

ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN PLASMA OF PREGNANT CHAGASIC PATIENTS

María José Sartori, Susana Lin, Ricardo E. Fretes, Lidia Ruiz Moreno, Lía Goldemberg, Sofía P. de Fabro.

IIa. Cátedra de Histología, Embriología y Genética e Instituto de Biología Celular.
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.
Agencia Postal 4, Ciudad Universitaria (5000) Córdoba, Argentina

ABSTRACT

The kinetic properties of plasma placental alkaline phosphatase patients with Chagas' disease were studied. When Cl_2Mg was used as activator the same increase of activity (17-20%) was found in the chagasic and non chagasic groups. The enzyme was not inhibited by F^- ion in any of the groups. No significant differences were detected between the two groups (chagasic and non chagasic) when the enzyme was treated with inhibitors such as EDTA and L-phenylalanine. However, when the CN^- ion was used, the enzyme of the normal pregnant women followed a Michaelian curve, whereas in the chagasic group a sigmoidal plot was observed. Thus, the Hill coefficient was 1.1 for the normal group and over 1.5 for the chagasic.

Key words: Placental alkaline phosphatase - Chagas' disease - pregnancy.

INTRODUCTION

The plasma alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase E.C.3.1.3.1) have been used for diagnosis for the last 60 years (12). They originate from different tissues such as liver, bone and intestine, and all are thermolabile (1, 8).

The human placental alkaline phosphatase is thermostable and maintains its activity after

30 minutes at 56°C. This enzyme appears during the first week of pregnancy and remains in the plasma until several days after delivery (13). The increase of this enzyme is a function of the time of gestation and also an index of the placental activity (7). Messer (11) showed that a decrease in the specific activity of this enzyme is a sign of placental disfunction. Chagas-Mazza disease is endemic in Latin America and affects 20 million people (14).

We have studied the activity of placental alkaline phosphatase (thermostable) from pregnant women affected with Chagas-Mazza disease, to obtain some information on the effect of this pathology on the enzymatic behaviour and, indirectly, upon placental function.

MATERIALS AND METHODS

Blood was obtained from 10 pregnant chagasic women of 25 to 35 years of age and 35 weeks of pregnancy. The fluorescent and Machado Guerreiro test were used to diagnose the Chagas-Mazza disease. Control groups were tested: 20 normal pregnant women, 20 non-pregnant normal women and 10 non-pregnant chagasic ones. Na-citrate was used as anticoagulant. The blood was centrifuges at 2.500 rpm during 40 minutes and the plasma supernatant was kept at 4°C until use.

The specific activity of plasma alkaline phosphatase (total and placental) was assayed

by incubating the samples at 36°C in a medium containing 5 mM Na-nitrophenylphosphate, 100mM Tris-HCl buffer pH 9.00; 2.5mM MgCl₂; 20 mM KCl and 0.5 of plasma in a final volume of 1.5ml. The reaction was stopped by adding 0.2 ml of 50% TCA (trichloroacetic acid) and then centrifuged at 2,500 rpm for 60 minutes. The supernatant was used to determine the p-nitrophenol formed. 1 ml of this supernatant plus 2 ml of 0.5 N NaOH was used to measure the optical density at 420 nm.

For the placental alkaline phosphatase activity determination, the plasma was first heated at 65 °C during 50 minutes.

Several inhibitors and activators were tested: EDTA (1-8 mM); L-phenylalanine (0.5-8 mM); cyanide (2-8 mM); fluoride (0.2-8 mM) and MgCl₂ (100 mM).

The specific activity of the enzyme was expressed as micromoles of p-nitrophenol produced in 1 hour per mg of protein. Protein was measured by the method of Lowry et al. (10).

RESULTS

a) Kinetic constants of placental alkaline phosphatase: Km values with different concentrations of substrate (0.05 to 5.0 mM) were obtained by a Lineweaver and Burk graphic (9). The Km and specific activities showed practically the same values in the chagasic and control groups (Table I).

Table I: Km and specific activity of placental alkaline phosphatase from controls and chagasic pregnant women

pregnant women	umoles p-nitrophenyl mg protein /hr.	km nM
control	0.22 ^a ±0.03 ^b	0.27
chagasic	0.18±0.04	0.30

^a non significant differences of specific activity between chagasics and controls

^b the values are mean ± SEM from three separate experiments

b) Activators and inhibitors of placental alkaline phosphatase: the enzyme activity was not affected by F⁻, it was increased by MgCl₂ and inhibited by EDTA and L-phenylalanine. Although L-phenylalanine inhibited more than EDTA, its effect was similar both in chagasics and in controls. In addition, there were no differences between the two studied groups when Mg²⁺ was used as activator (Table II)

Table II: Effect of activators and inhibitors on the placental alkaline phosphatase activity in plasma

pregnant women	percentage activation ^a			
	Mg Cl ₂	NaF	EDTA	L-phenylalanine
chagasic	20 ^b	0	42	78
non chagasic	17	0	47	82

^a the values are the mean of four separate experiments

^b the results were expressed as percentage of a control tube (without inhibitor or activator)

c) Effect of CN⁻ on placental alkaline phosphatase: when CN⁻ was used at a concentration of 0.05 to 8 mM, the enzyme followed a Michaelian curve in normal pregnant women but showed a sigmoidal plot in chagasic ones (Fig. 1). In the absence of CN⁻ the relative velocity had a value of 1.00; the Hill coefficient was 1.10 for the placental alkaline phosphatase from controls and higher than 1.50 for chagasics (Fig. 1).

d) Effect of CN⁻ on total alkaline phosphatase: the study of total plasma alkaline phosphatase was performed in plasma from pregnant and non-pregnant normal women and from pregnant and non-pregnant chagasic women. Table III shows the effects of CN⁻ in these four groups. The inhibitor had the same

Table III: Inhibition by CN⁻ of alkaline phosphatase in chagasic and non chagasic women

experimental group		n* Values nM
chagasic	pregnant	1.7
	non-pregnant	1.8
non chagasic	pregnant	1.0
	non-pregnant	1.0

n*: Hill coefficient

effect on the enzyme from pregnant and non-pregnant chagasic women and the Hill coefficient was higher than 1.5. The Hill coefficient was lower than 1.5 in normal pregnant and non-pregnant women.

DISCUSSION

The specific activity of plasmatic alkaline phosphatase from patients with Chagas' disease did not show any differences compared to the controls, and its behavior in response to inhibitors and activators such as EDTA, L-phenylalanine, Mg^{2+} and F^{-} (3, 4, 5) compared to healthy controls, were the same. However, CN^{-} inhibited the enzyme from chagasic women producing a sigmoidal plot with a Hill coefficient higher than 1.5, whereas a Michaelian type of curve was found in the normal control group, with a Hill coefficient below 1.5. Although CN^{-} is an inhibitor of the kidney alkaline phosphatase, the inhibition occurs at higher concentrations (0.05-0.008 mol/l) (3) than those used for the placental one (0.002-0.008 mol/l). The effect of CN^{-} on plasmatic alkaline phosphatase from non-pregnant chagasic and healthy women indicates that the enzyme does not modify its behavior during pregnancy. This effect in chagasic patients suggests that placental alkaline phosphatase does not act differently from other isoenzymes when CN^{-} ion is used.

Fernley and Walker (6) postulated the existence of two conformational states of alkaline phosphatase: the E1 form, which combines with the substrate, and the E2 form which reacts to produce inorganic phosphate. Probably these two forms have a different distribution in chagasic and non-chagasic pregnant women. The enzyme's behavior tested in chagasic men in our laboratory supports this possibility.

The polymorphism of the enzyme demonstrated by Beckman (2) would play a role in the different kinetic behavior of the alkaline phosphatase.

RESUMEN

Se analizaron las propiedades cinéticas de la fosfatasa alcalina placentaria proveniente de plasma de pacientes con la enfermedad de Chagas. Cuando se utilizó Cl_2Mg como activador, se encontró el mismo aumento de actividad (17-20%) tanto en embarazadas con la enfermedad de Chagas como en los grupos controles. La enzima no fue inhibida por el ion F^{-} en ninguno de los grupos estudiados. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados (chagásicos y no chagásicos) cuando la enzima fue tratada con inhibidores como EDTA y L-fenilalanina. Sin embargo, cuando el ion CN^{-} fue usado, la fosfatasa alcalina placentaria de embarazadas sin la enfermedad de Chagas presentó una curva Michaeliana, mientras que el grupo de embarazadas chagásicas mostró una curva sigmoidea en su comportamiento. El coeficiente de Hill fue de 1.1 para el grupo control y de 1.5 para el grupo compuesto por embarazadas chagásicas.

Palabras clave: Fosfatasa alcalina placentaria - Enfermedad de Chagas - Embarazo.

REFERENCES

1. Ahmed Z, King E J: Placental phosphatases. *Biochem Biophys Acta* 34: 313-325, 1960.
2. Beckman L, Bjorling G, Christoudoulou C: Pregnancy enzymes and placental polymorphism. I: alkaline phosphatase. *Acta Genet* 16: 59-73, 1966.
3. Carey M J, Butterworth P J: The action of cyanate on human and pig kidney alkaline phosphatases. *Biochem J* 111: 745-748, 1969.
4. Ghosh N K, Fishman W H: On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine I. Kinetic studies. *J Biol Chem* 241: 2516-2522, 1967.
5. Goldemberg A L, Farias R N, Trucco R E J: Allosteric changes of p-nitrophenyl-phosphate from rat erythrocytes in fat deficiency. *Biol Chem* 247: 4299-4304, 1972.
6. Fernley N H, Walker P G: Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphatase

- derivates and the substrate specificity. *Biochem J* 104 (3): 1011-1018, 1967.
7. Fishman W H, Bardawil W A, Habib H G, Antiss C L, Green S: The placental isoenzymes of alkaline phosphatase in sera of normal pregnancy. *Am J Clin Pathol* 57: 65-74, 1972.
 8. Knoll B J, Rothblum K N, Longley M: Two gene duplication events in the evolution of the human heat-stable alkaline phosphatases. *Gene* 60: 267-276, 1987.
 9. Lineaweaver H, Burk D J. In: Lolowick S, P. and Kaplan N. O.: *Methods in enzymology*. Ac. Press. New York. Vol V., 1962. pp 570-575.
 10. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
 11. Messer R E: Heat-stable alkaline phosphatase as an index of placental function. *Am J Obstet Gynecol* 98: 459-465, 1967.
 12. Moss D F: Fetal intestinal alkaline phosphatase in serum and amniotic fluid. *Clin Biochem* 20: 393-398, 1987.
 13. Sussman H H, Bowman M, Lewis J L: Placental alkaline phosphatase in maternal serum during normal and abnormal pregnancy. *Nature* 218: 359-360, 1968.
 14. Tanowitz H B, Kirchhoff I, V, Simon D, Morris S A, Weiss I, M: Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 5 (4): 400-419, 1992.

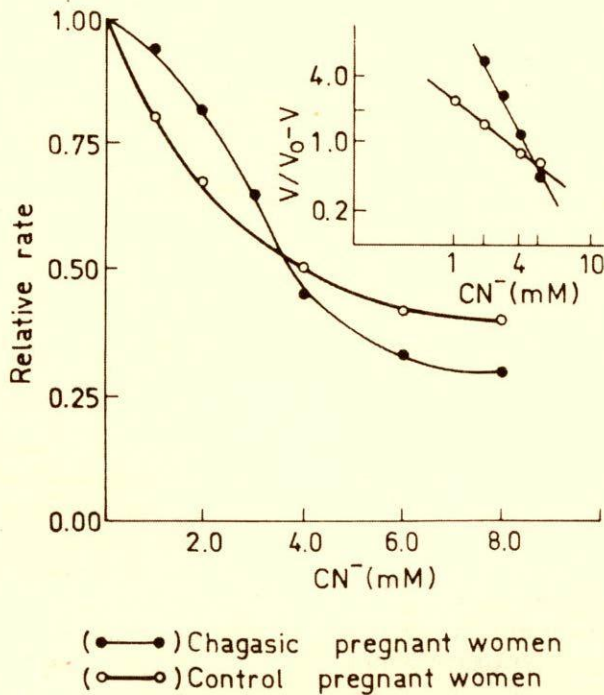


Fig. 1: Effect of CN^- on placental alkaline phosphatase in chagasic and non chagasic women

VARIACIONES ESTACIONALES DEL APARATO REPRODUCTOR HEMBRA DE *Lepus europaeus* (P) EN UNA POBLACION DEL AREA RURAL DE RIO CUARTO (CORDOBA - ARGENTINA)

Jorge P de la Cruz, Pascual G. Dauría, Adriana B. Vivas, Rosa A. Castanigno, Nora Ibañez.

Area de Histología, Departamento de Anatomía, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 km 601, Río Cuarto (5800) Córdoba, Argentina.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el ciclo reproductor de la liebre europea, *Lepus europaeus* P., en hembras de una población del área rural de Río Cuarto, durante un período anual completo. De los animales recogidos mensualmente, se determinó edad, peso corporal y peso de los ovarios. Estos últimos fueron fijados en Bouin y procesados por las técnicas histológicas convencionales. En el período de julio a febrero, el peso medio corporal fue de $3,70 \text{ kg} \pm 0,15$. Los ovarios mostraron folículos en distintos grados de desarrollo, cuerpos lúteos y glándula intersticial. En el útero se determinó la presencia de embriones. En el período de marzo a junio, el peso medio corporal fue de $3,16 \text{ kg} \pm 0,11$. Los ovarios mostraron folículos secundarios, glándula intersticial, cuerpos blancos y ausencia de cuerpos lúteos. De los estudios realizados surge la existencia de dos períodos bien definidos en el ciclo reproductivo: I) Período Reproductivo, que abarca los meses de julio a febrero, y II) Período No Reproductivo, que se extiende de marzo a junio. Los resultados son comparados con los obtenidos por otros autores en otras poblaciones de liebre, especialmente los de la zona sur del país (Bariloche), teniendo en cuenta las características ambientales regionales.

Palabras clave: *Lepus europaeus* P. - aparato reproductor hembra - características histológicas - ciclo anual.

INTRODUCCION

La liebre europea es una especie cosmopolita ampliamente distribuida en Europa, Cercano

Oriente, Medio Oriente, Africa, América del Norte y América del Sur. Se han realizado algunos estudios de características generales para esta especie (3, 4, 5, 6, 9, 11, 13). En Argentina, Amaya y col. (1), Bonino y col. (2), han estudiado ciertas características biológicas de la liebre europea en la región sur del país (Bariloche).

La liebre ha sido considerada plaga nacional y uno de los competidores más importante de los animales domésticos ya que, con ellos, comparte las pasturas naturales y sembradíos. Su influencia negativa en zonas de forestación ha sido señalada por distintos autores (6, 7), siendo la zona estudiada una región agrícola-ganadera por excelencia, resulta de interés conocer la biología reproductiva de la población de liebres hembras que la habita, ya que la misma es un factor determinante en su número y características poblacionales.

MATERIALES Y METODOS

El área estudiada corresponde a un radio de 40 km alrededor de la Ciudad de Río Cuarto (Córdoba).

Se trabajó con ejemplares hembras de *Lepus europaeus* (P), las que fueron cazadas con escopeta y farol buscahuellas, entre las 19 y 24 horas. Las mismas se obtuvieron mensualmente, arazón de 10 (diez) ejemplares por cada muestreo, durante un período anual completo.

La metodología aplicada constó de los siguientes pasos:

1. Determinación del sexo.
2. Determinación de peso corporal completo.
3. Extracción de los globos oculares y peso de los cristalinos (8), a fin de determinar las edades.

4. Extracción de los ovarios. Pesaje ($\pm 0,1$ g), medición de la longitud y ancho con calibre (± 1 mm), sin considerar si correspondía a ovario derecho o izquierdo. Posteriormente, las muestras se fijaron en Bouin y fueron procesadas con la técnica histológica convencional. Los preparados histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su posterior observación.

5. Extracción del útero para determinar la presencia o no de embriones.

Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis estadístico de Varianza de un factor, test de Duncan y test t de diferencias de medias (para muestras independientes). Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0,05$.

Se utilizó el software estadístico STATA.

RESULTADOS

El trabajo se realizó con hembras cuyos pesos del cristalino fue mayor a 235 mg (1,8).

El peso corporal medio anual fue de 4,36 kg $\pm 0,10$ (Tabla I) siendo similar con el hallado en poblaciones del sur del país (1). Los pesos medios corporales mensuales, durante un período anual completo, mostraron oscilaciones entre 3,0 kg y 4,5 kg (Fig. 1), con tendencia a aumentar durante el mes de octubre.

De las observaciones obtenidas a campo, se comprobó que las muestras podían dividirse en 2 grupos: uno representado por casi el total de las hembras capturadas entre los meses de julio-febrero, que mostraron embriones visibles en los cuernos uterinos y/o en su defecto mamas con signos de actividad; y otro caracterizado por no poseer mamas activas ni ejemplares preñados en las muestras obtenidas entre los meses de marzo-junio. De lo expuesto precedentemente, surgen dos períodos bien definidos:

I) Período de Actividad Reproductiva, que abarca los meses de julio a febrero; II) Período No Reproductivo, que se extiende de marzo a junio.

Durante el período reproductivo, el peso corporal medio resultó mayor a la media anual encontrada (Tabla I). Asimismo, el valor medio, tanto del peso como del ancho y longitud de los

Tabla I: Valor del peso corporal medio anual de *Lepus europaeus* (P) hembra durante un ciclo anual completo

Periodo	n ^a	Peso corporal (kg)
Anual	120	# 3,46 \pm 0,10 *
Reproductivo	60	# 3,69 \pm 0,15 *
No Reproductivo	60	# 3,16 \pm 0,11 *

X \pm DS; n^a=n₁, n₁, n₂; *p=0,02.

ovarios, fue significativamente mayor que al hallado en el período no reproductivo (Tabla II).

Los datos anuales de peso, longitud y ancho ovárico se resumen en la Fig. 2.

Tabla II: Valor promedio de: peso, longitud y ancho del ovario de *Lepus europaeus* (P) durante el período reproductivo y no reproductivo.

Variable	Periodo Reproductivo X \pm DS	Periodo No Reproductivo X \pm DS
Peso (g)	2,24 \pm 0,21	1,51 \pm 0,20 **
Longitud (mm)	23,79 \pm 0,62	21,27 \pm 0,88 **
Ancho (mm)	12,41 \pm 0,42	10,78 \pm 0,59 ***

n₁=120, n₁=60, n₂=60; *p=0,05; **p=0,04; ***p=0,01.

En relación al número de cuerpos lúteos por hembra, la media fue de 3,4 \pm 1,43, mientras que el diámetro promedio de dichos cuerpos fue homogéneo en la época reproductiva (7,72 mm \pm 1,66). El número medio de embriones observados fue de 2,7 \pm 1,19, sensiblemente mayor al obtenido por Amaya y col. (1). No se estableció si las pérdidas embrionarias encontradas fueron de preimplantación o postimplantación.

Las observaciones histológicas del ovario, durante este período reproductivo (Fig. 3a y 3b), mostraron una corteza ovárica con presencia de folículos primordiales y en crecimiento (preantrales y antrales); el resto del órgano, sin una médula perfectamente definida, se presentó como una glándula intersticial muy desarrollada, constituida por células poliédricas, con citoplasma vacuolado, núcleo

central de cromatina laxa y nucléolo prominente. Los cuerpos lúteos fueron muy evidentes y formados por células poliédricas con gran acidofilia, circunscriptas a un área bien definida.

En el periodo no reproductivo, el peso corporal medio fue ligeramente menor a la media anual encontrada (Tabla I). Para el mismo periodo, el peso medio de los ovarios fue significativamente menor a los hallados en el periodo reproductivo. Lo mismo aconteció con los valores medios de ancho y de longitud de los ovarios; ambos fueron significativamente menor a los hallados en el periodo reproductivo (Tabla II).

Las observaciones histológicas, en el periodo no reproductivo, (Figs. 3c y 3d), mostraron las siguientes características: corteza ovárica con diferentes tipos de folículos y ausencia de cuerpos lúteos; y una zona medular desarrollada de tejido conectivo vascularizado.

DISCUSION

Las características estacionales del ciclo reproductivo de la liebre son coincidentes con el comportamiento general en distintas partes del mundo (1, 4, 10, 11, 12). La única diferencia radica en la extensión de los periodos del ciclo reproductivo. Asimismo, el hecho de no haber encontrado relación entre el tamaño de los cuerpos lúteos observados y el estadio de preñez, coincide con la hallada en la población de liebres del sur de país (1).

De lo expuesto precedentemente, se diferenciaron dos periodos: I) Periodo Reproductivo, que abarca los meses de julio a febrero y II) Periodo No Reproductivo, que se extiende desde los meses de marzo a junio.

La mayor extensión del periodo reproductivo, un mes anterior y un mes posterior en relación al descripto por Amaya y col. (1) en la región sur del país, como así también el mayor número de crías por camada y la menor pérdida embrionaria puede deberse, aunque no ciertamente determinado, a diversos factores. Se mencionan como tales a la temperatura, fotoperiodo y disponibilidad de alimento (5, 12). Los mismos son más favorables en la región central del país, donde está incluida el área de estudio, mientras que en la región sur,

las temperaturas son más rigurosas y el fotoperiodo más corto. La calidad y cantidad de alimento de la región agrícola (central) con respecto al sur del país, que tienen las características de mallín y estepa, pueden ser otros factores determinantes a tener en cuenta.

ABSTRACT

In this paper, the reproductive cycle of the European hare, *Lepus europaeus*, was studied during a complete annual period in females of a population from the southern region of the province of Córdoba. The animals were captured monthly. Age, corporal and ovarian weights were determined, and the ovaries were fixed in Bouin and processed by current histological techniques. During the period from July to February, the mean corporal weight was 3.70 kg \pm 0.15. The ovaries showed follicles in different developmental stages, corpora lutea and interstitial gland. Embryos were frequently found in the uterus. From March to June, on the other hand, mean corporal weight was 3.16 kg \pm 0.11. The ovaries presented developing follicles, interstitial gland and corpora albicans, and no corpora lutea were found. From these results, it can be seen that the reproductive cycle is composed of two well-defined periods: I) Reproductive period, extending from July to February, and II) Non-reproductive period, from March to June. The results are compared with those obtained by other authors on other hare populations, specially on populations from the southern region of Argentina (Bariloche), taking into account regional environmental characteristics.

Key words: *Lepus europaeus* P. - female reproductive apparatus - histological characteristics - annual cycle.

AGRADECIMIENTO: a la Srta. Graciela Sagripanti por su eficiente colaboración en el desarrollo técnico del trabajo.

REFERENCIAS

1. Amaya J N, Brandani A A, Alsina M G: Ecología de la liebre europea: *Lepus europaeus* (P). En: Serie Ecología y Control de la Fauna Silvestre. Informe Técnico N° 9, Parte 2. INTA Bariloche: 1-36. 1979.
2. Bonino N, Bustos J C: Peso y dimensiones del cuerpo y órganos internos de la liebre europea, *Lepus europaeus* (Lagomorpha, Leporidae) en la Patagonia, Argentina. Iheringia. Ser. Zool., Porto alegre 77: 83-88. 1994.
3. Cabon-Raczynska K: Variability of the Body Weight of *European hares*. Acta Theriol 19: 69-80. 1974.
4. Flux J E C: Timing of the breeding season in the hare, *Lepus europaeus* (P), and rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L). Mammalia 29: 557-562. 1965.
5. Flux J E C: Reproduction and Body Weights of the hare *Lepus europaeus Pallas*, in New Zealand. New Zealand J Sc 10: 357-401. 1967.
6. Godoy J C: Fauna Silvestre. En: Evaluación de los recursos naturales de las Argentina. Primera Etapa VIII. Vol 1 y 2. Consejo Federal de Inversiones. Buenos Aires. 1963.
7. Howard W E: Relationship of wildlife to sheep Husband's in Patagonia, Argentina. En: Informe proyecto FAO-INTA. sobre Producción Ovina en Patagonia. EERA INTA. San Carlos de Bariloche. Río Negro. 1969.
8. Lord R D (JR): The lens as indicator of age in cottontail rabbits. J Wildlife Manage 25: 28-33. 1959.
9. Lloy H G: Observations on breeding in the Brown hare (*Lepus europaeus*) during the first pregnancy of the season. J Zool Lond 156: 521-528. 1968.
10. Martinet L, Legouis J J, Moret B: Quelques observations sur la reproduction du lièvre européen (*Lepus europaeus Pallas*), en captivité. Ann Biol Anim Bioch Biophys 10: 195-202. 1970.
11. Pielowsky Z: Sex ratio and weight of hares in Poland. Acta Theriol 14: 119-131. 1969.
12. Raczynski J: Studies of the *European hare* V. Reproduction. Acta Theriol 9: 305-352. 1964.
13. Spagnesi M: Brevi osservazioni sull'accrescimento dei giovani de Lepre europea (*Lepus europaeus Pallas*), nati in cattività. Ricerche di Biologia della Selvaggina. Bologna. 1972.

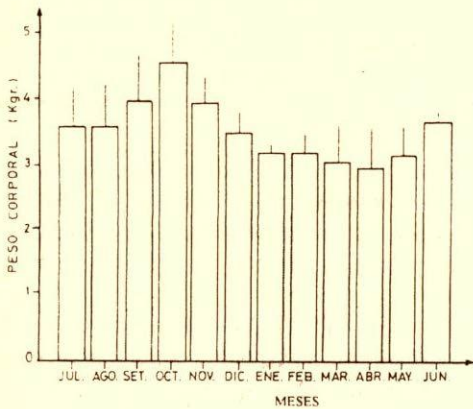


Figura 1: Distribución del peso corporal medio mensual de hembras de *Lepus europaeus* (P), en una población del área de Río Cuarto, durante un periodo anual completo. Cada barra representa la media y la línea vertical la desviación estándar.

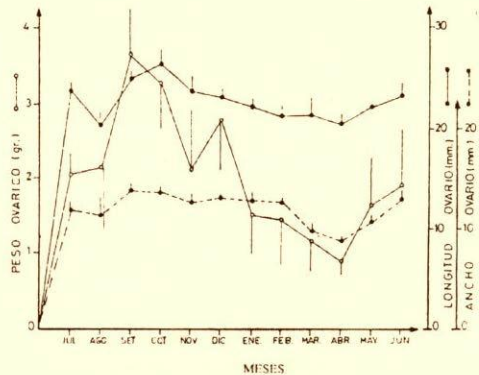


Figura 2: Distribución del peso, longitud y ancho ovárico de *Lepus europaeus* (P), en una población del área de Río Cuarto, durante un periodo anual completo. Cada punto representa la media y las líneas verticales la desviación estándar.

Figura 3: Fotografías microscópicas de cortes transversales de ovario durante el periodo reproductivo y no reproductivo de *Lepus europaeus* (P)

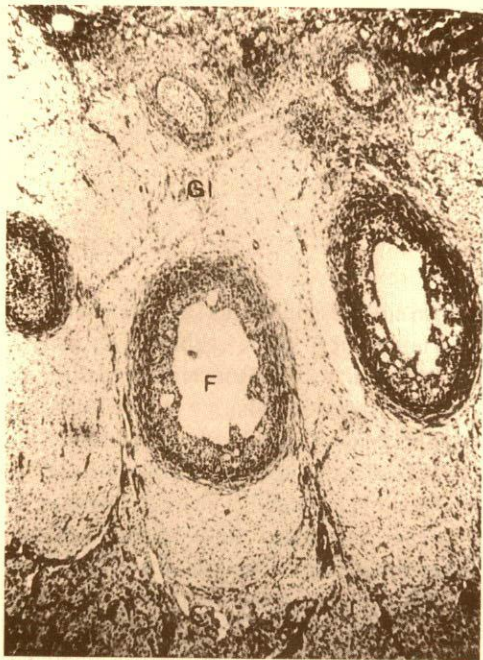


Figura 3a: Periodo Reproductivo: Corteza: se observan folículos en distintos grados de crecimiento (F), cuerpo lúteo (L) y glándula intersticial (GI). (64x)



Figura 3b: Periodo Reproductivo: A mayor aumento se observan cuerpo lúteo (L) y glándula intersticial (GI). (180x).



Figura 3c: Periodo No Reproductivo: se observa la corteza (C) con diferentes tipos de folículos (F) y la médula (M), de tejido conectivo con vasos sanguíneos. (64x).



Figura 3d: Periodo No Reproductivo: se observa la zona cortical con su epitelio (E), folículos (F) y tejido interfollicular (TI). (180x).