.
- Jiménez Pérez I (2006) Plan de recuperación del oso hormiguero gigante en los Esteros de Ibera. [http://www.theconservationlandtrust.org/esp\\_arg/main\\_ibera.html](http://www.theconservationlandtrust.org/esp_arg/main_ibera.html). 62 pp
- 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.

- King M (1993) *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press, New York.
- Kluge AG (1977) *Chordate structure and function*. New York: Macmillan Press. p. 628.
- Kriegs JO, Churakov G, Kiefmann M, Jordan U, Brosius J, Schmitz J (2006) Retroposed elements as archives for the evolutionary history of placental mammals. *PLoS Biol* 4:e91.
- Kusuda S, Endoh T, Tanaka H, Adachi I, Doi O y Kimura J (2011) Relationship Between Gonadal Steroid Hormones and Vulvar Bleeding in Southern Tamandua *Tamandua tetradactyla* - *Zoo Biology* 30: p212- 217.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2):201-220.
- Linneaus C (1758) *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Laurentii Salvia, Stockholm.
- Lönnerberg E (1942) Notes on *Xenarthra* from Brazil and Bolivia - *Arkiv. Zool.* Stockholm 39A: p1-58.
- Loughry WJ, Prodhhl CM, Mc Donought JC, and Avise JC (1998) Polyembryony in armadillos: an unusual feature of the female ninebanded armadillo's reproductive tract may explain why her litters consist of four genetically identical offspring. *Am. Sci.* 86, 274–279. doi:10.1511/1998.25.824.
- Luaces JP, Rossi LF, Merico V, Zuccotti M, Redi CA, Solari AJ, Merani MS y Garagna S (2012) “Spermatogenesis Is Seasonal in the Large Hairy Armadillo, *Chaetophractus Villosus* (Dasypodidae, Xenarthra, Mammalia). *Reproduction, Fertility and Development*. <http://dx.doi.org/10.1071/RD12127>.



- Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, DeBry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, de Jong WW y Springer MS (2001) Parallel adaptative radiations in two major clades of placental mammals. *Nature* 409:610-614.
- Massoia E (1980) *Mammalia de Argentina. I. Los mamíferos silvestres de la Provincia de Misiones.* *Acna, iguazu* 1(1):15-43.
- Matthey R (1949) *Les Chromosomes des Vertebres.* Rouge, Lausanne.
- McCusker GJ (1985) Testicular cycles in the common long-nosed armadillo *Dasypus 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.
- McDonald LE, Pineda MH (1989) *Veterinary endocrinology and reproduction.* Philadelphia: Lea & Febiger. p 571.
- McDonough CM (1997) Pairing behavior of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *The American Midland Naturalist* 138:290-298.
- McKenna MC (1975) Toward a phylogenetic classification of the Mammalia. En: W.P. Luckett and P.S. Szalay (eds.) *Phylogeny of the Primates,* Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 21-46.
- McNab 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.
- Medri I, Mourão G y Harada AY (2003) Dieta do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) no Pantanal da Nhecolândia, Brasil. *Edentata* 5: 29-34.
- 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, Capanna y Bianchi NO (1980) Segregation of the polymorphic chromosomes 1 in the testicular meiosis of *Akodon molinae*. Chapter VI. *Cytogenetics of South American akodont rodents*. *The Nucleus* 23: 226-233.
- Merritt DA, Benirschke K (1973) The chromosomes of *Zaedyus pichiy* Ameghino, 1889. *Mammalian Chromosomes Newsletter* 14(3):108-109.
- Merritt DA (1975) The Lesser Anteater *Tamandua tetradactyla* in Captivity - *International Zoo Yearbook* 15: p41-44.
- Merritt DA (2008) Xenarthrans of the Paraguayan Chaco p294-299 in Vizcaino SF, Loughry WJ *The Biology of the Xenarthra* - University Press of Florida.
- Miranda F, Medri IM (2010) *Myrmecophaga tridactyla*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 29 November 2011
- Moller-Krull, M., F. Delsuc, G. Churakov, C. Marker, M. Superina, J. Brosius, E. J. P. Douzery, y J. Schmitz (2007) Retroposed elements and their flanking regions resolve the evolutionary history of xenarthran mammals (armadillos, anteaters, and sloths). *Mol. Biol. Evol.* 24, 2573–2582.
- Montgomery GG (1985a) Impact of Vermilinguas (*Cyclopes*, *Tamandua*: Xenarthra = Edentata) on Arboreal Ant Populations. En: Montgomery GG (ed) *The evolution and*

- ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 351-363.
- Montgomery GG (1985b) Movements, Foraging and Food Habits of the four Extant Species of Neotropical Vermilinguas (Mammalia; Myrmecophagidae). En: Montgomery GG (ed) The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 365-377
- Montgomery GG y Lubin YB (1977) Prey influences on movements of Neotropical anteaters. Pp. 103-131. En: Proceedings of the 1975 Predator Symposium (Philips, R.L.; C. Jonkel, eds.). Montana Forest and Conservation Experiment Station, University of Montana, Missoula, USA.
- Moorhead RS, Howell PC, Mellman WJ, Batteps DB y Hundgerford DA (1960) Chromosomes preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cellular Research*, 2:613-616.
- Moraes-Barros N, Silva JA, Morgante JS (2011) Morphology, molecular phylogeny, and taxonomic inconsistencies in the study of *Bradypus* sloths (Pilosa: Bradypodidae). *J Mamm* 92: 86-100.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA y O'Brien SJ (2001) Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* 406:618-614.
- Neris N, Colman F, Ovelar E, Sukigara N, Ishii N (2002) Guía de Mamíferos Medianos y Grandes del Paraguay: Distribución, Tendencia Poblacional y Utilización - SEAM, Asunción.
- Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Margulies EH (2007) Comparative Sequencing Program, Rougemont J, et al: Early history of mammals is elucidated with the ENCODE multispecies sequencing data. *PLoS Genet* 3:e2.

- Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 5th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Parera A (2002) Los mamíferos de la Argentina y la región austral de América del Sur. Editorial El Ateneo, Buenos Aires.
- Paris conference (1971) Standardization in human cytogenetics. New York: The National Foundation 1972.
- Parker WK (1886) On the structure and development of the skull in the Mammalia. Part II. Edentata, Part III. Insectivora. Philos. Trans. Roy. Soc. 1885, 177, T: 1-275.
- Patterson B y Pascual R (1972) The fossil mammal fauna of South America, p. 247-309. En: Keast A, Erk FC y Glass B (Eds). Evolution, mammals and southern continents. Albany, State University New York Press, 543p.
- 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.
- Patzl M, Schwarzenberger F, Osmani C, Bamberg E y Bargmann W (1998) Monitoring ovarian cycle and pregnancy in a giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) by faecal progesterone and oestrogen analysis. Anim. Reprod. Sci. 53:209-219.
- Pereira HR, Jorge W y Da Costa MELT (2004) Chromosome study of anteaters (Myrmecophagidae, Xenarthra): a preliminary report. Genetics and Molecular Biology 27:391-394.
- Peres MA, Benetti EJ, Milazzotto MP, Visintin JA, Miglino MA, y Assumpção ME, (2008) Collection and evaluation of semen from the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). Tissue Cell 40, 325-331.

- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ y 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.
- Ralls K (1976) Mammals in which females are larger than males. *Quarterly Review of Biology*, vol. 51, no. 2, p. 245-276.
- Reca A, Úbeda C y Grigera D (1996) Prioridades de conservación de los mamíferos de la Argentina. *Mastozoología Neotropical* 3: 87-117.
- 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 southern cone: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay*. University of Chicago Press, Chicago.
- 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.
- 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) Observaciones sobre la termorregulación en *Zaedyus pichiy*. *Acta zoológica Lilloana* 28:13-18.

- 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.
- Roldan ERS, Gomendio M, Vitullo AD (1992) The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: females selection and sperm competition. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 67, 551–593.
- Rose KD, Emry RJ, Gaudin TJ y 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.
- Saez FA, Drets ME, Brum N (1964) Chromosomes of the mulita (*Dasypus hybridus* Desmarest): a mammalian edentate of South America. En: *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: Montgomery GG (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 77-81.
- Sarich VM y Cronin JE (1976) Molecular systematics of the primates. Pp. 141-170 in M. GOODMAN and R. E. TASHIAN, eds. *Molecular anthropology*. Plenum, New York.
- Saussure (1860) *Tamandua Mexicana* Rev. Ma. Zool. Paris, ser. 2, 12:9.
- Svartman M (2012) Chromosome Evolution in Xenarthra: New Insights from an Ancient Group. *Cytogenet Genome Res* 137:130–143

- Seabright M (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-2.
- Searle JB (1983) Robertsonian Chromosomal Variation in the Common Shrew *Sorex araneus* L. Ph.D. Thesis, University of Aberdeen.
- Searle JB (1986) Meiotic studies of Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus* L. *Cytogenet Cell Genet*, 41, 154–162.
- Searle JB (1988). Karyotypic variation and evolution in the common shrew *Sorex araneus*. In Brandham, P. E. (ed.) *Kew Chromosome Conference III*, HMSO, London, pp. 97–107.
- Seymour C (1985) Sloths as hosts of Arboviruses. En: Montgomery GG (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 269-277.
- 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 Montgomery GG (Ed) *The evolution and ecology of armadillos, Sloths, and vermilinguas*, Smithsonian Institution Press, Washington DC pp 379-384.
- Shaw JH, Machado-Neto JC, Carter TS (1987) Behavior of free-living giant anteaters. *Biotropica*, 19(3): 255-259.
- Simpson GG (1945) The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 85:1-350.
- Simpson GG (1980) *Splendid Isolation: The Curious History of South American Mammals* (Yale University Press, New Haven 1980).
- Springer MS, Stanhope MJ, Madsen O, de Jong WW (2004) Molecules consolidate the placental mammal tree. *Trends Ecol Evol* 19: 430-438.

- 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.
- 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](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 29 November 2011.
- Sutton WS (1902) On the Morphology of the Chromosome Group in *Brachystola magna*. *Biological Bulletin* 14:24-39.
- Svartman M (2012) Chromosome Evolution in Xenarthra: New Insights from an Ancient Group. *Cytogenet Genome Res* 137:130-143.
- Talmage RV y Buchanan GD (1954) The armadillo (*Dasypus novemcinctus*). A review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. Rice Institute Pamphlet 41:1-135.
- Thomas O (1887) On the homologies and succession of the teeth in the Dasyuridae, with an attempt to trace the history of the evolution of Mammalian teeth in general. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 1887B: 443-462.
- Thomas O (1911) The Mammals of the Tenth Edition of Linnaeus; An Attempt to Fix the Types of the Genera and the Exact Bases and Localities of the Species - *Proceedings of the Zoological Society of London* 1911: p120-158.



- Torres CN, Godinho HP y Machado ABM (1983). Seasonal variation in spermatogenesis in the nine-banded armadillo from southeastern Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 6, 135–141. doi:10.1016/0378-4320 (83)90018-0.
- Torres R, Monguillot J, Bruno G, Michelutti P, Ponce A (2009) Ampliación del Limite Austral de la Distribución del Oso Melero (*Tamandua tetradactyla*) en la Argentina - *Notulas Faunisticas 2da Serie 39*: p1-5.
- Turner HN Jr (1853) On the Arrangement of the Edentate Mammalia - *Proceedings of Zoological Society of London 1851*: p205-221.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O y Grisard EC (2003) Parity between kinetoplast: DNA and miniexon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 3, 39–45.
- Ventura J, Salazar M, Perez-Hernández R. y López-Fuster MJ (2002) Morphometrics of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in Venezuela. *Journal of Mammalogy*, vol. 83, no. 4, p. 1087-1096.
- Verma RS, Dosik H, Lubs HA (1978) Size and pericentric inversion heteromorphisms of secondary constriction regions (h) of chromosomes 1, 9 and 16 as detected by CBG technique in Caucasians: classification, frequencies and incidence. *Am J Med Genet*, 2: 331-339.
- Verma RS y Babu A (1989) *Human chromosomes*. Pergamon. Estados Unidos.
- Vicq D'Azur MF (1792) *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.
- Weaker FJ (1977) Spermatogonia and the cycle of the seminiferous epithelium in the nine-banded armadillo. *Cell Tissue Res.* 179, 97–109.
- Weichert CK (1967) Reproductive system. En: Mc-Graw Hill, editor. *Elements of chordate anatomy*. New York: Mc-Graw Hill. pp 176–203.
- Wetzel RM (1975) The Species of *Tamandua* Gray (Edentata, Myrmecophagidae)-*Proceedings of Biological Society of Washington* 88: p95-112.
- Wetzel RM, Ávila-Pires FD (1980) Identification and distribution of the recent sloths of Brazil (Edentata). *Rev Bras Biol* 40: 831-836.
- Wetzel RM (1985a) The identification and distribution of recent Xenarthra (=Edentata). En Montgomery GG (ed) *The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilinguas*. Smithsonian Institution Press, Washington DC, pp 5-21.
- 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.
- White MJD (1978) *Modes of Speciation*. San Francisco, California: W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-0284-3.
- Wiig O y Andersen T (1986), Sexual size dimorphism in the skull of Norwegian lynx. *Acta Theriologica*, vol. 31, no. 12, p. 147-155.

Wilson DE y Reeder DM (2005) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press, 2,142 pp.

Wrobel KH, Bergmann M (2006) Male Reproductive System. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. Iowa: Blackwell Publishing, pp. 233–255.

# **Anexos**

## **8. Anexos**

### **8.1. Soluciones:**

#### **8.1.1. Medios 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.

#### **8.1.2. 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).

#### **8.1.3. Suero:**

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

#### **8.1.4. Antibióticos:**

**Fitohemaglutinina (FHA):** 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.

**Penicilina-Estreptomicina:** 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.

#### **8.1.5. Solución Hipotónica:**

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

#### **8.1.6. Fijador:**

Se utilizó fijador Carnoy, compuesto por Metanol (Cicarelli) y Ácido Acético glacial (Cicarelli) en proporción 3:1.

#### **8.1.7. Bandas G con tripsina:**

##### **Solución de Tripsina 0,1%:**

NaCl 0,9% ..... 4,5 mL

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 N ..... | 4,5 mL |
| Tripsina 1% (Difco 1:250).....               | 1 mL   |

Agitación en un Erlenmeyer una hora. Luego filtrar y alicuotar.

pH=7,5

**PBS (sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>):**

|  |         |
|--|---------|
| NaCl .....   | 8,00 gr |
| KCl .....  | 0,20 gr |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhídrido) ..... | 1,15 gr |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....              | 0,20 gr |
| Agua destilada .....                               | 1 lt    |

**Solución de Coloración:**

|   |   |
|---|---|
| Solución A “Buffer” Sorensen .....            | 60 mL                                       |
| Sol A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 4,54 gr/500 mL H <sub>2</sub> O bidestilada |
| Solución B “Buffer” Sorensen .....            | 30 mL                                       |
| Sol B: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 5,94 gr/500 mL H <sub>2</sub> O bidestilada |
| Giemsa .....                                  | 8 - 10 mL                                   |

pH: 6,8

**8.1.8. Bandas C:**

|   |  |
|---|--|
| <b>HCl 0,2N</b> .....                       | 1,6 mL HCl/100 mL H <sub>2</sub> O destilada |
| <b>Solución Ba(OH)<sub>2</sub> 5%</b> ..... | 2,5 gr/50 mL H <sub>2</sub> O bidestilada    |

**Solución 2xSSC:**

|   |          |
|---|----------|
| NaCl .....                              | 17,53 gr |
| Citrato de Na · 2H <sub>2</sub> O ..... | 8,82 gr  |
| H <sub>2</sub> O bidestilada .....      | 1 lt     |

**Solución Giemsa 2% en “Buffer” fosfato Sorensen M/15 (pH:7.1)**

|   |   |
|---|---|
| Solución A “Buffer” Sorensen .....            | 70 mL                                       |
| Sol A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....  | 4,54 gr/500 mL H <sub>2</sub> O bidestilada |
| Solución B “Buffer” Sorensen .....            | 30 mL                                       |
| Sol B: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 5,94 gr/500 mL H <sub>2</sub> O bidestilada |

**8.1.9. Tinción de NOR (nucleolar organizing regions) (Howel and Black, 1980)**

**Solución AgNO<sub>3</sub> 50%**

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| AgNO <sub>3</sub> .....            | 0,25 gr |
| H <sub>2</sub> O bidestilada ..... | 500 µl  |

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%**

|                |        |
|----------------|--------|
| Gelatina ..... | 0,1 gr |
|----------------|--------|



|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O bidestilada ..... | 10 µl |
| Ácido Fórmico 100% .....           | 50 µl |

Disolver en agua 60-70°C en baño térmico. Dejar enfriar y agregar Ác. Fórmico.  
 Guardar en frasco color caramelo.

### 8.1.10. Microextendido de complejo sinaptonémico

**Fijador:** Paraformaldehido (PFA) 1% en agua desionizada (pH 8.5), ajustado con buffer borato + Tritón X-100 (concentración final 0.15%). Duración: 3 Meses.

|   |       |
|---|-------|
| H <sub>2</sub> O destilada.....                     | 6 mL  |
| Paraformaldehido 4% (Se prepara aparte 25 mL) ..... | 2 mL  |
| Tritón 20% (Se prepara aparte 500 µl) .....         | 12 µl |

#### **Buffer de extracción e hipotonía Drying - Down (pH 8.5):**

|   |   |
|---|---|
| Tris-HCL 600 mM .....                                       | 1 mL                                      |
| Tris .....  | 1,453 g/20 mL de solución total           |
| HCl puro (36,5%).....                                       | 40 gotas/10 mL de solución total (pH 8.0) |
| Sacarosa 500 mM .....                                       | 2 mL                                      |
| Citrato de sodio 170 mM .....                               | 2 mL                                      |
| EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 M (pH:8.0) ..... | 0.238 mL                                  |
| EDTA disódico deshidratado .....                            | 186,1 g/700 mL H <sub>2</sub> O           |

Ajustar a pH:8.0 con NaOH 10 M

Llevar a 1 lt con agua y esterilizar por filtrado.

H<sub>2</sub>O destilada ..... 14.56 mL

**Sacarosa 100 mM (pH 8.5, ajustado con buffer borato)**

**Buffer Borato: Borato de Sodio 0,05 M**

**Photoflo 0,4% (Kodak)**

### **8.1.11. Inmunodetección:**

Anticuerpos Primarios:

| <b>Anticuerpos primarios</b> | <b>Origen</b> | <b>Compañía</b>     | <b>Dilución</b> |
|------------------------------|---------------|---------------------|-----------------|
| Anti-MLH1                    | Ratón         | BD-Pharmingen       | 1:300           |
| Anti-SMC3                    | Conejo        | Chemicon, Millipore | 1:1000          |
| Suero CREST                  | Humano        | IFI                 | 1:100           |

Anticuerpos Secundarios:

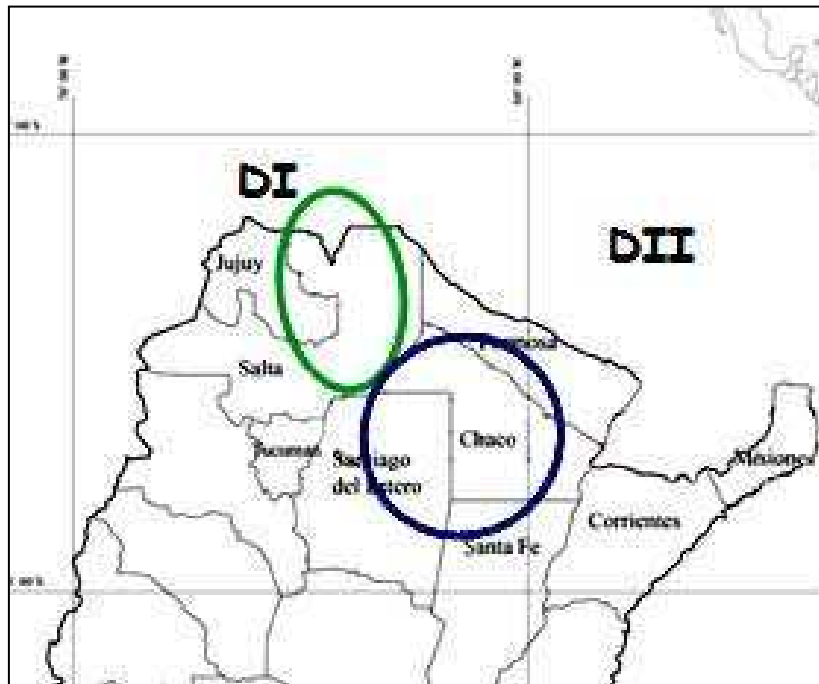
| <b>Anticuerpos secundarios</b> | <b>Fluorocromo</b> | <b>Compañía</b>         | <b>Dilución</b> |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------|
| Cabra anti-conejo              | TRITC              | Jackson Immuno Research | 1:50            |
| Cabra anti-ratón               | FITC               | Jackson Immuno Research | 1:50            |
| Cabra anti-humano              | FITC               | Jackson Immuno Research | 1:50            |

## 8.2. Procedencia de los animales

### *Myrmecophaga tridactyla*

| Sexo | Distrib | Provincia                   | Localidad             | 2n | NF  |
|------|---------|-----------------------------|-----------------------|----|-----|
| ♂    | I       | Jujuy                       | La esperanza          | 60 | 110 |
| ♂    | I       | Salta                       | San Agustin           | 60 | 110 |
| ♂    | I       | Salta                       | San Agustin           | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Las Lajitas           | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | El Mistol             | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Curva del Turco       | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | El Mistol             | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Las Flores            | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | L. Cabral             | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Gral. Guemes          | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Gral. Guemes          | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Santa Bárbara         | 60 | 110 |
| ♀    | I       | Salta                       | Sin datos             | 60 | 110 |
| Sexo | Distrib | Provincia                   | Localidad             | 2n | NF  |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Paraje Monte Rico     | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Santiago del Estero         | Paraje Monte Rico     | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Santiago del Estero         | Paraje Monte Rico     | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Santiago del Estero         | Los Pirpintos         | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Los Pirpintos         | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Dpto. Alverdi         | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Dpto. Alverdi         | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Copo                  | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Copo                  | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Sacha yo              | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Sacha yo              | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Campo Gallo           | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Campo Gallo           | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Santiago del Estero         | Monte Quemado.        | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Santiago del Estero         | Monte Quemado.        | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Santiago del Estero         | Pampa de los Guanacos | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Chaco                       | Roque Saenz Peña      | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Chaco                       | Gral. Pinedo          | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Chaco                       | Pampa del infierno    | 60 | 112 |
| ♂    | II      | (*)Santa Fé                 | Tostado (Lim. c/Sgo.) | 60 | 112 |
| ♀    | II      | (*)Tucuman                  | Horco Molle           | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Resev. "El puma" (Misiones) | Candelaria            | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Reserva Iberá               | La Armonía            | 60 | 112 |
| ♀    | II      | Zoo. Roque Saenz Peña       | Fortín Chajá          | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Zoo. Roque Saenz Peña       | Fortín Chajá          | 60 | 112 |
| ♂    | II      | Zoo. Roque Saenz Peña       | Fortín Chajá          | 60 | 112 |

**Tabla VI:** Procedencia de los especímenes estudiados de *M. tridactyla* con sus respectivas distribuciones según el numero fundamental (NF). (\*) Procedencia Originaria: Santiago del Estero, sin datos exactos.



**Figura 43:** Ubicación de las dos zonas de procedencia de los ejemplares con diferentes NF para la especie *M. tridactyla* en Argentina.

*Tamandua tetradactyla*

| Sexo | Provincia                    | Localidad                 | 2n | NF  |
|------|------------------------------|---------------------------|----|-----|
| ♂    | Salta                        | Palmar                    | 54 | 108 |
| ♀    | Salta                        | Gral. Mosconi, San Martin | 54 | 108 |
| ♀    | Salta                        | Salvador Mazza, Pocitos   | 54 | 108 |
| ♂    | Salta                        | Palmar                    | 54 | 108 |
| ♂    | Salta                        | Gral. Mosconi, San Martin | 54 | 108 |
| ♀    | Salta                        | Salvador Mazza, Pocitos   | 54 | 108 |
| ♀    | Salta                        | Santa Victoria            | 54 | 108 |
| ♀    | Salta                        | Tartagal                  | 54 | 108 |
| ♂    | Corrientes                   | Loma Villanueva           | 54 | 108 |
| ♂    | Corrientes                   | Loma Villanueva           | 54 | 108 |
| ♂    | Santa Fe                     | La Esmeralda              | 54 | 108 |
| ♂    | Santa Fe                     | La Esmeralda              | 54 | 108 |
| ♀    | Chaco                        | Gral. Pinedo              | 54 | 108 |
| ♂    | Misiones                     | Cerro Azul                | 54 | 108 |
| ♀    | Misiones                     | Cerro Azul                | 54 | 108 |
| ♂    | Misiones                     | Cerro Azul                | 54 | 108 |
| ♂    | Zoo. Florencio Varela        | Gral. San Martin          | 54 | 108 |
| ♂    | TMK                          | Corzuela                  | 54 | 108 |
| ♂    | TMK                          | Corzuela                  | 54 | 108 |
| ♀    | TMK                          | Escobar                   | 54 | 108 |
| ♂    | Reserva "El puma" (Misiones) | Candelaria                | 54 | 108 |
| ♂    | Reserva "El puma" (Misiones) | Candelaria                | 54 | 108 |
| ♂    | Salta                        | Inst. Guachipas           | 54 | 108 |
| ♀    | Salta                        | Inst. Guachipas           | 54 | 108 |
| ♂    | Museo de Bs. As.             | La Salada                 | 54 | 108 |
| ♀    | Museo de Bs. As.             | El Ceibo                  | 54 | 108 |
| ♂    | Museo de Bs. As.             | El Retiro                 | 54 | 108 |
| ♀    | Zoo. Roque Sáenz Peña        | La Junta                  | 54 | 108 |
| ♀    | Zoo. Roque Sáenz Peña        | Las Cañitas               | 54 | 108 |

**Tabla VII:** Procedencia de los especímenes estudiados de *T. tetradactyla*.