

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

*Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la
sincronización del celo en cobayas*

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

Autoras:

Evelin Ariana Ferrin Minaya

CI: 2300141609

Correo electrónico: ferrinevelin6b3@gmail.com

Rosa Veronica Murudumbay Cunin

CI: 0302219936

Correo electrónico: veronica9419@hotmail.com

Director:

Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga PhD

CI: 0102635463

Cuenca-Ecuador

31 de Octubre de 2022

Resumen:

El presente estudio evaluó la eficiencia de la administración de progesterona oral (altrenogest) en dosis diferentes sobre la sincronización del celo en cobayas, con la finalidad de recuperar estructuras producidas en forma fisiológica entre los días dos y cuatro post-monta en estos animales. Se utilizaron 35 cobayas adultas multíparas entre 4-5 meses de edad de raza mestiza y 5 cobayos con más de 5 meses de edad con descendencia comprobada. Las cobayas se ubicaron en 5 grupos experimentales al azar y recibieron dosis diferentes de altrenogest desde el día cero hasta el día 15 del protocolo: T1=0,33mg/kg (n=7); T2=0,28mg/kg (n=7); T3=0,22mg/kg (n=7); T4=0,17mg/kg (n=7); T5=0,11mg/kg (n=7). A partir del día 16 se valoró la apertura de la membrana vaginal, obteniendo como resultados que 94,3% de cobayas respondieron a la administración de progesterona oral. Al analizar los resultados de las citologías se estableció que las cobayas del T1 presentaron un 50% de células superficiales anucleadas el día 1, los animales de T2 llegaron a ese porcentaje en el día 2 y los de T3, T4 y T5 en el día 3 post-retiro de la progesterona. Los resultados para determinar monta efectiva indican que los tratamientos 1 ($1,86 \pm 0,26$ días) y 2 ($2,17 \pm 0,17$ días) necesitaron similares días para la monta efectiva ($P > 0,05$). Para el día de la ovulación se determinó que T1 presentó neutrófilos en porcentajes altos a partir del día 3 diferenciándose de los tratamientos 2, 3, 4 y 5 a partir de ese día. Sin embargo, los valores de neutrófilos en los tratamientos 2, 3, 4 y 5 al quinto día demuestran valores indicativos de que se produjo la ovulación. En dos de las 10 cobayas sacrificadas el día 4,5 post-monta se logró recuperar una estructura con dos embriones en estadio de mórula calidad 2. En conclusión, las dosis altas de progesterona oral son más efectiva en la sincronización del celo en cobayas, logrando obtener monta efectiva, ovulación a las 48 horas y recuperación de estructuras a los 4,5 días post-celo.

Palabras claves: Sincronización del celo. Monta natural. Colecta de embriones. Cobayos mejorados

Abstract:

The present study evaluated the efficiency of oral progesterone administration (altrenogest) at different doses on estrus synchronization in guinea pigs, with the purpose of recovering physiologically produced structures between days two and four post-assembly in these animals. Thirty-five adult multiparous guinea pigs between 4-5 months of age of mixed breed and 5 guinea pigs older than 5 months of age with proven offspring were used. The guinea pigs were randomly placed in 5 experimental groups and received different doses of altrenogest from day zero to day 15 of the protocol: T1=0.33mg/kg (n=7); T2=0.28mg/kg (n=7); T3=0.22mg/kg (n=7); T4=0.17mg/kg (n=7); T5=0.11mg/kg (n=7). From day 16 onwards, the opening of the vaginal membrane was evaluated, obtaining as results that 94.3% of guinea pigs responded to the administration of oral progesterone. When analyzing the cytology results, it was established that T1 guinea pigs presented 50% of anucleated surface cells on day 1, T2 animals reached this percentage on day 2 and T3, T4 and T5 animals on day 3 post progesterone withdrawal. Results for determining effective mating indicate that treatments 1 (1.86 ± 0.26 days) and 2 (2.17 ± 0.17 days) required similar days for effective mating ($P > 0.05$). For the day of ovulation, it was determined that T1 presented neutrophils in high percentages from day 3 onwards, differentiating from treatments 2, 3, 4 and 5 from that day onwards. However, the neutrophil values in treatments 2, 3, 4 and 5 on the fifth day showed values indicative of ovulation. In two of the 10 guinea pigs sacrificed on day 4.5 post-assembly, a structure with two quality 2 morula stage embryos was recovered. In conclusion, high doses of oral progesterone are more effective in synchronizing estrus in guinea pigs, obtaining effective mating, ovulation at 48 hours and recovery of structures at 4.5 days post-estrus.

Keywords: Estrus synchronization. Natural mating. Embryo collection. Improved guinea pigs

Índice

1. Introducción

.....	13
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
2.3 Pregunta de investigación	16
3. Revisión de literatura	17
3.1 Anatomía del aparato reproductor de la hembra	17
3.1.1. Ovarios	17
3.1.2. Oviductos.....	17
3.1.3. Útero	17
3.1.4. Vagina.....	17
3.1.5. Vulva.....	18
3.2 Anatomía del aparato reproductor de macho	18
Estructuras internas	18
3.2.1. Epidídimo	18
3.2.2. Conducto deferente	18
3.2.3. Glándulas accesorias.....	18
3.2.4. Próstata	18
Estructuras externas	19
3.2.5. Pene	19
3.2.6. Testículos.....	19
3.3 Ciclo estral de las cobayas.....	19
3.4 Dinámica folicular.....	20

3.4 Desarrollo embrionario en la cobaya	21
3.4.1 Desarrollo cronológico del embrión.....	21
3.5 Clasificación de embriones	22
3.5 Métodos de sincronización de celo	23
3.6 Recuperación embriones	24
4. Materiales y Métodos	27
4.1 Materiales	27
4.2. Métodos	28
5. Resultados y discusion	35
6. Conclusiones	46
7. Recomendaciones	46
8. Bibliografía	47

Índice de Imágenes

Imagen 1. Desarrollo embrionario en sus distintas etapas.....	23
Imagen 2 Células presentes en las etapas del ciclo estral.....	26
Imagen 3: Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca	29
Imagen 4: Granja particular ubicada en la provincia del Cañar.....	29
Imagen 5: Visualización de la apertura de la membrana vaginal de una cobaya en su totalidad el día 2 posterior al retiro de la fuente de progesterona oral.....	35
Imagen 6: Cambios progresivos en la coloración de la membrana vaginal de una cobaya en el día 4 post supresión del progestágeno, con labios vulvares iniciando el cierre de la misma	36
Imagen 7: Cierre progresivo de la membrana vaginal de una cobaya en el día 5 post retiro de la progesterona.....	36
Imagen 8: Fotografía de células superficiales anucleadas observadas al microscopio posterior a la realización del frotis vaginal en una cobaya en el día 2 post suspensión de la fuente de progesterona	39
Imagen 9: Sonda vesical utilizada para colecta de embriones en cobayas.....	43
Imagen 10: Estructura con dos células (blastómeras)	44
Imagen 11: Mórula, calidad 2	44
Imagen 12: Mórula, calidad 2	44

Índice de figuras

Figura 1 Protocolo del experimento 1: día 0=inicio del protocolo, aplicación de progesterona oral (Altrenogest) hasta el día 15.....	32
Figura 2 Media y error estándar del día de la apertura de la membrana vaginal en las cobayas de los diferentes tratamientos, en los 5 días posteriores al retiro de la administración de la progesterona oral (Altrenogest).	38
Figura 3: Media y error estándar de las células superficiales observadas mediante citología vaginal durante los cinco días post-retiro de la administración de la progesterona oral	40
Figura 4: Media y error estándar del día de la monta en las cobayas de los diferentes tratamientos, en los 5 días posteriores al retiro de la administración de la progesterona oral (Altrenogest)	40
Figura 5: Media y error estándar de las células superficiales y los neutrófilos observados mediante citología vaginal durante los cinco días post-retiro de la administración de la progesterona oral	41
Figura 6: Media y error estándar de los neutrófilos observadas mediante citología vaginal durante los cinco días post-retiro de la administración de la progesterona oral	42

Cláusula de propiedad intelectual

Evelin Ariana Ferrin Minaya en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la sincronización del celo en cobayas", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 31 de octubre del 2022.



Evelin Ariana Ferrin Minaya

CI: 2300141609

Cláusula de Propiedad Intelectual

Rosa Veronica Murudumbay Cunin, autora del trabajo de titulación "Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la sincronización del celo en cobayas" certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 31 de octubre del 2022



Rosa Veronica Murudumbay Cunin

C.I: 0302219936

Cláusula de licencia y autorización para la publicación en el Repositorio
Institucional

Evelin Ariana Ferrin Minaya en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la sincronización del celo en cobayas", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 31 de octubre del 2022.



Evelin Ariana Ferrin Minaya

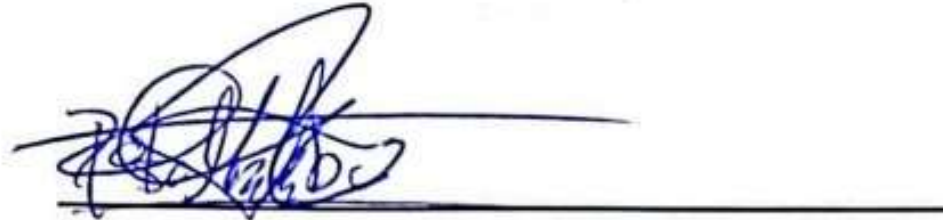
CI: 2300141609

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Rosa Veronica Murudumbay Cunin en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la sincronización del celo en cobayas", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 31 de octubre del 2022



Rosa Veronica Murudumbay Cunin

C.I: 0302219936

Agradecimiento

A Dios, por permitirme seguir adelante día a día para alcanzar cada una de mis metas al haberme brindado salud, vida y protección.

A mis padres, quienes han sido siempre mi mayor orgullo y ejemplo para llegar hasta donde estoy, realizando esfuerzos y sacrificios y, que además de brindarme su apoyo económico durante toda esta etapa, me han brindado amor incondicional a pesar de la distancia.

A mis amigos y a todas las personas que estuvieron a mi lado apoyándome para poder superar obstáculos, dificultades y todas las veces que quise rendirme, por hacerme sentir siempre capaz y seguir luchando por este gran logro de llegar a terminar mi carrera profesional.

A mi director de tesis Doctor Luis Ayala, por todo su apoyo, motivación, paciencia y buen humor, quien me demostró en todo momento que siempre las personas sinceras que hablan con la verdad, serán las mejores personas y llegarán lejos sin necesidad de poner excusas.

A las siguientes personas: A la familia Murudumbay Cunin, Cristhian Trejo, Sebastian Carchi, Jimena Morocho, Dr. Xavier Samaniego, Dr. José Luis Pesántez, Dr. Pedro Barbecho y demás personas que nos dieron su apoyo para realizar esta investigación.

Evelin Ferrin

Agradecimiento

A Dios por darme la sabiduría, conocimiento y fortaleza para poder cumplir con esta meta.

A mis padres y hermanos quienes a pesar de las adversidades siempre han estado para brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigas y docentes quienes han sido parte fundamental a lo largo de este trayecto.

A la Universidad de Cuenca, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haber impartido sus conocimientos científicos a través de sus distinguidos catedráticos para mi formación profesional.

Rosa Murudumbay

Dedicatoria

Este trabajo de titulación se lo dedico a mis padres Verdy Ferrin e Isabel Minaya porque me han apoyado día a día para lograr culminarlo.

A mis hermanos, especialmente a mi pequeña hermanita que siempre me ha impulsado a ser una buena persona y por tenerme como su modelo a seguir.

A mis mascotas Mordelón y Zowy que, aunque ya sus vidas se apagaron, me motivaron a querer velar por la salud y bienestar de otros animalitos y a Muriel, Perséfone y Apolline, que han sido mi compañía más cercana durante mi etapa universitaria y que siguen siéndolo actualmente.

Este logro también me lo dedico porque vivir muchos años sola y lejos de mi familia ha sido una de las pruebas más grandes y que al final de cada día sabía que tenía que seguir confiando en mi y en las ganas de lograrlo.

A todas las personas que les interesa el fascinante mundo de la investigación, para que puedan tomar las cosas positivas de este estudio y que encuentren en este trabajo una guía para mejorar sus propias hipótesis.

Evelin Ferrin

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedicó a mis padres Sebastián Murudumbay y Tránsito Cunin quienes con su esfuerzo y sacrificio diario han hecho esto posible.

A mis hermanos y sobrinos (as) Suri, Yatzari, Daniel y Santiago quienes con su amor y carisma me han brindado su apoyo emocional en los momentos difíciles

A mi primo Agustín Pichisaca quien a pesar de que haya tenido que adelantarse hacia la presencia de Dios ha sido un factor fundamental para cumplir con esta meta.

A mis amigas (os) quienes han estado presente para brindarme su apoyo en todo momento, de manera especial a Susana y Rosa quienes con sus consejos han hecho que esta trayectoria sea menos pesada.

Rosa Murudumbay

1. Introducción

El cuy es un animal doméstico emblemático de América del Sur, desde épocas preincaicas hasta la actualidad mantiene una relación muy estrecha con los pobladores de esta región (Bolton, 1979). Es una especie ampliamente distribuida a lo largo de la cordillera andina, donde se han detectado numerosos grupos en países como el norte de Chile, noroeste de Argentina, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela (Araníbar & Echevarría, 2014).

Por su temperamento dócil, alta precocidad y prolificidad, el cuy doméstico (*Cavia porcellus*) es criado como animal de compañía (Chauca, 1997), pero también ha participado dentro de la medicina tradicional de estas regiones, así como también representa una gran fuente de proteína, ya que su carne posee alto valor nutricional, lo que a su vez contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos económico (Sánchez et al., 2018). En cuanto a fines experimentales, el cuy es considerado un excelente modelo para estudiar diversos aspectos de la reproducción humana, fertilización *in vitro*, clonación, edición de genes e implantación, así como también la inmunidad y las enfermedades respiratorias (Wang et al., 2019).

Sin embargo, el uso del cobayo, tanto para fines comerciales como experimentales tienen una gran limitante si los comparamos con otras especies de roedores utilizados en laboratorio, como los ratones y ratas, su camada es pequeña y solo se pueden obtener pocos embriones de pre - implantación de una hembra (Dorsch et al., 2008).

Ante esta problemática se han estudiado desde 1850 aspectos de la fisiología reproductiva de la cobaya como los movimientos embrionarios desde los cuernos uterinos hasta el útero (Bischoff, 1852), la maduración del ovocito (Moore & Tozer, 1908), los cambios histológicos y fisiológicos en el ciclo estral (Stockard & Papanicolau, 1917), el comportamiento del mismo (Young et al., 1935), el desarrollo

folicular (Myers et al., 1936) , el desarrollo embrionario temprano (Hunter et al., 1969) y la inseminación artificial (Ueda et al., 1998).

Todo esto con el objetivo de implementar biotécnicas reproductivas como la multiovulación y la producción de embriones *in vitro* (PIVE) específicamente en esta especie, con el fin de implementar bancos de material genético que permita la conservación de la biodiversidad genética (Grégoire et al., 2010; Clemons et al., 2011). Sin embargo, para producir embriones de cobaya (mórulas y/o blastocistos tempranos) y establecer la técnica de transferencia de embriones (hembras receptoras sincrónicas), es necesario mantener un control adecuado del celo, ya sea mediante el bloqueo de la ovulación (uso de progestágenos) o la inducción del estro (uso de prostaglandinas) (Grégoire et al., 2012).

La información disponible apunta a que el empleo de implantes de progesterona subcutánea junto a la inseminación intraperitoneal pueden ser una alternativa viable para obtener descendencia (Ueda et al., 1998). Sin embargo, debido a la complejidad en la fijación del dispositivo de progesterona (P4) y la aplicación de la inseminación artificial intraperitoneal solo se recomienda este procedimiento para pequeñas colonias de animales bajo condiciones controladas.

Otras investigaciones han analizado el uso de prostaglandina (PGF₂α) inyectable como agente luteolítico (Blatchley & Donovan, 1969), sin embargo, al ser un animal multiovulatorio la efectividad de la prostaglandina está en entredicho y los resultados obtenidos en cuanto al control del ciclo estral mediado por análogos de PGF₂α son desalentadores (Grégoire et al., 2012).

Sin embargo, la utilización de progesterona oral (Altrenogest) ha demostrado ser un método fácil, efectivo y simple de usar, tal como lo describe (Grégoire et al., 2012), quienes aplicaron 0,22 mg/Kg de Altrenogest durante 15 días y lograron controlar el ciclo estral e indujeron la ovulación entre 4-5 días post retiro de la fuente de progesterona, pero se recomienda continuar con estudios sobre la dosis a utilizar de este producto.

Determinar la dosis exacta de progesterona oral (Altrenogest), es básico ya que existe evidencia científica de que en otras especies dosis bajas de progesterona oral (Altrenogest) provoca quistes foliculares (De Rensis & Kirkwood, 2016). Este criterio es fortalecido por el estudio realizado por (Andrade et al., 2019), quienes determinaron que las cerdas tratadas con 16 mg de progesterona presentaron ovarios poliquísticos, en comparación con la utilización de 20 mg donde no se presentó esta patología. Por lo antes expuesto nace la pregunta de si la dosis del Altrenogest que se viene usando en cobayos es la adecuada.

2. Objetivo

2.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia de la administración oral de progesterona (altrenogest) en la sincronización del ciclo estral en cobayas, que permita recuperar estructuras producidos en forma fisiológica entre los días dos y cuatro post-monta.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la dosis adecuada de progesterona (altrenogest) administrada a cobayas y la valoración sobre el tiempo de aparición del celo.
- Establecer el momento de la monta y la ovulación post-retiro de la progesterona oral
- Determinar el día óptimo para la recuperación de embriones después de la monta natural de las hembras sometidas a un protocolo de sincronización.

2.3 Pregunta de investigación

¿La administración oral de un progestágeno sintético (Altrenogest) en diferentes dosis, sincroniza el ciclo estral en cobayas a diferentes tiempos?

3. Revisión de literatura

3.1 Anatomía del aparato reproductor de la hembra

3.1.1. Ovarios

Los ovarios tienen un color blanco amarillento, forma oval ligeramente aplanada, se ubican caudal al polo ventral del riñón entre la tercera y cuarta vértebra lumbar. Poseen un tamaño aproximado de 3-6 x 2-4 x 2-3 mm y son los responsables de producir óvulos para la reproducción de la especie (Villamarín, 2016).

3.1.2. Oviductos

Son estructuras con forma de conductos capilares que se extienden desde el infundíbulo hasta la abertura anterior de los cuernos uterinos, la función de estos es receptar y transportar el óvulo al cuerno uterino, lugar en el que se llevará a cabo la fecundación de los óvulos (Solorzano, 2014).

3.1.3. Útero

El útero es bicorneo y asemeja forma de una V, está compuesto por cuernos uterinos que se suspenden por los ligamentos anchos de la pared abdominal dorso lateral (Wagner et al., 1976). Además, tienen forma cónica, y miden aproximadamente 37 mm de largo y 6 mm de ancho. Por otra parte, el cuerpo uterino en sus características se describe como corto y aplanado dorso ventralmente, con aproximadamente 13 mm de largo y 7 mm de ancho (Oñate, 2012).

3.1.4. Vagina

La vagina es más pequeña en su diámetro exterior en comparación con el cuello del útero y sus paredes son más delgadas, anatómicamente se encuentra en la porción caudal del suelo pélvico y ventralmente alrededor del margen caudal del arco isquiático donde se abre el orificio vaginal hacia el exterior (Wagner & Manning, 1976).

3.1.5. Vulva

Es la parte externa de la cobaya y tiene forma de “V” o “Y”, presenta una escotadura en la porción media ventral formando dos pequeños labios, encontrándose el meato urinario en el fondo y el clítoris en la parte dorsal (Villamarín, 2016).

3.2 Anatomía del aparato reproductor de macho

Estructuras internas

3.2.1. Epidídimo

El epidídimo se encuentra a lo largo del margen dorsolateral del testículo, está compuesto por la cabeza, cuerpo y cola. La cabeza y el cuerpo están normalmente cubiertos por un gran cuerpo graso, mientras que la cola es la que da lugar al conducto deferente (Wagner & Manning, 1976).

3.2.2. Conducto deferente

Son tubos de carácter muscular, que al momento de la eyaculación ejercen la función de impulsar los espermatozoides desde el epidídimo al conducto eyaculador de la uretra prostática, también participa en el almacenamiento de los espermatozoides para su eyaculación (Aragon, 2019).

3.2.3. Glándulas accesorias

Contiene glándulas accesorias como las glándulas vesiculares, glándulas prostáticas, glándulas bulbouretrales y glándulas coagulantes (Stan, 2015). Hablando de las glándulas coagulantes, se conoce que su secreción puede permitir la coagulación de la secreción de las vesículas seminales formando un tapón vaginal luego de la eyaculación para impedir el reflujo del semen (Gonzalo, 2018).

3.2.4. Próstata

Se encuentra ubicada dorsal a la uretra, está constituida por una masa de tejido glandular cubierta por una delgada cápsula de tejido fibroso y células musculares lisas (Vázquez & Del Sol, 2010) .

Estructuras externas

3.2.5. Pene

El pene al estar en estado de reposo se dispone en forma de herradura y el glande dirigido hacia caudal. El glande es de forma cilíndrica con su extremo redondeado, presentando una fisura media en sentido longitudinal en la superficie dorsal y otra más corta en transversal en donde se abre el orificio uretral externo. Además, en la superficie externa del glande se pueden observar pequeñas escamas córneas acompañadas de pequeñas espículas dirigidas a craneal (Márquez et al., 2007).

3.2.6. Testículos

Los testículos se encuentran en sacos escrotales que son poco profundos, los anillos inguinales son grandes y permanentemente abiertos que se comunican con la cavidad peritoneal, permitiendo que los testículos también se encuentren dentro de la cavidad abdominal (Clemons & Seeman, 2011).

3.3 Ciclo estral de las cobayas

La cobaya es una hembra poliéstrica continua cuyo ciclo estral tiene una duración media de 16 ± 3 días. El celo generalmente se presenta en la noche persistiendo de seis a once horas, momento en que la hembra es receptiva al macho, mientras que, la ovulación ocurre de manera espontánea aproximadamente 10 horas después en donde son liberados de dos a cuatro óvulos. Se caracteriza por la presencia de cambios en el comportamiento conductual y físico, tales como: lordosis ante la presencia del macho, ruptura de la membrana vaginal y secreción de moco; en caso de que se produzca el apareamiento y al saber que la llegada del esperma hacia el oviducto ocurre en 15 minutos, se formará el tapón vaginal y se conservará por uno o dos días (Noonan, 1994).

Proestro: es la fase previa al celo que tiene una duración de 13,9 horas en la cual los órganos reproductores de la hembra se preparan para aceptar al macho, aumenta el volumen del útero, cambia la coloración de la vulva y se puede presentar secreción sanguinolenta (Noonan, 1994).

Estro: también conocido como celo propiamente dicho dura 8,3 horas y se caracteriza porque la hembra acepta favorablemente al macho, los cambios externos que se pueden observar son: edematización de la vulva con incremento del color rosáceo, lordosis ante la presencia del macho y descarga de moco vaginal. Internamente se abre el cérvix para dar paso a la eyaculación del macho. Un dato importante a tomar en cuenta es que el 64% de los celos se inician entre 18:00 a 06:00 cuando las hembras se mantienen en la oscuridad y en caso de que haya copulación, el celo es interrumpido (Roy et al., 1993).

Metaestro: es un periodo corto en el que la hembra se recupera de todos los cambios ocurridos en la fase de estro, aproximadamente dura 20,4 horas, sin embargo, habrá variaciones de acuerdo a la condición de cada individuo y las cobayas rechazarán vigorosamente al macho en cada intento de monta (Barahona & Quishpe, 2012).

Diestro: tiene una permanencia de 14,7 días y se le atribuye el nombre de fase de reposo o descanso reproductivo y es la fase con más días (Esquivel, 2006).

3.4 Dinámica folicular

Cuando las cobayas atraviesan por el periodo de pubertad, adquieren la capacidad de llegar a producir gametas fértiles, es decir, dan inicio a la vida reproductiva, pero para que esto llegue a ocurrir, los animales deben cumplir con ciertas condiciones como tamaño y pesos determinados, razón por la cual la raza tiene un efecto decisivo al momento de la aparición del primer estro (Echeverría, 2006).

El proceso hormonal inicia una vez que la adenohipófisis es capaz de liberar hormonas gonadotrópicas que tendrán diversas formas de actuar al generar la liberación de esteroides gonadales, llegando a estimular o inhibir algunas respuestas que intervienen en el control cíclico (Ascoli et al., 2008).

Cada ciclo suele estar dividido en dos fases, una luteal y una folicular. En la fase luteal hay ausencia de manifestaciones típicas del comportamiento sexual, presencia de cuerpo lúteo y altos niveles de progesterona plasmática, mientras que en el caso de la fase folicular que inicia con el proestro, lo que ocurre es un aumento

de estrógeno en el folículo preovulatorio, induciendo a la hembra al estro y posteriormente presentar la ovulación (Echeverría, 2006).

El proceso de desarrollo folicular se produce en ondas, y estas están íntimamente relacionadas con el desarrollo armónico y simultáneo de varios folículos antrales que atraviesan estados de reclutamiento, selección y dominancia folicular. De acuerdo con un estudio realizado por las cobayas poseen dos ondas de crecimiento folicular; la primera onda que culmina en los días 10 a 11 y la segunda que termina con la ovulación (Bland, 1980).

3.4 Desarrollo embrionario en la cobaya

La gestación de las cobayas tiene una duración de 59 y 72 días, con un promedio de 67 a 68 días. Esta etapa da inicio cuando la hembra que está preñada culmina con el parto. El tamaño de la camada interviene en el tiempo de gestación, a mayor tamaño de camada más corta será la gestación (Vivaz, 2009)

La zona pelúcida es una cápsula que tiene una consistencia viscosa la cual envuelve al ovocito y al embrión en estadio temprano, los mismos que poseen receptores de esperma los mismos que son bloqueados posterior a la fecundación, y son encargadas de mantener a las células de los embriones pre compactadas y unidas, además brindan protección a las células jóvenes del sistema inmune y los patógenos (Mellisho, 2010).

Cuando se retira la zona pelúcida de los embriones pre-compactados, estas células se separan del embrión causando así la degeneración del mismo. El blastocelo desarrolla de gran tamaño, el embrión se llega a expandir provocando así un adelgazamiento de la zona pelúcida, conociéndole a este estado como Blastocisto expandido, posterior a esto la expansión provoca la ruptura de la zona pelúcida provocando que el embrión quede fuera (Mellisho, 2010).

3.4.1 Desarrollo cronológico del embrión.

En las cobayas se va observar 2 células 23 a 48 h posterior al coito, 4 células 30-75 h, 16 células 107 h, se puede observar el blastocisto 115 h post coito, a los 3,5 días

se va observar la estructura en la entrada del útero, llegando a darse la implantación 6 días después, con la duración de la gestación de 63 -70 días (Alegría, 2015).

3.5 Clasificación de embriones

Estadio 1: No fecundado.

Estadio 2: De dos a 12 células. Embriones con dos a 12 células, aproximadamente del día 2 al día 5 de desarrollo.

Estadio 3: Mórula temprana. Se asemeja a una mora. Las blastómeras todavía se pueden llegar a distinguir unas de otras. La masa de células ocupa casi todo el espacio perivitelino. Día 5 - 6 de desarrollo.

Estadio 4: Mórula. Las blastómeras se han adherido formando una masa compacta, el embrión ocupa el 60-70% del espacio perivitelino. Día 6 de desarrollo. 26

Estadio 5: Blastocisto temprano. Presenta una cavidad con fluido denominada blastocele, el embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino; es posible comenzar a diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno. La edad estimada es de siete días.

Estadio 6: Blastocisto. Presenta una clara diferencia entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno (el cual se observa más oscuro). El blastocisto es identificado con claridad. La edad estimada de desarrollo es de siete a ocho días.

Estadio 7: Blastocisto expandido. El diámetro total aumenta 1,2 a 1,5 veces. La zona pelúcida se adelgaza aproximadamente un tercio del grosor original. Los embriones en este estado se pueden encontrar colapsados. Día 8 - 9 de desarrollo.

Estadio 8: Blastocisto eclosionado. En este estado los embriones pueden estar en el proceso o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados son esféricos con el blastocele bien formado o colapsado. Se encuentran en el día 9 de desarrollo.

Estadio 9: Blastocisto eclosionado expandido (Brenes , 2014)

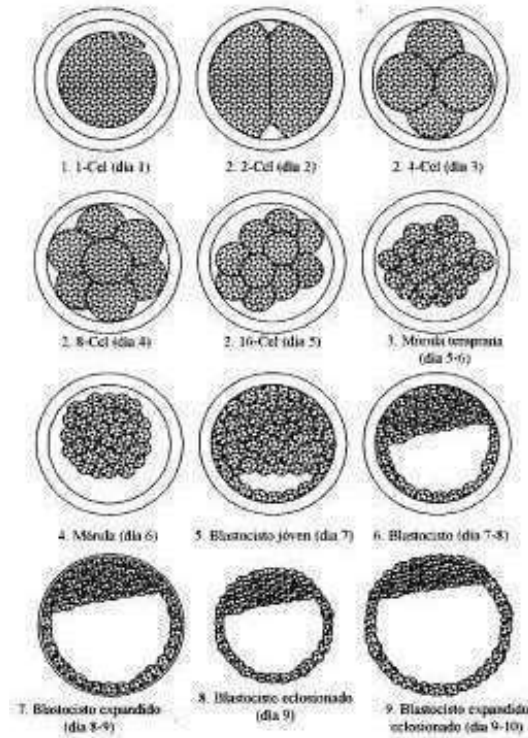


Imagen 1. Desarrollo embrionario en sus distintas etapas

(Fuente: IETS, 2011)

3.5 Métodos de sincronización de celo

Sobre la sincronización del celo en cuyes hembra, existe muy poca o casi nula información por falta de investigación, y en los pocos trabajos realizados los resultados no han sido satisfactorios, lo que ha llevado a que los interesados en el tema, a tener que realizar la detección del celo mediante hisopados vaginales (Diez, 2007).

Sara (2000) y Crudeli et al., (2008), manifiestan que, para conseguir efectividad con los distintos programas de sincronización del celo en esta especie, es muy necesario que las hembras gocen de una buena condición corporal, las dosis de la hormona a aplicar y la exactitud de los tiempos acorde al protocolo que se va a usar. Además, es fundamental conocer a profundidad la dinámica folicular, para esclarecer los fenómenos negativos que intervienen durante el proceso.

Existen varios métodos de carácter natural que son empleados para sincronizar el celo en las cobayas, no obstante, se tiene también protocolos que emplean el uso de hormonas. Un ejemplo claro de un método de sincronización es el realizado por (Oñate, 2012), quien aplicó GnRH y PGF2 α , teniendo como resultado que la tasa de fertilidad de esta especie incrementó al 75% posterior al periodo de empadre de cinco días.

Díaz, (2008), probó dos tratamientos para la sincronización del celo en cobayas, el primer tratamiento consistía en el uso GnRH el día uno + PGF2 α a las 72 horas y el otro tratamiento radicaba en una dosis de PGF2 α el día uno y luego a las 72 horas; Al ver los resultados, el primer tratamiento tuvo un porcentaje de fertilidad mayor al segundo tratamiento.

Otro método de sincronización de celo para cobayas, que ha arrojado buenos resultados ha sido el realizado por Grégoire et al., (2012), en el que se administró una dosis diaria de 0,22 mg/kg de Altrenogest, progestágeno de vía oral, durante 15 días y siempre a la misma hora, esperando que a partir del día 17 se presenten los primeros signos del celo, variable que fue corroborada al revisar los resultados de su investigación.

3.6 Recuperación embriones

La criopreservación y producción de embriones son biotecnologías que juegan un papel importante en las técnicas de reproducción asistida, pues durante su desarrollo han demostrado ser un protocolo eficaz y segura en estudios realizados en los cobayos por Mise, (2014). Este procedimiento se ha ido adaptando en otras especies de interés económico como las cobayas (Cañón, 2018).

La verificación de la gestación se puede realizar mediante un frotis vaginal post coito, esta técnica nos indica la presencia de espermatozoides, siendo esto confirmado, se procede al sacrificio de las cobayas en los días 2,5; 4,5 y 6,5. Se realiza la extirpación del oviducto y partes de los cuernos, los embriones previos a la implantación se lavan con solución salina con fosfato a través de la abertura

infundibular este procedimiento se debe realizar por tres veces para su posterior transferencia (Dorsch et al., 2008)

3.7 Citología vaginal exfoliativa

La citología vaginal exfoliativa es uno de los métodos que ha sido bastante utilizado al realizar el examen reproductivo en la especie canina según lo mencionan varios autores (Linde & Karlsson, 1984; Groppetti et al., 2012; Leigh et al., 2013). Este método prácticamente se basa en la determinación de cambios celulares que ocurren en el epitelio vaginal por resultado de los niveles de hormonas, especialmente de estrógenos, lo que lo vuelve simple y de gran utilidad para conocer el estado fisiológico o la presencia de patologías en el sistema reproductivo de las hembras, pero específicamente para determinar las etapas del ciclo estral (Wright & Parry, 1989).

Para el procedimiento de la toma de muestra, se debe tomar un hisopo, mismo que debe ser humedecido con solución salina (Wright & Parry, 1989), al momento de introducirse se debe evitar el contacto con el vestíbulo, debido a que sus células no suelen reaccionar tan rápido al aumento de la concentración de estrógeno en la sangre como ocurre en la membrana mucosa de la vagina (Antonov, 2017).

En perras, el hisopo que ha sido previamente humedecido, se introduce hacia la comisura dorsal de la vulva presionada ligeramente en dirección caudodorsal hasta pasar el arco isquiático y luego el hisopo debe girarse para recolectar la muestra y luego se retira, posteriormente, se realiza un barrido sobre el portaobjetos realizando una suave presión contra el mismo y se procederá a realizar la tinción de elección para poder observar al microscopio (Kustritz, 2006).

Chatdarong et al. (2002), manifiestan que para realizar la tinción se puede escoger de una amplia variedad, sin embargo, la tinción de Diff-Quick o Haemacolor, es una tinción que puede ser rápidamente aplicada a la práctica en la clínica, para lo cual se debe fijar la muestra en metanol y luego sumergir en las dos soluciones la de color azul y la rosa respectivamente y, señalan como ventaja, la posibilidad de almacenar las muestras durante años para volver a ser observadas.

Para evaluar las muestras obtenidas y determinar la etapa del ciclo estral, es importante diferenciar el tipo de células que se observen en el frotis, por ejemplo, la mayoría de autores describen que en la pared vaginal existen células basales, parabasales, intermedias, superficiales y escamosas (Rieck & Kratzheller, 1955; Schutte, 1967).

Las células basales suelen ser las más pequeñas (10 - 20µm) y el núcleo ocupa casi su totalidad, pero al estar en la membrana basal, rara vez logran ser identificadas; las células parabasales con 15 a 25 µm, son ovoides con un núcleo grande marginal y en ocasiones pueden tener neutrófilos y logran observarse en metaestro; las células intermedias tienen variaciones en su diámetro con núcleo bien formado y se encuentran en el diestro; para las células superficiales la forma será irregular, de gran tamaño y alcanzan su máximo en el momento del pico de estrógeno, indicando el momento de estro y, además de estas células, se pueden observar otras como células tumorales, células trofoblásticas, espermatozoides y neutrófilos (leucocitos) que generalmente aparecen al llegar la ovulación (Rieck Kratzheller, 1955; Wright & Parry, 1989; Christie et al., 1972).

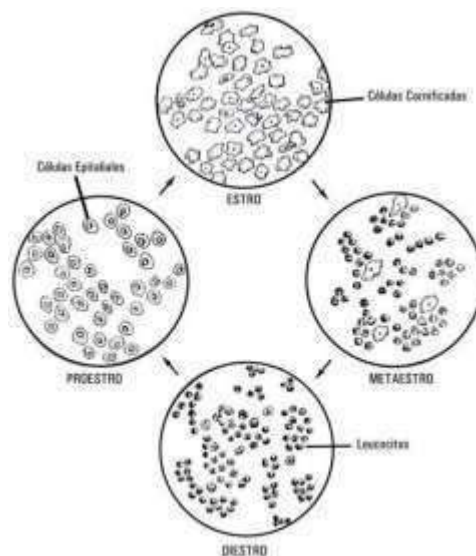


Imagen 2 Células presentes en las etapas del ciclo estral.

Fuente: (Geréz & Gullace, 2011)

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

Materiales físicos

- Jaulas
- Mandil
- Mascarillas
- Gorros quirúrgicos
- Guantes de examinación
- Balanza
- Equipo de disección
- Hisopos
- Papel secante
- Jeringas de insulina
- Cámara de fotos
- Campos quirúrgicos
- Sonda vesical

Materiales biológicos

- 35 cobayas
- 5 cobayos reproductores

Reactivos

- Progesterona oral (Altrenogest, Regumate®, MSD Animal Health, Francia)
- Tinción de Diff-Quick
- Lactato de Ringer
- Polivinil alcohol (Sigma, 363065)

Materiales de Laboratorio

- Placa cuadrículada de 100mm x 100mm
- Estereoscopio (Nikon SMZ775)
- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Pipetas automáticas (2-10 microlitros, 100 - 1000 microlitros)
- Puntas para pipetas automáticas (blancas y azules)
- Microscopio (Nikon Ci)
- Cámara para microscopio (M-shot)
- Baño María
- Platina térmica

4.2. Métodos

Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en dos lugares:

1. En una granja particular ubicada en la provincia del Cañar, ubicada a altura de 3.160 m s.n.m., con temperatura promedio de 11,8°C. En este lugar se mantuvieron los cobayos a condiciones controladas de alimentación y manejo.
2. En el Laboratorio de Biotecnología de la reproducción animal de la Universidad de Cuenca, ubicado en el Cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete, Vía Salado-Léntag; a una altura de 2.671 m s.n.m. La precipitación promedio anual es de 1.078,05 milímetros (mm) y temperaturas que oscilan entre 7 y 12 °C. Aquí se llevaron a cabo la disección y búsqueda de estructuras embrionarias, así como la evaluación de las muestras citológicas.



Imagen 3: Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca



Imagen 4: Granja particular ubicada en la provincia del Cañar

Animales y granja

En el experimento se utilizaron 35 cobayas (hembras), edad entre 4 y 5 meses, con un peso entre 1000 y 1200 gramos, sanas. Además, se emplearon 10 machos de >5 meses de edad, con peso promedio entre 1500 y 2000 gramos y probados sexualmente. Tanto hembras como machos eran de raza mestiza cruce entre la línea peruana y criolla.

Los animales fueron llevados a la granja 30 días antes para que se acostumbren al sistema de alimentación y manejo. La alimentación se tomó como base el forraje dos veces al día y recibieron sobrealimento (balanceado comercial), en dosis similar

todos los grupos una vez por día. Los cobayos fueron sometidos a un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Metodología para la investigación

El estudio constó de tres etapas, los cuales son descritos a continuación:

- **Etapa 1:** se determinó el rango de tiempo en el cual se presentó el celo, luego de la última dosis de progesterona oral (Altrenogest, Regumate®, MSD Animal Health, Francia) administrada a las cobayas en dosis diferentes.

Para este experimento se utilizó 35 cobayas los cuales fueron incluidas en esta investigación de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- Cobayas de raza mestiza
- Edad entre 4 y 5 meses
- Sanas
- Peso entre 1000 y 1200 gramos.
- Condición corporal entre 2,5 a 3,5, escala 1-5 donde 1 es extremadamente flaca y 5 obesidad extrema (Dorsten & Cooper, 2004)
- Cobayos (machos) de fertilidad comprobada (descendencia verificada), peso entre 1500 y 2000 gramos.

Criterios de exclusión:

- Cobayas que presentarán enfermedades durante el ensayo

Tratamientos

Se organizaron 5 tratamientos en el experimento 1, los cuales recibieron dosis diferentes de progesterona oral:

T1= 0,33mg/kg (n=7)

T2=0,28mg/kg (n=7)

T3=0,22mg/kg (n=7)

T4=0,17mg/kg (n=7)

T5=0,11mg/kg (n=7)

En estos animales se evaluaron las siguientes variables:

Variable independiente:

- Dosis de progesterona oral (Altrenogest)

Variables dependientes:

- Apertura de membrana vaginal
- Morfología de las células vaginales
- Monta efectiva

Protocolo de sincronización del celo:

El día del inicio del protocolo (día 0) a las 9:00 se inició la administración vía oral (Altrenogest, Regumate®, MSD Animal Health, Francia), mediante una pipeta automática regulable (100 µl a 1000 µl), este procedimiento se repitió hasta el día 15 (**Fig. 1**).

A partir del día 16 se realizó el monitoreo de las siguientes variables:

Valoración de la apertura de la membrana vaginal:

El día 16 a partir de las 08h00 se evaluó la apertura de la membrana vaginal, por 5 días consecutivos, para lo cual se inmovilizó a la cobaya y se observó a nivel de entrada de la vagina la presencia o ausencia de la membrana vaginal. Se consideró como día del inicio del celo (día 0) cuando el 50% de esta estructura este entre abierta, esto de acuerdo a los descrito por Sadeu et al., (2007).

Citología vaginal:

El primer día que se llegó a observar la apertura de la membrana vaginal, se dio inicio con los hisopados. Para esto se colocó a la cobaya en decúbito dorsal y con la ayuda de un hisopo se realizó un barrido de la parte interna de la pared de la vagina. Una vez tomada la muestra se procedió a realizar la extensión en un portaobjetos, luego se dejó secar al aire libre. A continuación, se introdujo la placa en un vial por 1segundo, el cual contenía el reactivo 1 (Fijador metanol), esto por 5 veces consecutivas, escurriendo el residuo al final del proceso. Este procedimiento

se repitió con el reactivo 2 y 3 en ese orden, al final se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire libre. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de biotecnología para su valoración según lo descrito por Dorsch et al., (2008).

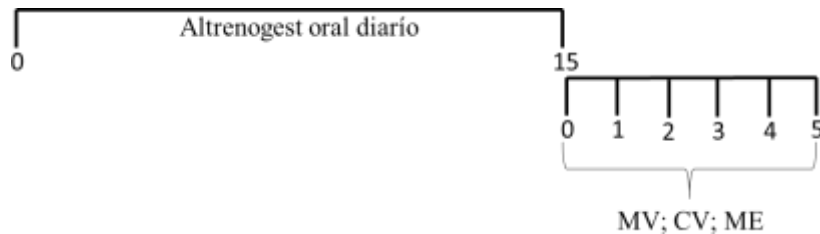


Figura 1 Protocolo del experimento 1: día 0=inicio del protocolo, aplicación de progesterona oral (Altrenogest) hasta el día 15. MV=valoración diaria de la apertura de la membrana vaginal. CV=citología vaginal. ME= determinación de monta efectiva.

- **Etapa 2:** Se buscó establecer el momento de la monta y la ovulación post retiro de la progesterona oral. Este experimento fue la continuación del experimento 1, por lo tanto, se utilizaron los mismos animales de cada tratamiento.

Valoración del apareamiento (monta)

A partir del día en el cual se observó la apertura de la membrana vaginal se procedió a introducir un macho en la jaula de cada tratamiento (7 hembras/jaula), esto por un lapso de 1 hora, con el fin de observar si existía o no monta efectiva, el ingreso fue a las 09h00.

Para determinar si la monta terminó con una eyaculación se utilizó las muestras citológicas que se tomaron concomitantemente. En las muestras se buscó la presencia de espermatozoides.

Determinación del día de la ovulación:

El día de la ovulación fue establecido mediante citología vaginal de acuerdo a lo descrito por Suzuki et al.,(2003), quienes indicaron que la determinación de la ovulación se basa en la afluencia de los leucocitos en el frotis vaginal.

- **Etapa 3:** Determinó el día óptimo para la recuperación de embriones producto de celo fisiológico y monta natural, mediante la técnica de lavado de cuernos uterinos post mortem.

Las cobayas que fueron cubiertas y que en el frotis tuvieron espermatozoides fueron utilizadas en el ensayo 3. Una vez que cumplieron 2,5; 3,5 y 4,5 post-celo, dos cobayas por cada momento (días) fueron sacrificadas para poder recuperar el útero, esto en cada uno de los tratamientos.

Recuperación de embriones:

A los 2,5; 3,5 y 4,5 días post celo se realizó la eutanasia de las cobayas de los 5 tratamientos de acuerdo a lo descrito por Ayala et al. (2017). Luego se obtuvo el útero y los ovarios de las cobayas, para separar los cuernos uterinos y oviductos por disección.

Para el lavado de embriones se introdujo en la parte anterior del cuerno uterino una sonda vesical, luego se procedió a introducir solución de lavado (PBS), se infiltró el medio que permitió la capacidad de los cuernos uterinos y a posteriormente se expulsó el medio por la parte final del cuerno. El líquido fue colectado en una placa Petri y luego llevado para la búsqueda de los embriones a un estereoscopio, para su identificación y valoración.

Diseño experimental

El trabajo fue experimental, contó con 5 tratamientos los cuales llevaron dosis diferentes de progesterona oral (Altrenogest). Se realizó un experimento con tres etapas (fases), en la primera se analizó la aplicación de Altrenogest (progesterona

oral) como factor de sincronización el celo en la cobaya. En la segunda fase se valoró el momento de la ovulación y la monta efectiva de la cobaya en estudio y finalmente se buscó la presencia de estructuras (embriones), luego de un empadre fisiológico, mediante un lavado uterino post-mortem.

Análisis estadístico

Los datos serán procesados en Excel y analizados en el programa estadístico SPSS versión 25. Se realizarán estadígrafos principales de todas las variables. Se evaluará la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro Wilk. Se aplicará la prueba de Chi cuadrado para analizar la relación, entre la apertura de la membrana vaginal, citología vaginal y celo. La valoración del número de estructuras colectadas en los días 2,5; ,3,5 y 4,5 serán analizados mediante la prueba de ANOVA y sus medias comparadas con Tukey al 5%.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Apertura de la membrana vaginal

El monitoreo diario de la membrana vaginal luego del retiro de la progesterona (día 15) permitió establecer que dicha estructura el día 15 se muestra visiblemente cerrada, presentando un color rosado pálido. Los siguientes días según se aproxima el celo se exhibe cambios progresivos en cuanto a la coloración pasando de un rosado pálido a rosado oscuro y la desaparición de la misma el día del celo (Imagen 5 y 6). Entre los 3 a 4 días la membrana vaginal empezó a cerrarse progresivamente desde los pliegues y comisuras de la apertura vaginal hasta terminar en la parte central (Imagen 7).



Imagen 5: Visualización de la apertura de la membrana vaginal de una cobaya en su totalidad el día 2 posterior al retiro de la fuente de progesterona oral.

(Fuente: los autores)



Imagen 6: Cambios progresivos en la coloración de la membrana vaginal de una cobaya en el día 4 post supresión del progestágeno, con labios vulvares iniciando el cierre de la misma.

(Fuente: los autores)



Imagen 7: Cierre progresivo de la membrana vaginal de una cobaya en el día 5 post retiro de la progesterona.

(Fuente: los autores)

Una vez tabulado los datos se determinó que los tratamientos T1, T4 y T5, presentaron un 100% de apertura de la membrana vaginal y los tratamientos 2 y 3

mostraron un 85,7% de apertura vaginal. Proporcionando un promedio general del 94,3% de cobayas que respondieron a la administración de progesterona oral (Altrenogest) en diferentes dosis durante 15 días consecutivos.

El porcentaje de animales que presentaron apertura de la membrana vaginal en la presente investigación, guarda concordancia con los resultados descritos por Grégoire et al. (2012), quienes evidenciaron un 93% de cobayas con apertura de la membrana vaginal al utilizar progesterona oral (Altrenogest), en dosis de 0,22 mg/Kg de peso; sin embargo, cuando utilizaron análogos de prostaglandina no se llegó a evidenciar apertura vaginal.

La observación diaria de la apertura vaginal a partir del retiro de la progesterona oral (día 15), permitió determinar que las cobayas de los tratamientos: T1 ($1,9 \pm 0,34$ días) y T2 ($2,2 \pm 0,17$ días) necesitaron dos en promedio para presentar apertura de la membrana vaginal comparado con el tratamiento 5 ($3,3 \pm 0,18$ días; $P < 0,05$), que necesito un día adicional para la apertura de la membrana vaginal. Sin embargo, los tratamientos: 3 ($2,5 \pm 0,22$ días) y 4 ($2,7 \pm 0,18$ días) presentaron valores similares a los de T1, T2 y T5 ($P > 0,05$).

Estos resultados nos permiten aseverar que la administración de progesterona oral (Altrenogest) por 15 días consecutivos, seguido de la supresión de la misma, provoca que las cobayas presenten celo (apertura de la membrana vaginal) en una ventana de tiempo de 1-4 días, con una media de $2,5 \pm 0,13$ días.

Sin embargo, es importante considerar que la administración de dosis altas de progesterona oral (T1=0,33 mg/Kg de peso vivo) genera que las cobayas presenten celo 24 horas luego de la supresión de la hormona. En contraposición dosis bajas (T5=0,11 mg/Kg de peso vivo) si bien permite la presencia de celo, este se observa 48 horas posteriores a lo que se consigue con dosis altas de progesterona (Fig. 2).

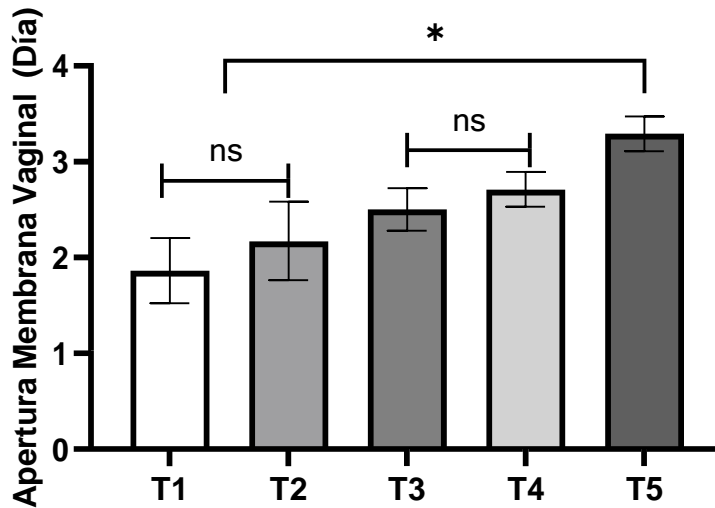


Figura 2 Media y error estándar del día de la apertura de la membrana vaginal en las cobayas de los diferentes tratamientos, en los 5 días posteriores al retiro de la administración de la progesterona oral (Altrenogest). T1=0,33mg/kg; T2=0,28mg/kg; T3=0,22mg/kg; T4=0,17mg/kg; T5=0,11mg/kg. Prueba de Tukey al 5%. *=diferencia estadística entre tratamientos. Correlación de Pearson $r=0,66$; $P<0,05$.

Para determinar el día del celo se utilizó el principio de la citología vaginal y las características que las células presentan principalmente en estro en la cual se observan más del 50% de células superficiales (Imagen 8), anucleadas (Arcila et al., 2019). Al analizar los resultados obtenidos de las citologías se estableció que las cobayas del tratamiento 1 llegaron a presentar un 50% de células superficiales anucleadas el día 1, los animales de T2 llegaron a ese porcentaje en el día 2 y los de T3, T4 y T5 en el día 3 post-retiro de la progesterona (Fig. 3).

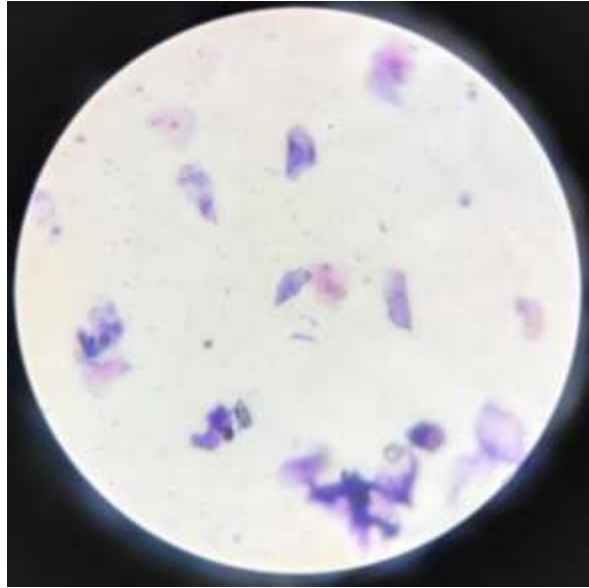


Imagen 8: Fotografía de células superficiales anucleadas observadas al microscopio posterior a la realización del frotis vaginal en una cobaya en el día 2 post suspensión de la fuente de progesterona.

(Fuente: los autores)

La combinación del día de apertura de la membrana vaginal y el día en el que se presentó el 50% o más de células superficiales anucleadas en las citologías vaginales confirma que los animales que recibieron dosis altas (T1=0,33 mg/Kg) presentaron celo 24 horas post-retiro de la hormona.

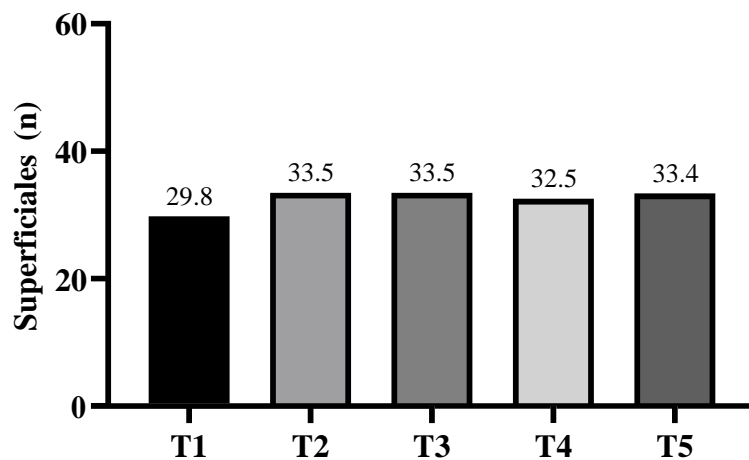


Figura 3: Media y error estándar de las células superficiales observadas mediante citología vaginal durante los cinco días post-retiro de la administración de la progesterona oral. Tukey al 5%.

En el estudio se consideró como monta efectiva al día anterior en el cual se observó espermatozoides en los frotis vaginales que se tomó todas las mañanas a la misma hora.

Al analizar los resultados se determinó que el tratamiento 1 ($1,86 \pm 0,26$ días) y 2 ($2,17 \pm 0,17$ días) necesitaron similares días para la monta efectiva ($P > 0,05$, Fig. 4). Al aplicar dosis altas de progesterona se obtuvieron resultados similares a los establecidos por (Grégoire et al., 2010) quienes, describen que todas las hembras utilizadas en su estudio presentaron síntomas de estro 5 días después de interrumpir el tratamiento en el que también utilizaron Altrenogest. Sin embargo, hay otros autores que mencionan que las hembras recibieron cópula el mismo día que mostraron apertura vaginal y unas pocas necesitaron 2 horas adicionales para la monta efectiva (Norris & Adams, 1979).

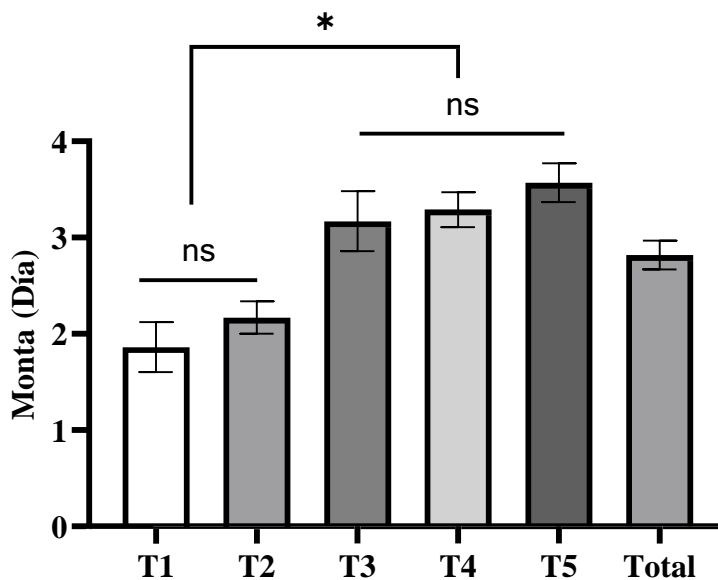


Figura 4: Media y error estándar del día de la monta en las cobayas de los diferentes tratamientos, en los 5 días posteriores al retiro de la administración de la progesterona oral (Altrenogest). T1=0,33mg/kg; T2=0,28mg/kg; T3=0,22mg/kg; T4=0,17mg/kg; T5=0,11mg/kg. Prueba de Tukey al 5%. *=diferencia estadística entre tratamientos.

Los resultados del día del celo y la ovulación fueron analizados en forma general (Fig. 5) en la totalidad de las cobayas en estudio y se observó que tres días posteriores al retiro de la progesterona las cobayas entraron en celo en promedio, esto determinado por la presencia de más del 50% de células superficiales anucleadas observadas en las citologías vaginales. Además, se observó que 48 horas post-celo, en los frotis se encontró la presencia de neutrófilos en porcentajes superiores al 50%, lo cual fue un indicativo de que las cobayas ovularon (Fig. 5). Estos resultados concuerda con los valores determinados por Grégoire et al. (2012), quienes aplicaron 0,1 ml de Altrenogest por 15 días y observaron ovulación entre el 4-5 día post-retiro de la hormona.

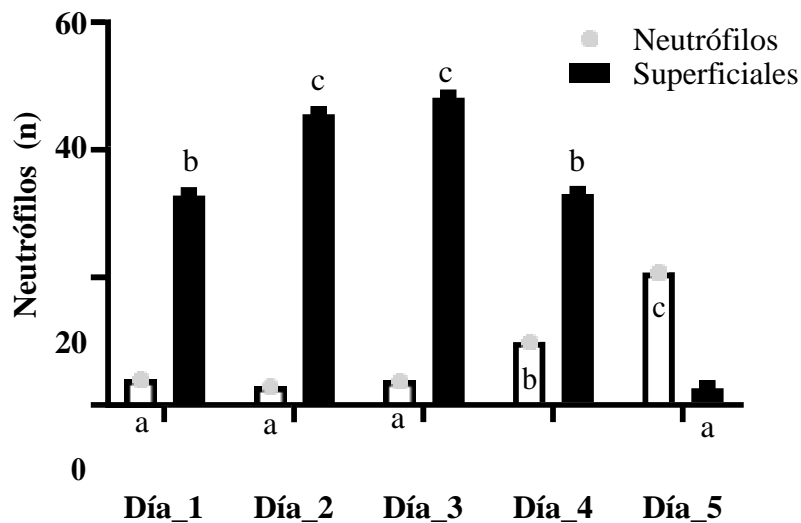


Figura 5: Media y error estándar de las células superficiales y los neutrófilos observados mediante citología vaginal durante los cinco días post-retiro de la administración de la progesterona oral. Tukey al 5%. ab=diferencia entre días

Al organizar los datos del día de la ovulación por cada tratamiento se determinó que el tratamiento 1 presentó neutrófilos en porcentajes altos a partir del día 3 diferenciándose de los tratamientos 2, 3, 4 y 5 a partir de ese día. Sin embargo, los valores de neutrófilos en los tratamientos 2, 3, 4 y 5 al 5 día demuestra valores indicativos de que se produjo la ovulación (Fig. 6).

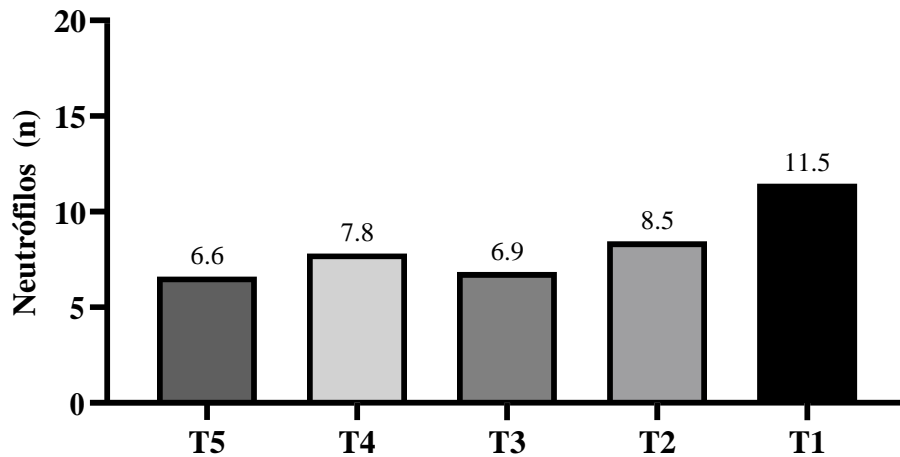


Figura 6: Media y error estándar de los neutrófilos observadas mediante citología vaginal durante los cinco días post-retiro de la administración de la progesterona oral. Tukey al 5%.

Determinación del día óptimo para la recuperación de embriones después de la monta natural de las hembras sometidas a un protocolo de sincronización

A los días 2,5; 3,5 y 4,5 post-monta fueron eutanaseadas dos cobayas por tratamiento (T1; T2; T3, T4 y T5). Luego se recuperó el útero y se realizó el lavado del mismo para recuperar los embriones que estuviesen en los cuernos uterinos.



Imagen 9: Sonda vesical utilizada para colecta de embriones en cobayas

(Fuente: los autores)

Al lavar los cuernos uterinos de las 10 cobayas sacrificadas el día 2,5 post-monta no permitió la recuperación embriones ni estructuras. Iguales resultados obtuvimos al lavar úteros de cobayas 3,5 días post-monta. Sin embargo, en dos de las 10 cobayas sacrificadas el día 4,5 post-monta se logró recuperar una estructura con dos células, dos embriones en estadio de mórula calidad 2 (Fig. 7, Fig. 8 y Fig. 9).

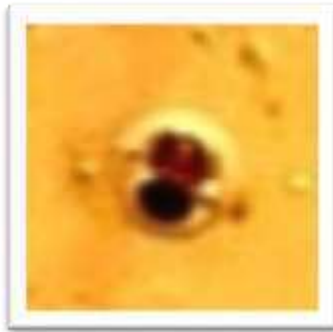


Imagen 10: Estructura con dos células (blastómeras)

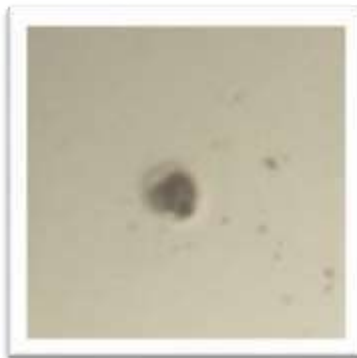


Imagen 11: Mórula, calidad 2



Imagen 12: Mórula, calidad 2

Los resultados de la colecta de embriones producto de una fecundación por monta natural sin estimulación ovárica fueron inferiores a los obtenidos por (Dorsch et al., 2008), quienes colectaron embriones de los oviductos y cuernos uterinos, producidos en forma fisiológica los días 2,5; 4,5 y 6,5 post-monta de la progesterona oral y obtuvieron ($1,73 \pm 0,24$; $1,0 \pm 0,41$ y $1,8 \pm 0,8$ embriones) de 44 cobayas.

De los resultados obtenidos de la colecta de embriones se determinó que al realizar el lavado de los cuernos uterinos de la cobaya y excluir de este proceso a los oviductos, se provocó que en los primeros días de colecta (2,5 y 3,5 días) no se hayan obtenido estructuras en los lavados. Sin embargo, en el lavado del día 4,5 si se obtuvieron embriones lo cual fortalece la tesis mencionada.

Además, se considera pertinente en futuros ensayos el considerar día cero al día en el cual se obtuvieron espermatozoides en el frotis vaginal y no el día de la apertura de la membrana vaginal, ya que esto podría haber contribuido a que en los lavados del día 2,5 aún no se habría producido ni la fecundación.

6. CONCLUSIONES

- Dosis altas de progesterona oral (0,33 mg/kg de peso corporal/día) administrada durante 15 días consecutivos, es más efectiva en la sincronización del celo, comparado con las cobayas que recibieron dosis bajas (0,11 mg/kg)
- La presencia de $\geq 50\%$ células superficiales anucleadas, coincide con la apertura de la membrana vaginal y la presencia del celo.
- Los animales tratados con dosis altas de progesterona necesitan 24 horas post-celo para ser receptivas al macho (monta). Y la ovulación se produce 48 horas post-celo.
- A los 4,5 días post-celo fue el momento que se pudo recuperar embriones de los cuernos uterinos.

7. RECOMENDACIONES

- Reestructurar la metodología de colecta de embriones considerando el día cero al día de la ovulación.
- Buscar alternativas para realizar el lavado de los oviductos para una mejor valoración de la recuperación de embriones en esta especie.
- Realizar estudios de dinámica folicular y desarrollo embrionario in vivo.

8. Bibliografía

- Andrade, et al. (2019). La suplementación con Altrenogest durante las primeras etapas del embarazo mejora el desarrollo embrionario de los cerdos. *Reproducción, Fertilidad y Desarrollo*, 31(1), 152-153.
<https://doi.org/10.1071/RDv31n1Ab54>
- Antonov, A. L. (2017). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction - a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(3), 193-203. <https://doi.org/10.15547/bjvm.997>
- Aragon Cruz, S. (2019). Características macroscópicas, microscópicas, estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas es semen de cuy (*Cavia porcellus*). 103.
http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/4280/253T20190366_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Araníbar, E., & Echevarría, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*cavia porcellus*) Andina y Perú. 25(1), 29-36.
- Arcila, V., Serrano, C., Hernández, M., & Meza, L. (2019). Investigación Estandarización de la citología vaginal exfoliativa correlacionando los niveles séricos de progesterona en perras durante la peri-ovulación.
<https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/viewFile/565/536>
- Ascoli, M., Fanelli, F., & Segaloff, D. L. (2008). A 2002 Perspective. *Structure*, 23(2), 141-174.
- Barahona, M., & Quishpe, O. (2012). Inducción de superovulación en cobayas primerizas, usando gonadotropina sérica con tres dosis diferentes.
- Bischoff, T. L. W. (1852). *Entwicklungsgeschichte des Meerschweinchens*.
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=6DgAAAAQAAJ&oi=fnd&pg=P1&dq=\(Bischoff,+1852\),+&ots=eNC-](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=6DgAAAAQAAJ&oi=fnd&pg=P1&dq=(Bischoff,+1852),+&ots=eNC-)

wvX4mJ&sig=liAa9UVxnyD9oDH7I9BxM585IA4#v=onepage&q=(Bischoff%2C
1852)%2C&f=false

- Bland, K. P. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 73-76.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600073>
- Blatchley, F., & Donovan, B. (1969). Luteolytic effect of prostaglandin in the Guinea pig. *Nature*, 221, 1065-1066.
- Bolton, R. (1979). University of Pittsburgh-Of the Commonwealth System of Higher Education. In *Source: Ethnology* (Vol. 18, Issue 3).
- Cañón. (2018). Caracterización del sistema EGF e IGF-1 en el ovario y su papel en la maduración in vitro de oocitos de cobaya.
- Chatdarong, K., Kampa, N., Axné, E., & Linde-Forsberg, C. (2002). Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats by fluoroscopy and scintigraphy. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(5), 275-281.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00348.x>
- Christie, D. W., Bailey, J. B., & Bell, E. T. (1972). Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *The British Veterinary Journal*, 128(6), 301-308. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)36935-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)36935-X)
- Cinthy Pamela Brenes Jiménez. (2014). Biotecnologías reproductivas en bovinos, sincronización y transferencia de embriones in vivo realizada en el Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Argentina. *Analysis of Micro-Earthquakes in the San Gabriel Mountains Foothills Region and the Greater Pomona Area As Recorded By a Temporary Seismic Deployment*, 1(hal 140), 43.
- Clemons, D., & Seeman, J. (2011). The Laboratory Guinea Pig. In *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951-952.
- Crudeli, G. A., Pellerano, G. S., Olazarri, M. J., Konrad, J. L., Patiño, E. M., & Cedres, J. F. (2008). Efecto de diferentes variables sobre la preñez en búfalas

sometidas a sincronización del celo e inseminación artificial a tiempo fijo.
Revista Veterinaria, 19(1), 14-17.

De Rensis, F., & Kirkwood, R. (2016). Control of estrus and ovulation: Fertility to timed insemination of gilts and sows. *Theriogenology*, 86(6), 1460-1466.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.089>

Díaz. (2008). Evaluación de dos métodos de sincronización de celo en cuyes.
Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.

Diez. (2007). Foro de sincronización de celos en cuyes. <http://perucuy.com>

Dorsch, M. M., Glage, S., & Hedrich, H. J. (2008). Collection and cryopreservation of preimplantation embryos of *Cavia porcellus*. *Laboratory Animals*, 42(4), 489-494. <https://doi.org/10.1258/la.2007.007011>

Dorsten, C. M., & Cooper, D. M. (2004). Use of body condition scoring to manage body weight in dogs. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 43(3), 34-37.

Echeverría. (2006). - Endocrinología Reproductiva: Prostaglandina F2a en vacas. Revisión bibliográfica (Reproductive Endocrinology: F2a Prostaglandin in cows. A Review). *Redvet*, VII(1), (12 pg, 215 KB).

Esquivel. (2006). Fisiología de la Reproducción del Cuy (Segunda).

Geréz, P. F. G., & Gullace, F. A. (2011). Reproducción en Animales de Laboratorio. Técnicas Para Bioterio IV, 1-22.
<http://dpd.fvet.uba.ar/cartelera/00010199.pdf>

Gonzalo, A. (2018). Fisiología Reproductiva de los Cobayos. Asociación de Porcicultores Ecuador, 1.
<https://www.aspe.org.ec/index.php/informacion/estadisticas/datos-porcicola-2011>

Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M., &

- Joly, T. (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842-847.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Grégoire, Anne, Joly, T., Huamán, E., Silva, R., & León, S. (2010). Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones. *Bulletin de l'Institut Français d'études Andines*, 39(39 (1)), 185-188. <https://doi.org/10.4000/bifea.2164>
- Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., & Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology*, 77(8), 1549-1556. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.022>
- Hunter, R. H. F., Hunt, D. M., & Chang, M. C. (1969). Temporal and cytological aspects of fertilization and early development in the guinea pig, *Cavia porcellus*. *The Anatomical Record*, 165(3), 411-429.
<https://doi.org/10.1002/ar.1091650310>
- IETS. (2011). Manual De La Sociedad Internacional De Transferencia De Embriones. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 44(8), 220-237.
- Javier, B., & Leyton, K. (n.d.). INTRA-UTERINO POR OCLUSIÓN PROGRESIVA DE ARTERIAS UTERINAS EN COBAYAS René Augusto Alegría Vera
INTRA-UTERINO POR OCLUSIÓN PROGRESIVA DE René Augusto Alegría Vera.
- Kustritz, M. V. R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66(3 SPEC. ISS.), 567-574.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.003>
- Leigh, O., Raji, L., & Diakodue, E. (2013). Detection of Standing Heat In Bitches: Application of Vaginal Cytology. *World J Life Sci. and Medical Research World Journal Life Science and Medical Research*, 3213(11), 21-25.
<http://rrpjournals.org>

- Linde, C., & Karlsson, I. (1984). The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 25(2), 77-82. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1984.tb00449.x>
- Mellisho, E. (2010). *Manual de reproducción animal*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. p.12, undefined-.
- Mise Chango, M. (2014). Evaluación de la crioconservación del semen de Cobayo (*Cavia Porcellus*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2863>
- Moore, J., & Tozer, F. (1908). On the Maturation of the Ovum in the Guinea-pig. <https://royalsocietypublishing.org/>
- Myers, H., Young, W., & Dempsey, E. (1936). Graafian follicle development throughout the reproductive cycle in the guinea pig, with especial reference to changes during oestrus (sexual receptivity).
- N. Márquez, R. Valencia, L. Chauca, L. T. (2007). Descripción Anatómico del Glande del Cuy (*Cavia Porcellus*) Raza Perú. *Inia*, 2-4.
- Noonan. (1994). The guinea pig (*Cavia porcellus*). *Anzccart News*, 7(3), 1-7.
- Norris, M. L., & Adams, C. E. (1979). The vaginal smear, mating, egg transport and preimplantation development in a wild guinea-pig, the cuis (*Galea musteloides*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 55, 457-461.
- Oñate. (2012). Evaluación de Dos Métodos de Sincronización del Estro en Cuyes. <Http://Dspace.Espoch.Edu.Ec/Handle/123456789/1612>.
- Rieck, G., & Kratzheller, K. (1955). Zytologie des desquamierenden Vaginalepithels der Hündin und ihre Anwendung für die Zyklusdiagnostik. *Zentralblatt Der Veterinärmedizin*, 2, 82-101. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1439-0442.1955.tb00058.x>

- Rosales, C., Ayala, L., Aguilar, Y., Dután, J., & Taboada, J. (2017). Niveles de testosterona total en cuyes (*Cavia porcellus*) extirpados las espículas peneanas, castrados químicamente y enteros y relación con tamaño testicular y vesícula seminal. *Revista Electronica de Veterinaria*, 18(12).
- Roy, M. M., Goldstein, K. L., & Williams, C. (1993). Estrus termination following copulation in female guinea pigs. In *Hormones and Behavior* (Vol. 27, Issue 3, pp. 397-402). <https://doi.org/10.1006/hbeh.1993.1029>
- Sadeu, J. C., Adriaens, I., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, 68(9), 1228-1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.028>
- Sara. (2000). Inseminación artificial: usted lo puede hacer ahora. <http://www.produccionbovina.com>.
- Schutte, A. P. (1967). Canine Vaginal Cytology—I Technique and Cytological Morphology. *Journal of Small Animal Practice*, 8(6), 301-306. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1967.tb04554.x>
- Solorzano. (2014). Crianza, producción y comercialización de Cuyes. <https://books.google.com.ec/books?id=DYlvDgAAQBAJ&pg=PT188&dq=aliaga+y+caycedo+producción+de+cuyes&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjN2pjChNfzAhUykWoFHepHCbgQ6AF6BAgHEAI#v=onepage&q=aliaga+y+caycedo+producción+de+cuyes&f=false>
- Stan, F. G. (2015). Anatomical Particularities of Male Reproductive System of Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 72(2). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:11410>
- Stockard, C., & Papanicolau, G. (1917). The existence of a typical oestrous cycle in the guinea pig with a study of its histological and physiological changes.
- Suzuki, O., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y., & Matsuda, J.

- (2003). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Molecular Reproduction and Development*, 64(2), 219-225. <https://doi.org/10.1002/mrd.10242>
- Ueda, H., Kosaka, T., & Takahashi, K. (1998). Intraperitoneal insemination of the guinea pig with synchronized estrus induced by progesterone implant. *Exp. Animal*, 47, 271-275.
- Vázquez, B., & Del Sol, M. (2010). Estudio Morfológico de la Próstata y Glándulas Vesiculares de Cobayo (*Cavia porcellus*) Morphologic Study of the Prostate and Vesicular Glands of the Guinea Pig (*Cavia porcellus*). In *Int. J. Morphol* (Vol. 28, Issue 4).
- Villamarín, K. (2016). Evaluación de dos crioprotectores (Etilenglicol y Propilenglicol) en la conservación lenta de ovocitos en cobayos (*cavia porcellus*) en el Laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria”. *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad*, 1, 101. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Vivas Torrez, J. A. (2009). *Universidad Nacional Agraria Especies Alternativas : manual de crianza de cobayos (Cavia porcellus)*. 49.
- Wagner, J. E., & Manning, P. J. (1976). *The Biology of Guinea Pig*.
- Wang, J., Liu, Z., Sun, Q., Xia, S., Cui, J., Yang, L., An, L., Zhang, J., Su, L., Su, Y., & Du, F. (2019). Combined treatment with cysteamine and leukemia inhibitory factor promotes guinea pig oocyte meiosis in vitro. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7479. [/pmc/articles/PMC6943477/](https://pmc/articles/PMC6943477/)
- Wright, P. J., & Parry, B. W. (1989). Cytology of the canine reproductive system. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 19(5), 851-874. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(89\)50102-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(89)50102-5)
- Young, W. C., Dempsey, E. W., & Myers, H. I. (1935). Cyclic reproductive behavior

in the female guinea pig. *Journal of Comparative Psychology*, 2, 313-335.

Anexos.



Anexo 1: Identificación de las cobayas



Anexo 2: Dosificación de la progesterona oral



Anexo 3: Administración de la progesterona oral



Anexo 4: Eutanasia de cobaya



Anexo 5: Recuperación del aparato reproductor de la cobaya

PLANIFICACION DE TRABAJOS DE CAMPO

SEMANA 01

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				

● inicio de aplicación de herbicidas (17 de enero), finaliza el 21 de enero

● 2 de febrero (14) inicio aplicación de BHC, CS, etc.

● Primer aplicación a las 08 horas (13, 14h)

● Segundo aplicación a las 04 horas (17, 18h)

● Tercer aplicación a las 10h horas (21, 22h)

Anexo 6: Plantilla de planificación de trabajo de campo.

Grupo	Individuo	Fecha de nacimiento	Fecha de inicio	Fecha de fin	Estado	Observaciones	Fecha de eutanasia	Hora de eutanasia	Lugar de eutanasia	Nombre del investigador
T1	G1									
	G2									
	G3									
	G4									
T2	G1									
	G2									
	G3									
	G4									
T3	G1									
	G2									
	G3									
	G4									
T4	G1									
	G2									
	G3									
	G4									

Anexo 7: Plantilla de cronograma de eutanasia de las cobayas.