

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### **Características ováricas y hormonales de la cobaya en diferentes etapas del ciclo estral**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista

#### **Autoras:**

Karen Paulina Iglesias Barahona

Pamela Michelle Guamán Garzón

#### **Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

**Cuenca, Ecuador**

2023-09-26

## Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo, evaluar las características ováricas y hormonales de la cobaya post-sincronización de celo con progesterona oral. El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Se emplearon 43 cobayas entre 4 y 5 meses de edad, con un peso promedio de  $886,2 \pm 12,80$  gramos, fueron sincronizadas durante 15 días con progesterona (P4) oral (Altrenogest) para la posterior valoración de la membrana vaginal, citología, toma de muestras sanguíneas, evaluación de la morfología ovárica, recuento de folículos antrales y cuerpo lúteo, así como la clasificación de COC's obtenidos en cinco momentos del ciclo estral (día 15, 1, 4, 8 y 11). Los resultados demostraron que la administración oral de P4 en dosis de 0,22 mg/kg de peso vivo durante 15 días permitió que el 94,1% de cobayas presentaran apertura de membrana vaginal (AMV). Se determinó una media de 30,1 folículos antrales de diferentes tamaños disponibles para aspiración, es decir 15,1 folículos/ovario. Recolectándose 1249 COC's aptos mediante la técnica de aspiración folicular, de los cuales 61,5% provinieron de folículos entre (0,5-1 mm), 60% (menores a 0,5 mm) y 71,4% (mayores a 1 mm). En conclusión, se ratifica que la dinámica folicular en la cobaya es bifásica, además, el cuerpo lúteo tiene fase de crecimiento, estática y regresión y que el folículo preovulatorio llega a medir entre 0,5 a 1 mm y que esta clase de folículos son los que proporcionan COC's de mayor calidad.

*Palabras clave:* ciclo estral, cuerpo lúteo, progesterona, cobaya, folículos



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

**Repositorio Institucional:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

The objective of this research was to evaluate the ovarian and hormonal characteristics of the guinea pig after heat synchronization with oral progesterone. The study was carried out in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Cuenca. Forty-three guinea pigs between 4 and 5 months of age were used, with an average weight of  $886,2 \pm 12,80$  grams, they were synchronized for 15 days with oral progesterone (P4) (Altrenogest) for the subsequent assessment of the vaginal membrane, cytology, blood sampling, evaluation of ovarian morphology, antral follicle count and corpus luteum, as well as the classification of COC's obtained at five moments of the estrous cycle day (15, 1, 4, 8 and 11). The results showed that the oral administration of P4 at a dose of 0.22 mg/kg of body weight for 15 days allowed 94.1% of guinea pigs to present vaginal membrane opening (AMV). A mean of 30.1 antral follicles of different sizes available for aspiration was determined, that is, 15.1 follicles/ovary. Collecting 1,249 suitable COC's through the follicular aspiration technique, of which 61.5% come from follicles between (0.5-1 mm), 60% (less than 0.5 mm) and 71.4% (greater than 1 mm). In conclusion, it is confirmed that the follicular dynamics in the guinea pig is biphasic, in addition, the corpus luteum has a growth, static and regression phase and that the preovulatory follicle measures between 0.5-1 mm and that this class of follicles are the ones that provide COC's of the highest quality.

*Keywords:* estrous cycle, corpus luteum, progesterone, guinea pig, follicles



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

Introducción .....	14
Objetivos.....	16
2.1 Objetivo General.....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
Revisión de Literatura .....	17
3.1 Importancia del cobayo en el Ecuador.....	17
3.2 Nutrición .....	17
3.3 Economía .....	17
3.4 Experimentación.....	17
3.5 Características generales del cobayo .....	18
3.5.1 Aparato reproductor de la hembra.....	18
Ovario .....	18
Oviducto .....	18
Útero.....	18
Cuernos y cuerpo uterino.....	19
Vagina .....	19
Vulva.....	19
3.5.2 Parámetros reproductivos .....	19
3.5.3 Reproducción.....	19
3.5.4 Madurez sexual.....	20
3.5.5 Fisiología ovárica .....	20
Ovogénesis.....	20
Foliculogénesis .....	20
3.5.6 Dinámica folicular.....	21
3.5.7 El ciclo estral.....	21
3.5.8 Cambios hormonales .....	22
3.5.9 Morfología reproductiva.....	22

3.6 La membrana vaginal en la detección del celo .....	23
3.6.1 Definición .....	23
3.7 Variación celular según la etapa del ciclo estral.....	24
3.7.1 Proestro .....	24
3.7.2 Estro .....	24
3.7.3 Metaestro .....	24
3.7.4 Diestro .....	24
3.8 Protocolos de sincronización del celo .....	24
3.8.1 Ventajas .....	24
3.8.2 Desventajas .....	24
3.8.3 Métodos de Sincronización .....	25
3.9 Avances biotecnológicos .....	26
3.9.1 Caracterización morfométrica de los ovocitos .....	26
3.9.2 Clasificación de los ovocitos .....	27
3.9.3 Recuperación del complejo cúmulo-ovocito .....	27
3.9.3.1 Técnica de aspiración folicular .....	27
3.10 Evaluación de la competencia ovocitaria .....	28
3.10.1 Medios de maduración .....	28
3.10.2 Tinción Hoechst (fluorocromo) .....	29
3.10.3 Maduración del ovocito .....	29
3.10.4 Determinación del estadio nuclear .....	29
3.10.5 Maduración citoplasmática.....	30
3.11 Maduración del ovocito <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i> .....	30
3.12 Clasificación conformacional de la vesícula germinal (GV) .....	30
4. Materiales y métodos .....	31
4.1 Materiales.....	31
4.1.1 Materiales Físicos .....	31
4.1.2 Materiales Biológicos .....	31
4.1.3 Materiales Químicos .....	31

4.1.4 Materiales de Laboratorio.....	31
4.2 Métodos .....	32
4.2.1 Área de estudio.....	32
4.2.2 Animales y granja.....	33
4.2.3 Diseño experimental .....	33
4.2.4 Protocolo de sincronización del celo .....	34
4.2.5 Valoración de la apertura de la membrana vaginal.....	34
4.2.6 Citología vaginal.....	35
4.2.7 Protocolo de evaluación de variables en cinco momentos diferentes del ciclo estral .....	36
4.2.8 Toma de muestras de sangre y eutanasia de las cobayas .....	37
4.2.9 Valoración de la morfología de los ovarios, folículos antrales y cuerpo lúteo .....	37
4.2.10 Valoración de COC´s .....	39
4.2.11 Determinación de la morfometría del ovocito .....	41
4.3 Análisis estadístico .....	42
5. Resultados y discusión .....	43
5.1 Evaluación del porcentaje de cobayas que mostraron apertura de la membrana vaginal (AMV).....	43
5.2. Citología Vaginal para determinar el día del celo y la ovulación .....	44
5.3 Determinación de los niveles de progesterona en sangre y diámetro del CL, en cinco momentos diferentes .....	46
5.4 Recuento de folículos antrales (FA) en cinco momentos diferentes.....	48
5.5 Evaluación del porcentaje de recuperación de ovocitos.....	50
5.6 Diámetro ovocitario y grosor de la zona pelúcida en ovocitos aspirados de folículos de diferentes tamaños .....	52
5.6.1 Ovocitos aspirados de folículos de tamaño >1 mm .....	52
5.6.2 Ovocitos aspirados de folículos de tamaño entre 0,5-1 mm .....	53
5.6.3 Ovocitos aspirados de folículos <0,5 mm .....	54

5.6.4 Diámetro ovocitario y grosor de la zona pelúcida en ovocitos provenientes de folículos >1mm, entre 0,5-1mm y <0,5 mm independientemente del momento de la valoración .....	54
6. Conclusiones .....	56
7. Recomendaciones .....	57
8. Referencias.....	58
9. Anexos.....	67

## Índice de figuras

Figura 1: Ubicación satelital del área de estudio .....	33
Figura 2: Protocolo de sincronización del celo de las cobayas: día 0=inicio del protocolo, aplicación de progesterona oral (Altrenogest) hasta el día 15. AMV=valoración de la apertura de la membrana vaginal. CIT=citología vaginal, a partir de la observación del 50% de apertura de la membrana vaginal.....	34
Figura 3: Apertura de la membrana vaginal. Panel 1: MV= membrana vaginal cerrada 0%. Panel 2: MV=50% de apertura de la membrana vaginal. Panel 3: membrana vaginal abierta 100% .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 4: Presencia de diferentes tipos de células desde la apertura de la membrana vaginal (25%) hasta el cierre de la misma. Panel 1: Presencia de células superficiales (celo). Panel 2: presencia de neutrófilos (ovulación). Panel 3: Células parabasales (metaestro). .....	36
Figura 5: Protocolo de valoración del tamaño, peso del ovario, CL, folículos y células vaginales en cinco momentos diferentes: día 15 (último día de la administración de P4; números color rojo), día 1 (del ciclo estral en estudio; número color negro), día 4, día 8 y día 11).....	36
Figura 6: Tamaño del ovario: Panel 1, ovario derecho (ancho=4,40mm + 6,80mm largo) Panel 2, ovario izquierdo (A=ancho; B=largo) .....	38
Figura 7: Tamaño del cuerpo lúteo (CL): Panel 1, CL derecho (ancho=1,12mm + 1,39mm largo) Panel 2, CL izquierdo (A=ancho; B=largo) .....	38
Figura 8: Tamaño del folículo antral (FA): Panel 1, FA en ovario derecho. Panel 2, FA en ovario izquierdo.....	39
Figura 9: aspiración de folículos antrales de cobaya.....	40
Figura 10: COC's de tipo A.....	40
Figura 11: COC's de tipo B.....	41
Figura 12: COC's de tipo C.....	41
Figura 13: COC's de tipo D.....	41
Figura 14: Porcentaje de cobayas que presentaron apertura de la membrana vaginal (Panel 1). Día del protocolo en el cual se detectó apertura de la MV en las cobayas sincronizadas y que entraron en celo (Panel 2).....	43
Figura 15: Porcentaje de células determinadas mediante citología vaginal en los días 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 del protocolo de sincronización. *=diferencia estadística en el porcentaje de células de una categoría. Tukey al 5%.....	45
Figura 16: Concentración de progesterona (Panel A) y diámetro del cuerpo lúteo (Panel B), valorado en cinco momentos diferentes: último día de aplicación de la progesterona oral (D15), día 1 del nuevo ciclo estral, día 4, día 8, día 11 del ciclo estral. Prueba de Tukey al 5% .....	46

Figura 17: Número promedio de folículos antrales; mayores a 1 mm ( $F > 1\text{mm}$ ); folículos con tamaños entre 0,5 y 1 mm ( $F_{0,5-1\text{mm}}$ ) y folículos menores a 0,5 mm ( $F < 0,5\text{ mm}$ ), observados en cinco momentos diferentes, días: 15, 1, 4, 8 y 11. ab=diferencia estadística entre grupos valorados en un mismo momento ( $p < 0,05$ ) ..... 49

Figura 18: Número promedio de ovocitos recuperados por aspiración de folículos mayores a 1 mm ( $F > 1\text{mm}$ ); folículos con tamaños entre 0,5 y 1 mm ( $F_{0,5-1\text{mm}}$ ) y folículos menores a 0,5 mm ( $F < 0,5\text{ mm}$ ), observados en cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8 y 11. ab=diferencia estadística entre grupos valorados en un mismo momento ( $p < 0,05$ ) ..... 51

Figura 19: diámetro promedio del citoplasma y de la zona pelúcida de los ovocitos, aspiración de folículos mayores a 1 mm ( $F > 1\text{mm}$ ), en cuatro momentos diferentes: día 15, 1, 8 y 11 . 53

Figura 20: diámetro del citoplasma y la zona pelúcida de ovocitos aspirados de folículos con tamaños entre 0,5 y 1 mm ( $F_{0,5-1\text{mm}}$ ), en cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8 y 11. .... 53

Figura 21: diámetro del citoplasma y la zona pelúcida de ovocitos aspirados de folículos con tamaños menor a 0,5 mm ( $F < 0,5\text{mm}$ ), en cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8 y 11. 54

Figura 22: Diámetro del citoplasma y grosor de la zona pelúcida de ovocitos aspirados de folículos con tamaños mayores a 1mm; entre 05-1mm y menor a 0,5 mm durante la valoración del experimento. .... 55

## Índice de tablas

Tabla 1: Peso y diámetro promedio de ovario derecho (OD) e izquierdo (OI), valorado en cinco momentos diferentes del estudio .....	47
Tabla 2: Peso promedio de las cobayas, ovarios e índice gonadosomático, valorado en cinco momentos diferentes del estudio. ....	48
Tabla 3: Porcentaje de complejos cúmulo ovocitos (COC´s) encontrado en cada una de las categorías de folículos durante el experimento. ....	52

## Agradecimientos

A Dios por ser mi guía durante toda mi carrera universitaria.

A mis padres Ramón y Alexandra quienes han sido el motor que me motiva a cumplir mis sueños, gracias por estar siempre a mi lado apoyándome e impulsándome a ser cada día mejor persona.

A mis hermanas Alex y Sofi, por apoyarme en todo momento y nunca dejarme caer.

A mi abuelita, novio, a mis tíos Cristian y Vanessa, a mis primas Sofi y Vane por ser mis guías y mi apoyo incondicional.

Como no agradecer al doctor Luis Ayala quien con su sabiduría y capacidad hizo que todo lo que un día soñamos se hiciera realidad.

Al doctor Xavier Samaniego, Andrés Jácome, Gabriela Garay y Mauricio Duma por brindarme sus conocimientos, por su paciencia y dedicación.

**Karen Paulina Iglesias Barahona**

En primer lugar, agradezco a Dios después a mis padres, mis hermanos, mi esposo y mi hijo por su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años de trayectoria que me han sabido dar las fuerzas necesarias para contribuir con todo esto.

Como no mencionar a quienes en el ámbito académico han sabido darme una mano como es mi compañera de tesis Karen una gran amiga siempre impartiendo sus conocimientos conmigo, a Erika siempre dándome palabras de aliento y por ser esa amiga incondicional; y sobre todo a nuestro tutor de tesis Dr. Luis Ayala que ha sido nuestro pilar fundamental en todo este arduo trabajo, agradecerle por el tiempo prestado, la paciencia y por compartirnos sus conocimientos. Al Dr. Xavier Samaniego y aquellos técnicos de laboratorio que nos brindaron su tiempo para el trabajo práctico.

**Pamela Michelle Guamán Garzón**

## Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres quienes han sido mi mayor motivación y me han dado la fuerza para culminar esta etapa tan importante.

A mi abuelita Beatriz quien me dejó su legado de amor y disciplina.

### **Karen Iglesias**

Este trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios por darme la fortaleza para haber llegado hasta aquí, luego a mis padres Marcelo y Susana por darme su amor, educación, entrega, enseñanzas, fortaleza y sobre todo apoyo incondicional que me brindaron para cumplir un meta más en mi vida. A mi familia; mi esposo Andrés por enseñarme que todo sacrificio vale la pena, y en especial a mi pequeño hijo Emilio; mi más grande inspiración; ustedes son el motivo para seguir luchando todos los días, gracias, por tanto. A mis hermanos Juan Diego y Paula por siempre darme esos consejos de superación. Y como olvidar de mis pequeñas sobrinas Emily y Luciana por su amor.... Gracias a todos ustedes por formar parte muy importante en mi vida y ser el motivo de superación. Esto es por y para ustedes.

### **Michelle Guamán**

## Lista de abreviaturas

**MO:** Multiovulación.

**PIVE:** Producción de embriones *in vitro*.

**FSH:** Hormona folículo estimulante.

**CL:** Cuerpo lúteo.

**LH:** Hormona luteinizante.

**P4:** Progesterona.

**PGF2 $\alpha$ :** Prostaglandina F2 alfa.

**GnRH:** Hormona gonadotrópica.

**COC's:** Células del cumulo.

**BFS:** Suero fetal bovino.

**BSA:** Seroalbúmina bovina.

**GV:** Vesícula germinal.

**GVBD:** Ruptura de la vesícula germinal.

**CC:** Condición corporal

**AMV:** Valoración de la apertura de la membrana vaginal

**CIT:** Citología vaginal

**IGS:** Índice gonadosomático

**FA:** Folículo antral

## Introducción

El Cobayo (*Cavia porcellus*) es un mamífero originario de la zona Andina, representa un producto de la gastronomía ecuatoriana que destaca por su carne de gran valor nutritivo, además es un animal con alta prolificidad y precocidad; y que producto de la comercialización, es una fuente importante de ingresos para las familias ecuatorianas (Santos, 2007).

El empleo de cobayos como animales de experimentación ha ido en paralelo al desarrollo de la biomedicina, siendo este un excelente modelo de estudio para la reproducción en la especie humana (Grégoire et al., 2012), la principal ventaja de esta especie radica en que posee un ciclo estral completo a diferencia de la rata y el ratón (Suzuki et al., 2003). Sin embargo, el uso del cobayo tanto para fines comerciales y/o experimentales tienen una gran limitante, que es el pequeño tamaño de la camada ya que solo se pueden obtener pocos embriones en fase de pre-implantación de una hembra (Dorsch et al., 2008).

Con el fin de aprovechar al máximo el potencial genético del cobayo se han implementado biotécnicas reproductivas como la multiovulación (MO) (Grégoire, et al., 2012) y la producción de embriones *in vitro* (PIVE) (Solís & Chávez, 2015). Sin embargo, para producir embriones de cobaya (mórulas y/o blastocistos tempranos) e implementar la técnica de transferencia de embriones (hembras receptoras sincronizadas), es necesario conocer la fisiología ovárica de esta especie, tal como las fases del ciclo estral (Touma et al., 2001), concentraciones hormonales (Hutz & Bejvan, 1990), número y tamaño de los folículos antrales, así como el momento de la ovulación (Wilson et al., 2021).

La valoración de la membrana vaginal es clave para la detección del celo, ya que esta estructura es parte externa de los genitales de la hembra y está ausente por 3 a 7 días coincidiendo con la etapa de celo; luego de 1 a 1,5 días de la apertura de dicha membrana ocurrirá la ovulación (Araníbar & Echevarría, 2014). El desarrollo folicular comienza un día después de la ovulación y consiste en dos ondas; la primera culmina en los días 10 a 11 y la segunda termina con la ovulación (Bland, 1980). Las fases del ciclo estral pueden ser diferenciadas fácilmente mediante citología vaginal con el fin de evaluar la variabilidad celular y su relación con la etapa del ciclo estral en la cual se encuentran (Noonan, 1994).

Según Kühnel & Mendoza, (1992) en la cobaya, el proestro se caracteriza por la presencia de abundante mucus y células intermedias grandes y pequeñas; en el estro se observa gran cantidad de células superficiales, de forma poliédrica y de núcleo picnótico; además, se pueden encontrar células superficiales anucleares; en el metaestro se observa escasa

cantidad de leucocitos, células intermedias con reducida cantidad de células superficiales; y en el diestro existe mayor cantidad de leucocitos pero escasa cantidad de células intermedias.

Según Barahona & Quishpe, (2012), los ovarios en las cobayas se diferencian por su forma ovoide, y por ser órganos intraabdominales, recubiertos por una membrana serosa o llamada también bolsa ovárica, aproximadamente miden de 0,3 a 0,6 cm de largo y de 0,2 a 0,4 cm de ancho y están ubicados en la parte craneal de los cuernos uterinos. Los niveles de progesterona secretada por el ovario varían considerablemente según el día del ciclo estral, siendo elevados en la fase lútea debido a la presencia de un cuerpo lúteo (CL) funcional (Shi et al., 2000).

El uso de un progestágeno durante un periodo relativamente largo permite predecir el momento del estro con un grado razonable de precisión, reduciendo el tiempo requerido para su detección (Fernández, 2003).

Para profundizar en el conocimiento de la fisiología ovárica de la cobaya, se indujo el celo en 35 de 44 hembras, empleando 0,22 mg/Kg progesterona oral (Altrenogest) durante 15 días, provocando ovulación entre 4 a 5 días post retiro de la fuente de progesterona (Grégoire et al., 2012). La sincronización del celo permite valorar la dinámica folicular de las cobayas en diferentes estadios del ciclo estral, determinar el tamaño y las características del cuerpo lúteo y de los ovarios, así como también de las concentraciones de progesterona sanguínea. Además, se podrá determinar las características de los COC's en las diferentes fases del ciclo estral en dicha especie.

## 1. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Evaluar las características ováricas y hormonales de la cobaya post sincronización del celo con progesterona oral

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de progesterona en sangre en 5 momentos diferentes del ciclo estral en cobayas.
- Caracterizar la morfología del ovario, folículos y cuerpos lúteos en cobayas sincronizadas con progesterona oral.
- Describir las características morfológicas de los COC's de cobayas recuperados por aspiración folicular en diferentes etapas del ciclo estral.

### 3. Revisión de Literatura

#### 3.1 Importancia del cobayo en el Ecuador

El cuy (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. En nuestro país forma parte de la cultura familiar campesina de la región Sierra, sin lugar a duda el cuy tiene gran popularidad ya que se encuentra arraigado en las familias de las comunidades rurales de la serranía, esto se manifiesta especialmente en las grandes cantidades de carne de cuy que se consume como plato principal en época de fiestas pueblerinas (Reyes et al., 2021).

#### 3.2 Nutrición

El cobayo constituye un producto alimenticio de alto valor nutritivo que favorece a la seguridad alimentaria mayormente de la población rural. El cobayo es un animal que no exige cuidados complicados; su carne es una de las más ricas y nutritivas presentando una buena alternativa para elevar los estándares de vida en las comunidades (Vivas, 2009).

La carne de dicho animal se caracteriza por su alto valor proteico (20,3%), su bajo contenido en colesterol (65 mg/100g) y grasas (menor al 10%) lo cual le convierte en un alimento fácilmente integrable en la alimentación de todas las personas incluido niños, adolescentes, mujeres, deportistas, personas adultas y de la tercera edad, contribuyendo a una dieta saludable y equilibrada (Balgobin et al., 2013).

#### 3.3 Economía

La importancia económica del cuy radica en que, desde su crianza, producción, y comercialización es generadora de fuentes de trabajo para campesinos, emprendimientos de curanderos, vendedores de insumos, restaurantes y para la exportación. Por esto *Cavia porcellus* está considerado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como fuente de seguridad alimentaria de la población mundial de bajos recursos económicos (Campoverde et al., 2018).

#### 3.4 Experimentación

Como animal experimental en los bioterios, es decir la unidad donde se alojan los animales que son utilizados con fines experimentales, de enseñanza o pruebas de control, se les aprecia por su temperamento tranquilo, pero se logra un manejo intensivo al que son expuestos los mismos (Taylor & Lee, 2012).

La producción de carne de cobayo se ha convertido en el principal rubro empresarial capaz de permitir utilidades superiores a las generadas por otras actividades pecuarias, debido a la

creciente demanda de su carne lo cual incentivó a los investigadores a realizar importantes avances en el mejoramiento genético permitiendo destacar en los mercados regionales y el nacional (Santos, 2007).

### **3.5 Características generales del cobayo**

#### **3.5.1 Aparato reproductor de la hembra**

Los órganos del aparato reproductor de la hembra incluyen: ovarios, oviductos, útero, vagina y genitales externos. Los genitales internos están sostenidos por el ligamento ancho, este consta de mesoovario que sostiene al ovario el mesosalpinx al oviducto y el mesometrio al útero. Los ovarios y el útero desembocan en la vagina y esta presenta un pliegue en forma de “Y” (Hargaden & Singer, 2012).

#### **Ovario**

Son una combinación de la glándula exocrina y endocrina, es decir origina tanto ovocitos como hormonas ováricas, principalmente estrógenos y progesterona. Los ovarios varían de tamaño y aproximadamente miden entre 1,5 a 2 cm, sin embargo, pueden presentar variación en cualquiera de los dos ovarios. Su estructura normal depende de la edad, y la fase del ciclo sexual (Touma et al., 2001).

#### **Oviducto**

Se encuentra lateral a la bolsa ovárica y su principal función es el transporte de gametos, capacitación espermática segmentación embrionaria y transporte sincronizado del embrión hacia el útero para su posterior anidación (Laik et al., 2017).

El oviducto de la cobaya mide 57 mm de largo por 1,5 mm de diámetro; se encuentra dividido en tres partes: infundíbulo, ampolla e istmo indispensables para el transporte del óvulo a los cuernos uterinos (Aliaga et al., 2009).

#### **Útero**

Es un órgano bicorne en forma de V, cuerpo corto y aplanado miden un promedio de 30 a 50 mm de largo x 3 mm de ancho. Su principal función es recibir al embrión para su implantación y nutrición (Bertram et al., 2018). El lado dorsal del útero está conectado con el recto y el lado ventral se encuentra contiguo a los intestinos (Cañón et al., 2015).

### **Cuernos y cuerpo uterino**

El cuerpo uterino es corto y aplanado dorso ventralmente mide 13 mm de largo y 7 mm de ancho. El cuello es una porción del útero que tiene una consistencia dura ya que está formada por una estructura muscular gruesa (Pilny, 2014).

### **Vagina**

Tubo de músculo fibroelástico con una longitud de 3 mm y se ubica en la cavidad pelviana dorsalmente al recto y ventralmente con la vejiga (Reyes et al., 2021). Se encuentra recubierta con epitelio secretorio y cilíndrico estratificado, con abundantes glándulas secretoras de mucina, sentándose sobre una capa de tejido de colágeno ricamente vascularizado (Hargaden & Singer, 2012). Una característica que la distingue de otros roedores es que posee una membrana epitelial que cubre el orificio vaginal a excepción del estro y el parto (Grégoire, et al., 2012).

### **Vulva**

Presenta una abertura externa en forma de Y invertida, está compuesta por una escotadura que conforman el meato urinario con aspecto similar al esfínter anal (Cedano, 2016). En la porción dorsal de esta estructura se encuentra el clítoris (Solís & Chávez, 2015).

### **3.5.2 Parámetros reproductivos**

En condiciones de salud y condición corporal adecuadas las hembras pueden ser muy prolíficas debido a la presencia del celo post parto, esta característica reproductiva se usa para asegurar la producción máxima de gazapos al año. Dentro de los parámetros reproductivos más importantes según Pignon & Mayer (2020) son:

- **Fertilidad:** 95%
- **Tamaño de camada al primer parto:** 2,22 crías
- **Peso al nacimiento:** 176 gramos (g)
- **Peso al destete:** 200 - 300 gramos (g)
- **Madurez sexual:** 55 - 70 días
- **Empadre:** 542 gramos (g)

### **3.5.3 Reproducción**

En las explotaciones pecuarias es importante el manejo de las diferentes etapas reproductivas con la finalidad de obtener éxito en la crianza, siempre manteniendo mayor cuidado en las fases de empadre, gestación, parto, lactancia, destete y selección de la cría

(Balgobin et al., 2013). Los cuyes son animales de reproducción rápida y prolífica pudiendo reproducirse durante todo el año. El cuy hembra se caracteriza principalmente por ser poliéstrica y múltipara, su reproducción está influenciada por diversos factores principalmente por el estrés causado por agitación, transporte, peleas y cambios en la nutrición (Grégoire, et al., 2012).

### **3.5.4 Madurez sexual**

Es la etapa en la cual las cobayas producen gametos fértiles y representa el inicio de su comportamiento reproductivo, es el estado de transición entre la inmadurez y la madurez sexual en donde resalta su conducta de territorialidad, apareamiento y cuidado de las crías, entre otras; para que todo ello ocurra es necesario que el animal alcance la talla y peso adecuados, teniendo la raza un efecto significativo sobre la aparición del primer estro, así como el ambiente y el estado nutricional (Echeverría, 2005).

En las cobayas la madurez sexual se presenta entre 55 a 70 días de edad, esto dependiendo de la línea y alimentación que se les proporcione. Frecuentemente las crías de cobayas son destetadas entre los 15 a 18 días con un promedio de 200 a 300 gramos, esto garantiza que el animal ha completado la fase de crecimiento (Solís & Chávez, 2015).

### **3.5.5 Fisiología ovárica**

#### **Ovogénesis**

La ovogénesis representa el desarrollo y diferenciación del gameto femenino u óvulo mediante una división meiótica y se lleva a cabo en los ovarios. Este proceso se produce a partir de una célula diploide y se forman como producto una célula haploide funcional (el óvulo) y dos células haploides no funcionales es decir los cuerpos polares (Astapova et al., 2019).

#### **Foliculogénesis**

Es un proceso selectivo donde un solo folículo asume dominancia y el destino del resto de folículos es la atresia mediada por apoptosis, en esta etapa se forma el antro folicular, de una manera muy independiente de la hormona folículo estimulante (FSH), Pilny (2014) señala que el folículo antral requiere de gonadotropinas mientras que la fase inicial de la foliculogénesis está mediado por factores externos. El proceso de desarrollo y diferenciación de un folículo toma aproximadamente 8 semanas en roedores desde una estructura primordial hasta el folículo preovulatorio (Sadeu et al., 2007).

### 3.5.6 Dinámica folicular

En el crecimiento folicular interviene la proliferación y diferenciación de células de la teca y de la granulosa, lo que resulta en un aumento de la capacidad de los folículos para producir estradiol y para reaccionar a las gonadotropinas. En cada oleada folicular es reclutado un grupo de folículos primordiales que posteriormente crecen. La selección del folículo dominante ocurre al final de la fase común de crecimiento. El crecimiento del folículo dominante continúa hasta una tasa constante y el resto sufren atresia (Grégoire, et al., 2012).

Una vez que las cobayas han pasado la pubertad obtienen una capacidad de producir gametas fértiles, es decir inician su vida reproductiva siempre y cuando cumplan las condiciones de tamaño y peso. Una vez que la adenohipófisis comienza su proceso es capaz de liberar hormonas gonadotropinas que generan la liberación de esteroides gonadales alcanzando la estimulación o la inhibición de algunas respuestas que intervienen en el control cíclico (Pignon & Mayer, 2020).

Este proceso comprende dos fases: la primera lútea en la cual hay ausencia de manifestaciones típicas del comportamiento estral, presencia de cuerpo lúteo (CL) y altos niveles de progesterona plasmática, mientras que la fase folicular inicia con el proestro lo que resulta en un incremento de estrógeno en el folículo preovulatorio como resultado induciendo a la hembra al estro y posterior a la ovulación (Áldas, 2012).

En estas dos etapas se produce dos ondas de crecimiento folicular esto relacionado al desarrollo simultáneo de varios folículos antrales que atraviesan estados de reclutamiento, selección y dominancia folicular. La primera onda culmina en los días 10 y 11 mientras que la segunda termina en la ovulación (Araníbar & Echevarría, 2014).

### 3.5.7 El ciclo estral

Según Grégoire et al, (2018), las cobayas son una especie poliestrica con variaciones en su fecundidad, presentando una ovulación espontánea. Generalmente el ciclo estral es de  $16 \pm 3$  días pudiendo existir una variación de 13 a 19 días, obteniendo como promedio de ovulación de 3,14 folículos por ciclo. La duración del ciclo estral se presenta en cuatro fases bien definidas.

#### Proestro

En esta etapa presentan cambios externos como aumento considerable del tamaño y flujo sanguíneo de los genitales externos, como también secreciones serosas, con una duración de alrededor de 14 horas (Lilley et al., 1997).

## Estro

Definido como el periodo de receptividad sexual de la hembra, esto se debe a cambios bruscos hormonales. Ocurre alrededor de 8 a 11 horas, presentándose de manera nocturna. La cobaya empieza a manifestar inquietud, arqueamiento del lomo, elevación de la pelvis, mucosidad vaginal y acepta la monta. Esto generalmente sucede a las 2 a 3 horas postparto (Shomer et al., 2015). Esta conducta se considera como el verdadero "calor". La ovulación es de forma espontánea y ocurre 10 horas después de haber iniciado el celo, con una duración de 15 horas (Bean, 2013).

## Metaestro

Etapas de rechazo total de la hembra al macho con un periodo de duración de 18 a 24 horas (Hargaden & Singer, 2012).

## Diestro

Periodo en el que CL aumenta de tamaño lo que permite la gestación y desarrollo del embrión con una duración aproximada de 13 a 16 días (Balgobin et al., 2013).

### 3.5.8 Cambios hormonales

Shi et al. (2000), documentaron las concentraciones hormonales en el ciclo estral del cobayo, encontrando que la concentración de FSH alcanza los niveles más bajos y estradiol los niveles más altos en el día de la ovulación (día 0). Posterior a la ovulación los niveles de FSH se incrementan y los de estradiol disminuyen. La concentración de progesterona es baja en los días 16 y 0 y alta entre los días 4 y 12, de igual manera la hormona luteinizante (LH) está elevada en el día 0 disminuyendo posterior a la ovulación y aumentando en el día 12 (Astapova et al., 2019).

### 3.5.9 Morfología reproductiva

- **Folículos**

El crecimiento folicular comprende cuatro tipos:

**Primordial:** Contiene una única capa de células epiteliales escamosas simples que permanecen latentes hasta el momento de ser reclutados.

**Primario:** Recubre una sola capa de células granulosa cuboideas mientras los folículos permanecen estáticos durante la Profase I hasta ser estimulados por las gonadotropinas para continuar su desarrollo (Wilson et al., 2021).

**Secundario:** Los ovocitos ya se hallan recubiertos por diversas células de la granulosa estratificadas en una membrana basal con células teca al exterior y el progreso terciario en el cual rodea al ovocito la zona pelúcida y las células de la granulosa dentro del antro procediendo al desarrollo final de las células de la teca, volviéndolas funcionales en la conversión de andrógenos a estrógenos. A esta etapa también se conoce con el nombre de folículo de Graff próximo a ovular (Bean, 2013).

- **Cuerpo lúteo**

El Cuerpo lúteo se caracteriza por la presencia de células lúteas grandes (procedentes de la luteinización de las células de la granulosa) y de células lúteas pequeñas (procedentes de la luteinización de las células de la teca interna). Las primeras son grandes poligonales de citoplasma abundante y pálido, con núcleo grande y vesicular, actividad mitótica baja y ocupan la mayor parte del CL. Las luteínicas pequeñas, presentan un citoplasma oscuro, núcleo pequeño y basófilo presentándose en mayor zonas trabeculares y periféricas del CL (Herdoíza, 2016).

### **3.6 La membrana vaginal en la detección del celo**

#### **3.6.1 Definición**

La citología vaginal se usa generalmente para monitorear el ciclo estral de la cobaya, pero requiere mucho tiempo y de la experiencia con la técnica. El cierre de la membrana vaginal que cubre la abertura vaginal durante todo el ciclo estral y que degenera espontáneamente en celo. La ausencia de una membrana de cierre vaginal en cobayos también puede usarse para indicar celo, aunque la correlación no es del 100%. Se ha sugerido que la impedancia vaginal (en lugar del examen citológico de frotis vaginales) puede estar mejor correlacionado con las etapas de estro (Castro, 2016). Esta técnica ayuda a determinar la fase del ciclo estral en la que se encuentran las cobayas (Wilson et al., 2021) mencionan hallazgos que se pueden observar en la citología posterior a su colecta.

Es uno de los métodos complementarios de fácil realización debido a su economía y a su diagnóstico reproductivo eficaz, como la detección de celo y/o determinación de la fase del ciclo estral. Los cambios que se producen en la citología ocurren en el epitelio y la mucosa vaginal ocasionando concentraciones séricas de estrógenos (E2) que engrosan el epitelio vaginal tras el aumento de sus capas celulares (Herdoíza & Javier, 2016). Mediante la citología vaginal se puede determinar la fase del ciclo estral en la cual se encuentran los animales.

### 3.7 Variación celular según la etapa del ciclo estral

**3.7.1 Proestro:** presencia de abundante mucus y células intermedias grandes o pequeñas.

**3.7.2 Estro:** gran cantidad de células superficiales de forma poliédrica y de núcleo picnótico que en ocasiones no se observa, también se encuentran células superficiales anucleares.

**3.7.3 Metaestro:** escasa cantidad de leucocitos, células intermedias y reducida cantidad de células superficiales.

**3.7.4 Diestro:** mayor cantidad de leucocitos pero escasa cantidad de células intermedias en proporción a los leucocitos (Kühnel & Mendoza, 1992).

### 3.8 Protocolos de sincronización del celo

La sincronización de celo es una técnica empleada para la modificación de los ciclos en un grupo de hembras, con el fin de que presenten un celo fértil en días programados, para así facilitar la inseminación artificial (López, 2013). Además permite que un grupo de hembras manifiesten celo aproximadamente al mismo tiempo, eligiendo el método adecuado según las condiciones de vida del animal (Oñate, 2012); permite predecir el momento del estro con seguridad razonable, reduciendo así el tiempo requerido para su detección.

#### 3.8.1 Ventajas

- Reducir el tiempo necesario para la detección de celo
- Minimizar la necesidad de mano de obra
- Reducir la tasa de descarte por fallas reproductivas (López, 2013).
- Económicamente útil para las personas dedicadas a la crianza de estos animales ya que al controlar el estro existirá mayor uniformidad en la edad de los recién nacidos, mejorando los cuidados de estos y favoreciendo la utilización de recursos (Donal, 1981).

#### 3.8.2 Desventajas

- El estrés provocado por la manipulación diaria inadecuada o por personas desconocidas pueden estresar al animal de manera significativa (perdida de pelos, de peso) y puede llegar hasta ser letal.
- Otra limitante de este método es la dificultad que representa aplicar un tratamiento diario a hora fija durante varios días (Grégoire et al., 2010).

### 3.8.3 Métodos de Sincronización

- **Prolongación de la fase lútea**

El alargamiento de la fase lútea se puede conseguir al administrar progestágenos durante un periodo relativamente largo, con el fin de que el cuerpo lúteo tenga una regresión natural durante la administración de la hormona, ejerciendo retroalimentación negativa en la secreción de LH después de la regresión del cuerpo lúteo (Fernández, 2003).

Cuando se suspende el progestágeno empieza el crecimiento folicular, estro y ovulación a los 2 a 8 días, variando este intervalo según la especie y el protocolo empleado. El periodo de administración de progestágenos es de 14 a 21 días según la especie, existiendo varios métodos de administración como: progestágenos activos por vía oral, esponjas, implantes subcutáneos en la oreja y dispositivos intravaginales (Oñate, 2012).

- **Uso de progesterona exógena (Altrenogest)**

La administración oral de progesterona (P4) ha demostrado su efectividad para controlar el desarrollo folicular y en la sincronización de la actividad ovárica en diversas especies (Flynn et al., 2000). Según Grégoire, et al. (2012) la administración de progesterona (Altrenogest) a dosis de 0,22 mg/kg vía oral durante 15 días dió resultados satisfactorios al presentarse el celo a los  $4,43 \pm 0,13$  días y la ovulación de 4 a 5 días posteriores a la última toma de dicha hormona.

- **Acortamiento de la fase lútea**

La prostaglandina (PGF<sub>2</sub>α) tiene una función luteolítica, ya que provoca la involución del cuerpo lúteo al final del ciclo estral (Cabrera & Jimenez, 2012). Utilizando para ello la vía vena uterina-arteria ovárica, vasos que presentan zonas de estrecha contigüidad (Ferrando & Urquieta, 1982). La PGF<sub>2</sub>α se une a sus receptores en la membrana plasmática de las células lúteas, la formación del complejo PGF<sub>2</sub>α y receptor; abren los canales de calcio, permitiendo su entrada al espacio intracelular, iniciando los procesos de apoptosis en células lúteas (Aréchiga et al., 2021). El efecto luteolítico de dicha hormona puede deberse a un efecto local relacionado con la disminución del flujo vascular lúteo o por inhibición directa de la síntesis de progesterona (Hernández, 1994). La prostaglandina F<sub>2</sub>α se obtiene a partir del ácido araquidónico a través de la vía metabólica conocida como ciclooxigenasa (Sumano & Ocampo, 2006), es producida por el endometrio permitiendo el reinicio de un nuevo ciclo estral ocasionando la luteólisis del cuerpo lúteo funcional (López, 2013).

El mecanismo por el cual se produce la luteólisis mediada por la prostaglandina F<sub>2</sub>α está relacionado a una disminución del flujo vascular lúteo o por inhibición directa de la síntesis de

progesterona (Hernández, 1994). La regresión cíclica del cuerpo lúteo (luteólisis) es causada por la secreción pulsátil episódica de PGF2alfa uterina, que actúa localmente sobre el cuerpo lúteo por un mecanismo de contracorriente o, en algunas especies, a través de la circulación sistémica. La interacción de la oxitocina neurohipofisaria con los receptores de oxitocina en el endometrio provoca la secreción de pulsos luteolíticos de PGF2alfa uterina (McCracken et al., 1999).

En un estudio realizado por Oñate (2012) en el cual se sincronizó cuyes empleando (PGF2 $\alpha$ ), así como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), se valoró las características reproductivas durante 150 días, obteniéndose una tasa de fertilidad del 75% al emplear GnRH, con la cual se tuvo un menor tiempo de gestación, mayor tamaño de la camada, así como el peso al nacimiento y destete fueron superiores en relación a la utilización de PGF2 $\alpha$ .

### 3.9 Avances biotecnológicos

#### 3.9.1 Caracterización morfométrica de los ovocitos

El ovocito maduro en la cobaya tiene un tamaño de 110 a 115 micras, se encuentra rodeado de una membrana llamada oolema, la cual contiene al citoplasma ovocitario lugar donde se encuentran las organelas citoplasmáticas y el núcleo. La zona pelúcida es la parte glicoproteica del ovocito que contiene el complejo ovocito-oolema, tiene un grosor de 15 a 20 micras y el conjunto ovocito-zona pelúcida mide 150 micras (Behr & Whang, 2004). Felipe & Masson,(2005) han clasificado a los ovocitos en: pequeños a aquellos que miden menos de 37 micras, ovocitos en crecimiento los que miden entre 38 a 66 micras y ovocitos grandes los que superan las 67 micras.

Los ovocitos de roedores silvestres como el coipo (*Myocastor coypus*) presentan forma esférica con núcleo redondo, el citoplasma de aspecto traslúcido con gránulos localizados excéntricamente hacia el polo vegetativo. Los ovocitos presentaron doble envoltura, células del cúmulo y zona pelúcida, esta es una estructura translúcida y muy refringente con un espesor de 15,9 micras, su morfología no puede ser diferenciada ya que se encuentra enmascarada con las células de la corona radiada. El corpúsculo polar tiene forma ovoide aplanada, posee un diámetro de 20,6 micras (Felipe et al., 2001).

El espesor de la zona pelúcida de ratones hembras es de 6,7 a 7  $\mu\text{m}$ , mientras que el espacio perivitelino va de 4,7 a 6,6  $\mu\text{m}$  y el diámetro de los ovocitos de 60 a 63,5  $\mu\text{m}$  (Mohammadzadeh et al., 2018).

Un estudio realizado por Fernández et al. (2018), en el cual valoraron la morfometría de útero, ovarios y ovocitos en cobayas, reportaron que el espesor de la zona pelúcida en ovocitos es

de 12,1  $\mu\text{m}$ , presentaron un diámetro del citoplasma de  $75,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$  y el volumen de  $234.003,8 \pm 76.547,1 \mu\text{m}^3$  respectivamente.

### 3.9.2 Clasificación de los ovocitos

Es una etapa crítica para la fertilización *in vitro*, ya que es la selección de ovocitos de buena calidad siendo los principales aspectos a valorar: estado nuclear, homogeneidad del citoplasma, aspecto de la corona radiada, compactación de las células del cúmulo y el diámetro ovocitario son los factores claves para una correcta maduración (Thomas & Vanderhyden, 2006).

La calidad de las células del cúmulo y la homogeneidad del citoplasma son cruciales para la determinación del potencial de maduración y fecundación *in vitro*; Las células del cúmulo nutren al ovocito en la etapa de crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y sintetizan la matriz compuesta por ácido hialurónico y proteínas que facilitan el transporte ovocitario por el oviducto (Gonzales & Gonzales, 2005).

Clasificación adaptada de ovocitos bovinos:

**Tipo A:** ovocitos con apariencia compacta, más de 4 capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo, denso y finamente granulado siendo clasificados como ovocitos aptos.

**Tipo B:** tiene entre 1 a 3 capas de células del cúmulo, citoplasma irregular, denso y granulado denominados ovocitos aptos.

**Tipo C:** cúmulo expandido, disperso y descolorido, corona radiata desnuda, granulado, grueso, citoplasma descolorido y deforme, por todo ello se denominan ovocitos no aptos (Ayala et al., 2019).

El desarrollo ovocitario está directamente relacionado con la cantidad de células que lo rodean, es por ello que ovocitos desnudos tienen un desarrollo deficiente o se degeneran después de la fertilización, es así que ovocitos con más de cuatro capas de células del cúmulo llegan en un 40% al estadio de blastocisto, mientras que al poseer menos de tres capas llegan el 23% a ser blastocistos según un estudio realizado por (Khurana & Niemann, 2000).

### 3.9.3 Recuperación del complejo cúmulo-ovocito

#### 3.9.3.1 Técnica de aspiración folicular

Es un procedimiento que tiene por objeto extraer el líquido folicular del interior de los ovocitos se absorbe con la ayuda de agujas hipodérmicas, luego ser colocadas en cajas Petri para su posterior observación en el microscopio determinando la calidad de la muestra (Shively,

2008). Permite puncionar folículos visibles en la superficie ovárica, aunque en el proceso se pierden células del cúmulo siendo esta una población homogénea (Lorenzo et al., 2015).

### 3.9.3.2 Técnica de slicing

Este método consiste en colocar cada uno de los ovarios en cajas petri con solución salina, se procede a realizar cortes horizontales y verticales en la corteza del ovario con cuchillas o una hoja de bisturí separadas por 2 mm aproximadamente y colocados dentro de una caja petri con solución fisiológica (Velarde, 2000).

Permite una mayor recuperación de células del cúmulo ovocitario (COC's) por ovario teniendo una población heterogénea, siendo importante realizar la correcta selección de los COC's; cabe destacar que esta técnica es muy utilizada cuando se requiere puncionar ovarios de menor tamaño ya que el tamaño folicular dificulta su punción (Lorenzo et al., 2015).

## 3.10 Evaluación de la competencia ovocitaria

Los avances en el conocimiento de la dinámica celular condujo a la hipótesis, de que la maduración, entendida como el reinicio del ciclo meiótico, la reorganización del ooplasma y la regulación de la expresión génica, juegan un papel fundamental para sustentar el desarrollo temprano de los embriones, esta capacidad de lograr el desarrollo se denomina competencia (Tarazona et al., 2010). La competencia ovocitaria consta de dos eventos celulares: la maduración nuclear y la maduración citoplasmática (Hytel et al., 1997). Durante el primer evento el ovocito reinicia la meiosis hasta lograr la etapa de metafase II y nuevamente se detiene, solo reiniciará si la fecundación se lleva a cabo (Hafez, 1987); el segundo evento tiene relación con la habilidad del ovocito para aportar en la formación del pronúcleo masculino posterior a la fecundación, y por tanto adquiere la capacidad para soportar el desarrollo embrionario temprano.

### 3.10.1 Medios de maduración

La elaboración de medios de maduración de ovocitos *in vitro* ha tomado como base las soluciones empleadas para la maduración *in vivo* con el objetivo de alcanzar el máximo número de ovocitos maduros (Espín, 2018). Los factores a considerar para la maduración de ovocitos son: la osmolaridad, el pH y las hormonas empleadas, aminoácidos, factores de crecimiento, suero fetal bovino (BFS), suero de vaca en estro y seroalbúmina bovina (BSA) (Martínez, 2013).

El ambiente al cual se expone el ovocito es crucial para su supervivencia, debiendo este ser lo más parecido al ambiente normal como lo es: concentración de CO<sub>2</sub> de 5%, humedad relativa del 95-100%, osmolaridad de 290 mOsm, pH de 7,4, temperatura de 37,5 °C, con

estas condiciones se ha determinado que entre el 60 al 75% de los ovocitos llegan a metafase II seguido de la expulsión del primer corpúsculo polar entre 17 a 24 horas de comenzada la maduración (Beltrán & Córdova, 2012).

### 3.10.2 Tinción Hoechst (fluorocromo)

El signo principal que indica el reinicio de la meiosis es la ruptura de la membrana nuclear, la homogeneidad citoplasmática y la presencia del primer corpúsculo polar, lo que indica que se encuentra en metafase II. Para que dicho corpúsculo pueda ser observado es necesario emplear un medio de tinción con fluorocromo específico para teñir ADN, empleándose Hoechst 33342 (Zhinin & Buñay, 2022).

Dicho compuesto tiene la capacidad para incorporarse a las moléculas de ADN, facilitando la identificación del estado de maduración nuclear de los ovocitos posterior a su exposición al microscopio de epifluorescencia, el colorante es activado con la luz ultravioleta con una longitud de onda de 350 nm aproximadamente emitiendo fluorescencia azul/cian de 461 nm diferenciando ovocitos maduros de los inmaduros, así como la vesícula germinal (GV), ruptura de la vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI) y metafase II (MII) (Duma, 2019).

### 3.10.3 Maduración del ovocito

Los procesos involucrados en la maduración ovocitaria ocurren desde la etapa fetal de la hembra hasta el fin de la actividad reproductiva (Senger, 1999). La maduración del ovocito constituye varias etapas con el objetivo de adquirir competencia, en la profase I los ovocitos detienen su ciclo meiótico, periodo necesario para el crecimiento y reorganización citoplasmática antes de ser fertilizado (Sagata, 1998). En la etapa final de la maduración del ovocito se da el reinicio de la meiosis I seguido del crecimiento y maduración citoplasmática, dicho proceso es efectuado en el llamado complejo folicular (ovocito, células del cúmulo, granulosa, teca y fluido) (Nilsson & Skinner, 2001; Kalinowski et al., 2004).

La tasa de maduración del ovocito *in vitro* es baja debido a factores como: especies reactivas de oxígeno, alteraciones metabólicas, heterogeneidad ovocitaria debido a la diferencia entre los métodos de obtención de COC's (Zhinin & Buñay, 2022).

### 3.10.4 Determinación del estadio nuclear

El núcleo del ovocito se caracteriza por su gran tamaño y su tinción pálida y difusa con colorantes como Hoechst, este estado nuclear es conocido como vesícula germinal (GV) (Duma, 2019).

Cuando el núcleo del ovocito está en etapa de vesícula germinal (GV) es un ovocito inmaduro. La GV se observa comúnmente en la periferia del ooplasma, aunque en ocasiones también

se encuentra en el centro del ovocito, por lo general es un nucléolo rodeado de cromatina refractante dispuesta como un anillo.

El progreso de la GV se puede clasificar en varios niveles según el grado de compactación de la cromatina:

**GVI:** La cromatina alrededor del nucléolo aparece compacta y refractante como un anillo o herradura, hay envoltura nuclear.

**GVBD (Germinal Vesicle Break Down) o diaquinesis:** la cromatina aparece en forma compacta de un agregado y la envoltura nuclear ha desaparecido por completo; no hay nucléolo, es el final de la profase I.

### 3.10.5 Maduración citoplasmática

El citoplasma del ovocito juega un papel muy importante en la producción de energía, necesaria para realizar las funciones celulares durante la maduración, fecundación desarrollo embrionario temprano. La maduración citoplasmática implica modificaciones del ARNm (Lorenzo, 2021).

### 3.11 Maduración del ovocito *in vitro* vs. *in vivo*

Los eventos que ocurren durante el crecimiento del ovocito *in vivo* deben parecerse lo máximo posible para facilitar el crecimiento folicular y ovocitario *in vitro*. En la reproducción en condiciones *in vitro* el éxito del proceso de producción de embriones depende de la manera de la maduración de los ovocitos y de que adquieran la competencia necesaria para desarrollarse lo que determinará el porcentaje de blastocistos obtenidos (embriones transferibles). La calidad de los ovocitos obtenidos *in vitro* es menor que los madurados *in vivo* y con ello el porcentaje de blastocistos es menor (Lorenzo, 2021).

### 3.12 Clasificación conformacional de la vesícula germinal (GV)

Según la configuración de la cromatina GV se clasifican en: condensada, intermedio y compacta, cuyos resultados están asociados con la capacidad de desarrollo pudiendo ser de utilidad para determinar la calidad ovocitaria (Yao et al., 2021).

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Materiales Físicos

- Jeringas
- Hisopos Estériles
- Papel milimetrado
- Equipo de disección
- Papel secante
- Fundas Ziploc
- Esmalte para uñas

#### 4.1.2 Materiales Biológicos

- Ovarios de cobaya
- Ovocitos
- Muestras de sangre

#### 4.1.3 Materiales Químicos

- Solución Fisiológica
- Kit de Elisa para la determinación cuantitativa de progesterona en suero o plasma en humanos (Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica mbH, Alemania).
- Tinción Diff Quick
- Progesterona Oral (Altrenogest, ALTRESYN®, CEVA, Francia)
- Alcohol al 70%
- Agua destilada
- Glutaraldehído (0,5% de DPBS)
- Sonda fluorescente Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma B-2261)
- Medio de montaje (DPBS con glicerol y Hoechst) (1:1:0.001)

#### 4.1.4 Materiales de Laboratorio

- Pipetas automáticas
- Puntas de Pipetas
- Gradilla
- Porta objetos
- Microscopio

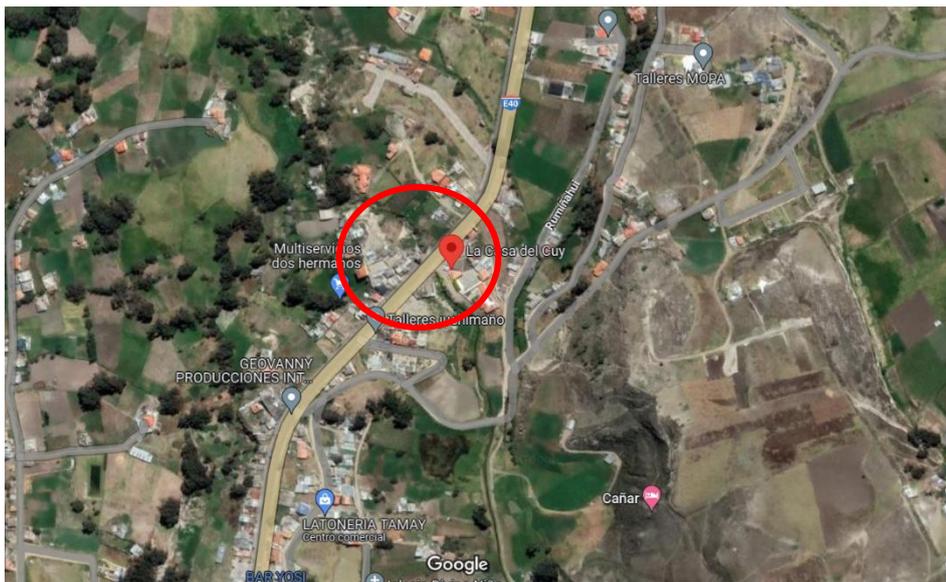
- Estereomicroscopio (SMZ 745, Nikon, Japón)
- Microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse Ci-E Epifluorescence set, Japón)
- Platina térmica
- Tubos Eppendorf
- Tubos con tapa roja (sin anticoagulante)
- Centrífuga
- Vasos de precipitación
- Balanza de precisión (Acurris™, Analytical Balance, Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cajas petri de búsqueda
- Cajas petri de cuatro pocillos
- Hialuronidasa
- Medio de montaje
- Estereoscopio (Nikon SMZ-745T)

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Área de estudio

El manejo de los animales fue realizado en una granja comercial de la provincia del Cañar, ubicada a una altitud de 3.160 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 11,8°C.

El estudio de los ovarios se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, ubicado en la Granja de Irquis, perteneciente a la provincia del Azuay, Cantón Cuenca, Parroquia Victoria del Portete, latitud sur: 4'48.34"S y longitud oeste 79°4'30.12"O. A 2.671 m.s.n.m, con una pluviosidad media anual de 789 mm, humedad relativa del 80% y temperaturas que oscilan entre 7 y 12 °C.



**Figura 1:** Ubicación satelital del área de estudio

**Fuente:** Directorio cartográfico de Google Maps, 2018

#### 4.2.2 Animales y granja

Se utilizaron 43 cobayas, con una edad entre 4 y 5 meses, peso promedio de  $886,2 \pm 12,80$  gramos, sanas, producto del cruce entre la línea peruana y criolla. Condición corporal (CC) entre 2,5 a 3,5, en escala de 1 a 5 donde 1 es extremadamente flaca y 5 obesidad extrema (Jiménez & Huamán, 2010).

Los animales fueron adquiridos en diferentes plantas de cobayos y llevados a la granja comercial de la familia Iglesias 30 días antes del inicio del experimento, para un periodo de adaptación al sistema de alimentación y manejo que esta granja mantenía. La alimentación tuvo como base Alfalfa (*Medicago Sativa*) administrado dos veces al día, más suplemento de balanceado comercial una vez al día, el cual contenía 10% de proteína, 5% de grasa, fibra cruda 12%, ceniza 7% y humedad del 13%. Los cobayos fueron sometidos a un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

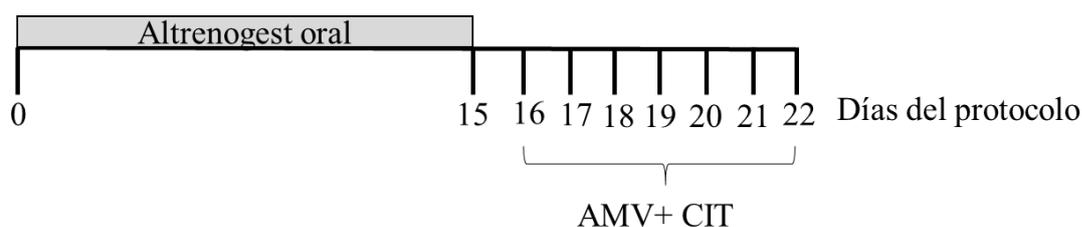
#### 4.2.3 Diseño experimental

El presente estudio fue descriptivo. En primera instancia se sincronizó el celo de las cobayas mediante la aplicación de progesterona oral (Altrenogest, ALTRESYN®, CEVA, Francia) durante 15 días consecutivos. El día que la cobaya presentó un 50% de apertura de membrana vaginal (AMV) se consideró a la hembra en celo. El día 15, último día de aplicación de la progesterona, se valoró el primer grupo de cobayas, la segunda valoración fue realizada 24 horas luego de que la cobaya presentara celo, es decir día 1 del ciclo estral; la tercera valoración se realizó el día 4 del ciclo estral, la cuarta el día 8 y finalmente la quinta valoración al día 11 del ciclo estral.

El ensayo describió la concentración de progesterona, las características morfológicas del ovario, folículos, cuerpo lúteo, COC's y citologías vaginales en los cinco momentos antes mencionados.

#### 4.2.4 Protocolo de sincronización del celo

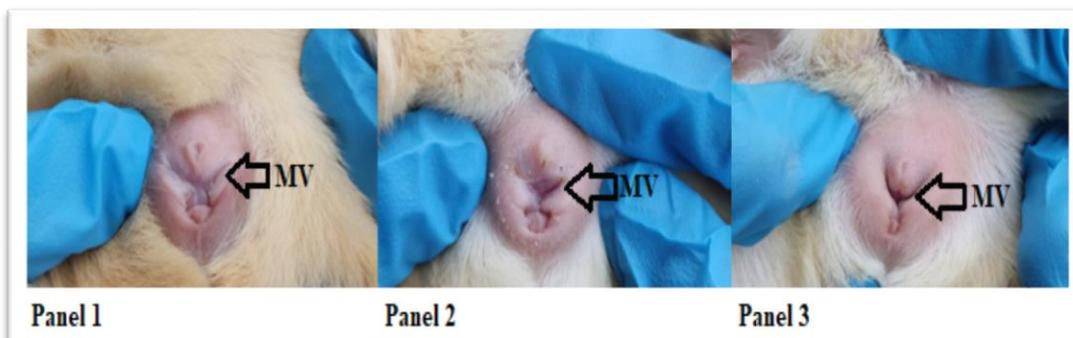
A las 06:00 am fue administrada la progesterona vía oral (Altrenogest), mediante una pipeta automática regulable (20  $\mu$ l a 100  $\mu$ l), en dosis de 0,22 mg/kg de peso vivo, durante 15 días consecutivos (Figura 2)



**Figura 2:** Protocolo de sincronización del celo de las cobayas: día 0=inicio del protocolo, aplicación de progesterona oral (Altrenogest) hasta el día 15. AMV=valoración de la apertura de la membrana vaginal. CIT=citología vaginal, a partir de la observación del 50% de apertura de la membrana vaginal

#### 4.2.5 Valoración de la apertura de la membrana vaginal

24 horas posteriores al retiro de la progesterona (Día 16 del protocolo); (Figura 3) a partir de las 06h00 am se evaluó la apertura de la membrana vaginal (AMV) por 7 días consecutivos, para lo cual se inmovilizó a la cobaya y se observó en la entrada de la vagina la presencia o ausencia de la membrana vaginal. Se consideró como día del inicio del celo, cuando el 50% de esta estructura estaba abierta (Wilson et al. (2021).

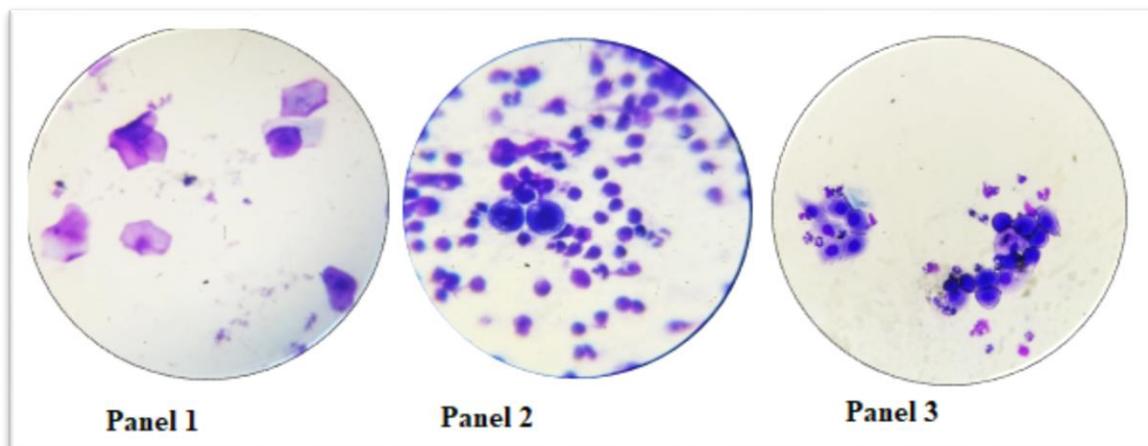


**Figura 3:** Apertura de la membrana vaginal. Panel 1: MV= membrana vaginal cerrada 0%. Panel 2: MV=50% de apertura de la membrana vaginal. Panel 3: membrana vaginal abierta 100%

**Fuente:** autor.

#### 4.2.6 Citología vaginal

La citología vaginal buscó determinar las características de las células la mucosa vaginal durante el tiempo que la membrana vaginal permaneció abierta, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento: al observarse un 25% de apertura de la membrana vaginal (AMV), se practicó un hisopado de la mucosa vaginal hasta el día 22 del protocolo de sincronización del celo (Figura 4). Para esto se colocó a la cobaya en posición decúbito dorsal y con la ayuda de un hisopo estéril 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 de esta en un portaobjetos y se dejó secar al aire libre. A continuación, se sumergió la placa en un vial por 1 segundo, 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 (Eosina red) y 3 (Counter blue) en ese orden, al final se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire libre (Grégoire et al., 2012). Las muestras ya teñidas fueron llevadas al laboratorio de biotecnología para su valoración según lo descrito por Dorsch et al. (2008).



**Figura 4:** Presencia de diferentes tipos de células desde la apertura de la membrana vaginal (25%) hasta el cierre de la misma. Panel 1: Presencia de células superficiales (celo). Panel 2: presencia de neutrófilos (ovulación). Panel 3: Células parabasales (metaestro).

**Fuente:** autor

#### 4.2.7 Protocolo de evaluación de variables en cinco momentos diferentes del ciclo estral

El estudio determinó la concentración de progesterona; además, de las características morfológicas del ovario, folículos, CL y células vaginales evaluadas en cinco momentos diferentes que se detallan a continuación:

- Primera valoración: último día de la aplicación de progesterona oral (día 15 del protocolo de sincronización)
- Segunda valoración: día 1 del ciclo estral en estudio.
- Tercera valoración: día 4 del ciclo estral en estudio
- Cuarta valoración: día 8 del ciclo estral en estudio
- Quinta valoración: día 11 del ciclo estral en estudio (Figura 5)



**Figura 5:** Protocolo de valoración del tamaño, peso del ovario, CL, folículos y células vaginales en cinco momentos diferentes: día 15 (último día de la administración de P4;

números color rojo), día 1 (del ciclo estral en estudio; número color negro), día 4, día 8 y día 11)

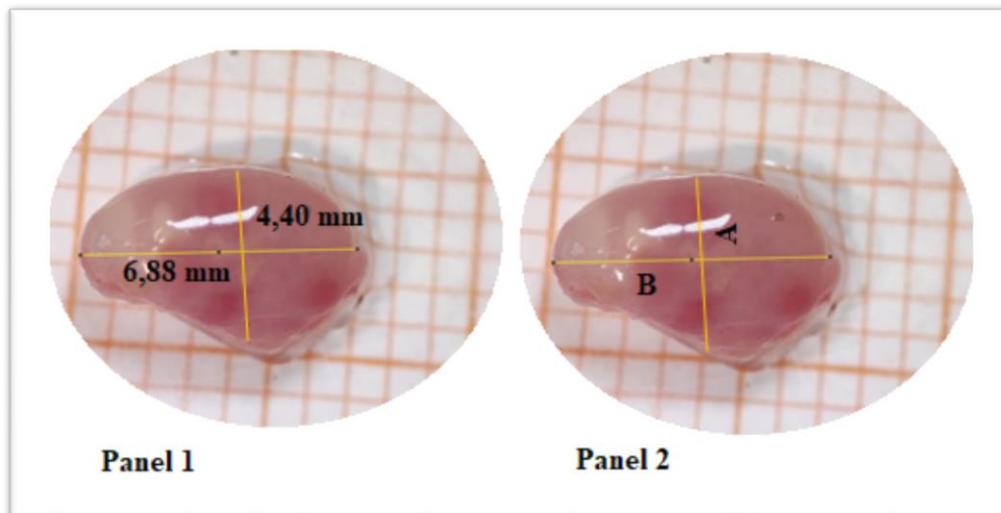
#### **4.2.8 Toma de muestras de sangre y eutanasia de las cobayas**

Previo a la obtención de las muestras de sangre en cada una de las valoraciones (día 15; 1; 4; 8; 11), las cobayas fueron anestesiadas según el procedimiento descrito por Ayala et al. (2017), empleando una mezcla de Zolazepam y tiletamina (Zoletil 50®), dosis de 50 mg/kg vía subcutánea. Luego, con una aguja vacutainer de 21G x 25 mm en ángulo de 30° se realizó la punción cardíaca, en el espacio entre la tercera y cuarta costilla, parte proximal al esternón, del lado izquierdo del animal, para obtener 1 ml de sangre, la cual se dejó reposar para que se formara el coágulo. Las muestras fueron centrifugadas a 2.500 rpm x 15 min., y se colectó el sobrenadante que se congeló a -20°C hasta su análisis. La determinación de la concentración de progesterona fué realizada mediante un kit de ELISA para la determinación cuantitativa de progesterona en suero o plasma de humanos (Human Gesellschaft fur Biochemica und Diagnostica mbH. Alemania).

Luego de la toma de las muestras de sangre, cada cobaya fue eutanasiada de acuerdo al procedimiento descrito por Guilmette et al. (2015). Las cobayas recibieron 0,3 ml/kg de peso corporal de solución para eutanasia T-61 (Embutramida 200mg; Hoechst-Roussel Agri-Vet, Somerville, Nueva Jersey, EEUU).

#### **4.2.9 Valoración de la morfología de los ovarios, folículos antrales y cuerpo lúteo**

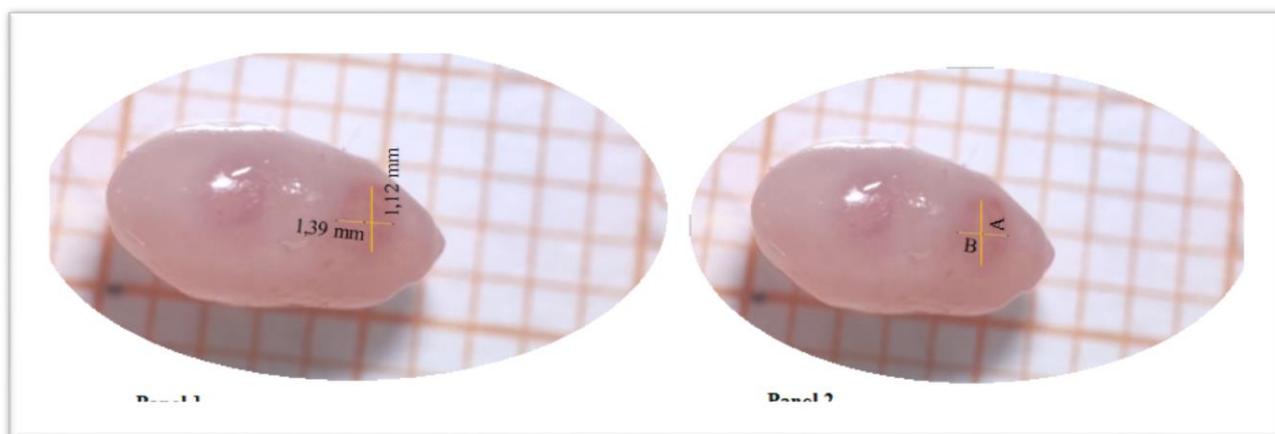
Los ovarios derecho e izquierdo de cada cobaya fueron pesados por separado con una balanza de precisión (Acurriss™, Analytical Balance, Sigma-Aldrich, Alemania) en miligramos (mg). Posteriormente a los ovarios se tomó una foto con la ayuda de la cámara adaptada a un estereoscopio (Nikon, SMZ-745T, Japón) para la consiguiente medición del largo y ancho, empleando el programa ImageJ (Figura 6).



**Figura 6:** Tamaño del ovario: Panel 1, ovario derecho (ancho=4,40mm + 6,80mm largo) Panel 2, ovario izquierdo (A=ancho; B=largo)

**Fuente:** autor

También se obtuvo el índice gonadosomático (IGS), para lo cual se utilizó la siguiente fórmula (peso promedio de los ovarios/peso promedio corporal) x 100. Para la valoración del cuerpo lúteo (CL; Figura 7) se tomó en consideración el ancho + el largo dividido para dos (mm).

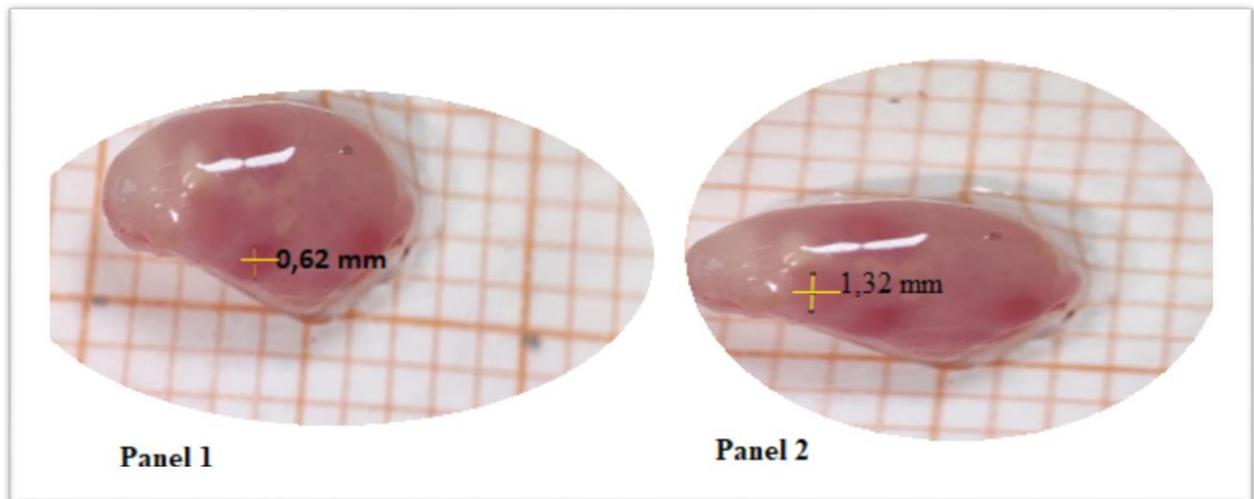


**Figura 7:** Tamaño del cuerpo lúteo (CL): Panel 1, CL derecho (ancho=1,12mm + 1,39mm largo) Panel 2, CL izquierdo (A=ancho; B=largo)

**Fuente:** autor

Posteriormente, los ovarios fueron colocados bajo un estereoscopio para realizar el conteo de los folículos antrales (FA). Se tomó una foto de los ovarios mediante el programa ImageJ, para poder determinar el tamaño de los FA mediante la fórmula (ancho + largo dividido para

2) y el valor fue expresado en mm. A continuación los folículos fueron clasificados en tres categorías: T1: folículos <0,5 mm T2: folículos entre 0,5-1 mm y T3: folículos >1 mm (Figura 8).

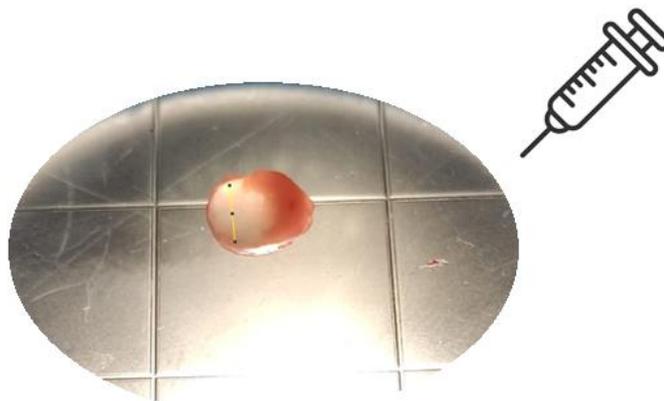


**Figura 8:** Tamaño del folículo antral (FA): Panel 1, FA en ovario derecho. Panel 2, FA en ovario izquierdo

**Fuente:** autor

#### 4.2.10 Valoración de COC's

Para la colecta de los COC's se utilizó la técnica de aspiración folicular, mediante una jeringa de insulina con una aguja 30G, según lo descrito por Wang et al. (2019), con ciertas modificaciones. Brevemente: los ovarios fueron colocados en una caja cuadrículada y ubicados bajo una lupa para visualizar y aspirar los folículos antrales (Figura 9).

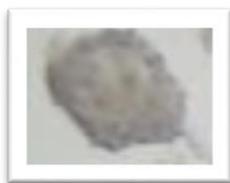


**Figura 9:** aspiración de folículos antrales de cobaya.

**Fuente:** autor

Los folículos de T1: folículos <0,5 mm; T2: folículos entre 0,5 y 1 mm y T3: folículos >1 mm, fueron aspirados por separado y los COC's obtenidos se cuantificaron. La clasificación de estos COC's se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (SMZ 745, Nikon, Japón), basado en la clasificación propuesta por Ayala et al. (2019), en tipo A, B; C y D, para la especie bovina, la cual fue adaptada para la cobaya (Figura 10, 11, 12, 13)

- COC's tipo A: más de tres capas de células del cúmulo, citoplasma de color café claro homogéneo, zona pelúcida íntegra.



**Figura 10:** COC's de tipo A

**Fuente:** autor

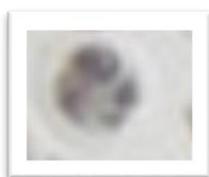
- COC's tipo B: más de tres capas de células del cúmulo, pero en determinadas partes del ovocito no existen células del cúmulo. Citoplasma de color café claro homogéneo, zona pelúcida íntegra.



**Figura 11:** COC's de tipo B

**Fuente:** autor

- COC's tipo C: ovocitos desnudos, citoplasma picnótico, zona pelúcida ligeramente fraccionada.



**Figura 12:** COC's de tipo C

**Fuente:** autor

- COC's Tipo D: células cúmulo completamente expandidas, citoplasma granuloso, grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras, zona pelúcida fraccionada, ovocitos degenerados



**Figura 13:** COC's de tipo D

**Fuente:** autor

#### 4.2.11 Determinación de la morfometría del ovocito

Los COC's fueron colocados en microgotas de 100  $\mu$ L, que contenía Hialuronidasa (H3506-Sigma®) en concentración de 1mg/ml (p/v). Luego por acción mecánica (pipeteo continuo) se

procedió a denudar los ovocitos. Una vez denudados, los ovocitos fueron colocados en microgotas de 50  $\mu$ l de PBS y llevadas al microscopio. La morfometría fue determinada según la metodología descrita por Ueno y Niimura (2008).

- **Diámetro del citoplasma:** medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del citoplasma y expresada en micras ( $\mu$ m).
- **Espesor de la zona pelúcida:** grosor o ancho de la zona pelúcida expresada en micras ( $\mu$ m).

#### 4.3 Análisis estadístico

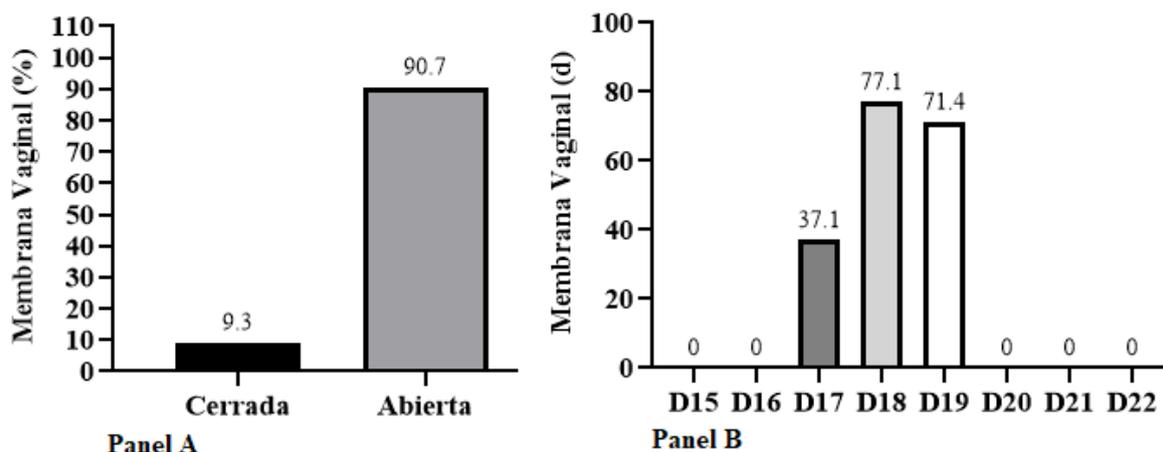
Los datos fueron procesados en Excel y analizados en el programa estadístico SPSS versión 25. Se usaron estadígrafos principales de tendencia central de todas las variables. Se evaluó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro Wilk y se determinó la normalidad de los mismos. La valoración del peso, tamaño del ovario, CL, número y tamaño de los folículos antrales; así como el diámetro del citoplasma, zona pelúcida determinados en los cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8, 11, fueron analizados mediante la prueba de ANOVA y sus medias comparadas con Tukey al 5 considerando a  $p < 0,05$  como significativo.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Evaluación del porcentaje de cobayas que mostraron apertura de la membrana vaginal (AMV)

En este apartado se describen los resultados generales en cuanto al porcentaje de cobayas que presentaron AMV. Así, en la (Figura 14, panel A), se observa que el 90,7% de cobayas sincronizadas (39/43) presentaron AMV, es decir entre los días 17 y 19 del protocolo.

En el panel B de la (Figura 14), se puede observar que la AMV inicio dos días (37,1%; día 17) después del retiro de la fuente de progesterona (día 15), al día siguiente (día 18) un 77,1% de cobayas presentaron AMV y el día 19 bajo a un 71,4%. En los días 20, 21 y 22 la membrana vaginal se mostró cerrada en todas las cobayas.



**Figura 14:** Porcentaje de cobayas que presentaron apertura de la membrana vaginal (Panel A). Día del protocolo en el cual se detectó apertura de la MV en las cobayas sincronizadas y que entraron en celo (Panel B)

Los resultados del presente estudio concuerdan con lo descrito en los roedores *Cavia aperea* y *Galea musteloides*, en los cuales se observó que la AMV se produjo únicamente durante el celo por un lapso de tiempo entre 3 a 5 días; por lo que esta característica es considerada signo primario de celo (Touma et al., 2001).

Además, los resultados demostraron que la administración oral de 0,22 mg/kg de peso vivo de Altrenogest durante 15 días consecutivos permitió que la mayoría de los cuerpos lúteos

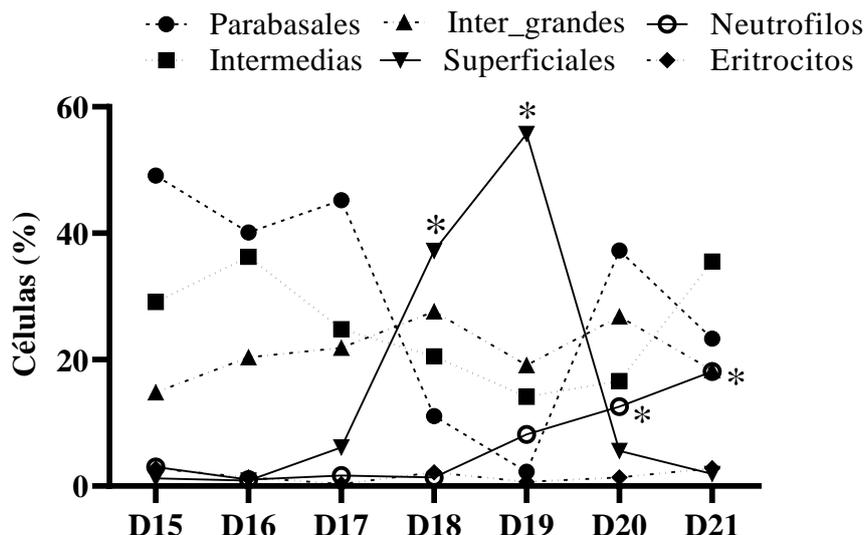
(CLs) presentes en las cobayas (n=43) desde el día 0 hasta el día 15 del protocolo de sincronización, experimentaran lisis fisiológica, induciendo a la presencia del proestro al retirar la fuente externa de progesterona (Altrenogest) en el día 15, con la aparición de AMV en un 77,1% de las cobayas en el día 18 del protocolo (3 días post-retiro de la progesterona), tiempo que es similar al determinado por Grégoire, et al. (2012), al aplicar la misma fuente de progesterona (P4) exógena en cobayas.

Sin embargo, hay estudios en los cuales se determina que la sincronización con progesterona oral (Altrenogest) produce hasta el 90% de cobayas con AMV, es decir celo (Wilson et al., 2021).

## **5.2. Citología Vaginal para determinar el día del celo y la ovulación**

La valoración de la citología vaginal permitió determinar que en los días 18 y 19 del protocolo de sincronización (Figura 15), más del 40% de células presentes fueron de tipo superficiales, lo cual coincide con los días de mayor porcentaje de AMV signo primario del celo en la cobaya, característica similar a la observada en la perra en el día del celo (Arcilla et al., 2005). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden con lo reportado por Ferrín & Murudumbay, (2022), quienes observaron 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

En los días 20 y 21 (protocolo de sincronización); (Figura 15), se visualizó mayor porcentaje de neutrófilos, característica indicativa del inicio de la ovulación en esta especie, a decir de Rivas (2002). Reportes similares fueron emitidos por Grégoire et al. (2012) y Kosaca et al. (1994) quienes describen que el momento de la ovulación varió entre 72 a 144 horas y 120 a 144 horas después de última administración de progesterona respectivamente.



**Figura 15:** Porcentaje de células determinadas mediante citología vaginal en los días 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 del protocolo de sincronización. \*=diferencia estadística en el porcentaje de células de una categoría. Tukey al 5%.

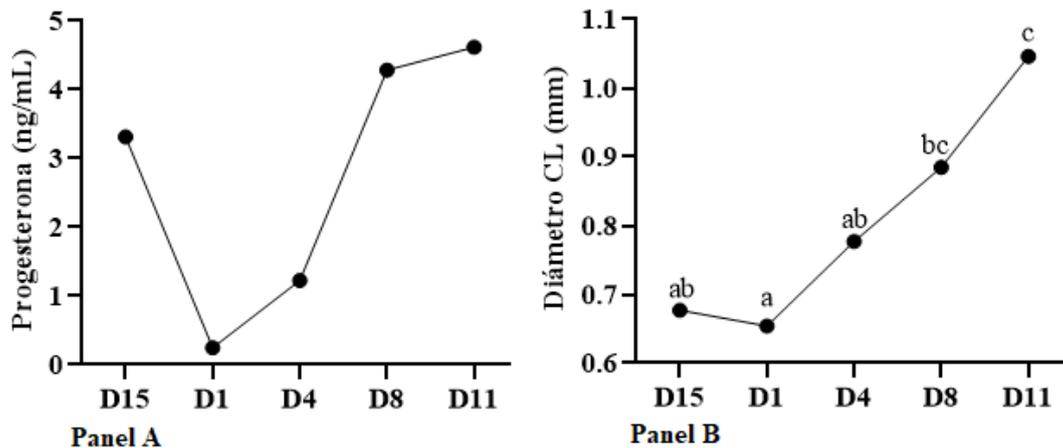
Matos et al. (2022) al caracterizar las fases del ciclo estral en la cobaya observaron que durante el estro predominaron células superficiales, en el metaestro las células intermedias fueron las más frecuentes con presencia moderada de leucocitos. Durante el diestro existió una distribución más uniforme entre células intermedias y superficiales y un número muy elevado de leucocitos, datos que coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

De igual forma Li & Shen, (2015) observaron durante el proestro mayor número de células intermedias concordando con Kühnel & Mendoza, (1992) y Lilley et al., (1997), mientras que durante el metaestro y diestro se observaron niveles elevados de leucocitos y células parabasaes, características concordantes con los del presente estudio.

### 5.3 Determinación de los niveles de progesterona en sangre y diámetro del CL, en cinco momentos diferentes

Se determinó que la concentración de progesterona en la primera valoración (día 15 del protocolo) fue de  $3,31 \pm 0,46$  ng/ml, esto a consecuencia de que las muestras fueron tomadas 2 horas luego de la última aplicación de P4 oral (Figura 16). El diámetro de los CLs en la primera valoración presentó un promedio de  $0,67 \pm 0,04$  mm. En la segunda valoración (día 1) del nuevo ciclo estral, los niveles de progesterona fueron bajos ( $0,24 \pm 0,01$  ng/ml), esto debido a que la ovulación se produce entre 1 a 1,5 días post celo (Sadeu et al., 2007); por lo tanto, la concentración de P4 determinada en la segunda valoración es sostenida por los CLs en regresión del ciclo anterior que presentaron un tamaño medio de  $0,65 \pm 0,04$  mm (Heap et al., 1967; Feder et al., 1968).

En la tercera valoración (día 4), la concentración de P4 se incrementó a  $1,22 \pm 0,13$  ng/ml, con un diámetro de los CLs hemorrágicos de  $0,77 \pm 0,03$  mm. Este patrón de incremento paulatino de la P4 se vio también, en el día 8 ( $4,28 \pm 0,28$  ng/ml), con un diámetro de CLs de  $0,9 \pm 0,04$  mm. En la última valoración (día 11) se observó una concentración de  $4,61 \pm 0,23$  ng/ml, con un diámetro de CLs de  $1,05 \pm 0,02$  mm (Figura 16 Panel A y B).



**Figura 16:** Concentración de progesterona (Panel A) y diámetro del cuerpo lúteo (Panel B), valorado en cinco momentos diferentes: último día de aplicación de la progesterona oral (D15), día 1 del nuevo ciclo estral, día 4, día 8, día 11 del ciclo estral. Prueba de Tukey al 5%

En forma general los resultados concuerdan con lo manifestado por Echeverría, (2005) quien menciona que durante la fase luteal en la etapa de diestro y metaestro tardío existe la presencia de cuerpos lúteos activos y por ende altos niveles de progesterona plasmática, mientras que la fase folicular: proestro y estro, los niveles de P4 son bajos (Hutz & Bejvan, 1990).

**Tabla 1:** Peso y diámetro promedio de ovario derecho (OD) e izquierdo (OI), valorado en cinco momentos diferentes del estudio

El peso promedio del ovario derecho (OD) e izquierdo (OI) se mostró similar ( $p>0,05$ ) estadísticamente en los días 15, 1, 4, 8 y 11 (Tabla 1). También, el diámetro medio del OD y OI fueron similares.

	D15	D1	D4	D8	D11	General
<i>Peso OD (mg)</i>	46,6 ± 13,8	48,4 ± 16,0	47,6 ± 12,7	38,2 ± 14,5	46,6 ± 12,0	45,7 ± 13,7
<i>Peso OI (mg)</i>	47,3 ± 11,3	40,4 ± 10,5	42,5 ± 8,8	34,1 ± 12,5	36,9 ± 10,3	41,1 ± 11,1
<i>Diámetro OD (mm)</i>	5,2 ± 0,6	5,2 ± 0,7	5,3 ± 0,6	5,0 ± 0,4	5,5 ± 0,8	5,2 ± 0,6
<i>Diámetro OI (mm)</i>	5,0 ± 0,4	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,4	4,9 ± 0,3	4,5 ± 0,8	4,9 ± 0,5

OD=ovario derecho. OI=ovario izquierdo.

Los resultados del peso de los ovarios obtenidos en el presente estudio fue superior a lo descrito por Aliaga, (1990) quien determinó un valor de 33 mg aproximadamente; sin embargo, ellos establecieron valores superiores en cuanto al tamaño de los ovarios (7 mm). Sin embargo, en un estudio realizado por Fernández et al. (2018) reportaron un peso de los ovarios de 77 ± 27 mg (derecho 77; izquierdo 76,3) valores superiores a nuestros resultados.

El índice gonadosomático (IGS) mostró valores similares (Tabla 2) en los cinco momentos diferentes ( $p>0,05$ ).

**Tabla 2:** Peso promedio de las cobayas, ovarios e índice gonadosomático, valorado en cinco momentos diferentes del estudio.

	D15	D1	D4	D8	D11	General
<i>Peso</i>						
<i>Cobaya</i> (g)	884,7 ± 57,1	876,7 ± 20,6	872,1 ± 60,6	864,8 ± 92,5	958,0 ± 146,9	886,2 ± 78,9
<i>Peso</i>						
<i>ovarios</i> (g)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,4 ± 0,01
<i>IGS</i>	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,002	0,005 ± 0,001

Peso de ovarios=peso promedio de los ovarios. IGS=índice gonadosomático (peso ovarios/peso corporal)\*100.

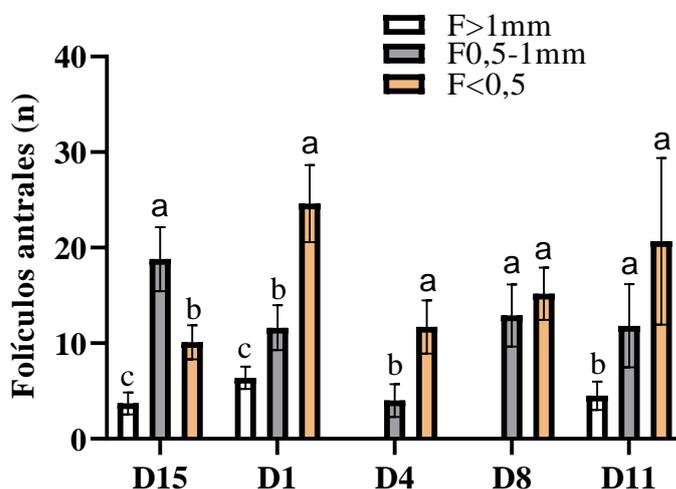
Los resultados obtenidos en nuestro trabajo coinciden con los descritos por Fernández et al. (2022) quienes valoraron el peso ovárico y el índice gonadosomático de 20 cobayas nativas y 20 mejoradas, determinando que no existe diferencia estadística significativa entre estos valores en la etapa de proestro y diestro; sin embargo los valores obtenidos en nuestro estudio son inferiores a los establecidos por Fernández et al. (2022), seguramente debido a que no se emplearon las mismas unidades de medida en ambos trabajos.

#### 5.4 Recuento de folículos antrales (FA) en cinco momentos diferentes

El número de folículos antrales (FA) encontrados en cada uno de los grupos establecidos en el presente estudio (>1 mm; entre 0,5-1 mm; <0,5 mm), en cinco momentos diferentes (días: 15; 1; 4; 8; 11), mostró que los FA >1 mm estuvieron presentes en el día 15 (3,7 ± 1,15 folículos), día 1 (6,4 ± 1,16 folículos), día 11 (4,5 ± 1,47 folículos); sin embargo, en las valoraciones del día 4 y día 8 no hubo presencia de este tipo de FA. Estos resultados son concordantes con lo descrito por Bland, (1980), quien observó la presencia de folículos mayores a 0,85 mm en el día 0 (celo), 1 (ovulación), 10 (Fase de dominancia de la primera onda folicular) del ciclo estral en la cobaya. Por lo tanto, este tipo de folículos serían considerados como dominantes.

Los FA con diámetro entre 0,5-1 mm su presencia fue similar en la valoración de día 1 (11,6 ± 2,35 FA), día 8 (12,9 ± 3,24 FA) y día 11 (11,8 ± 4,34 FA), Sin embargo, el mayor número

de este tipo de FA fue visualizado el día 15 ( $18,8 \pm 3,33$  FA) y en menor número el día 4 ( $4,0 \pm 1,73$  FA). Finalmente, los FA  $<0,5$  mm estuvieron presentes en mayor número el día 1 ( $24,6 \pm 4,03$  FA), seguidos del día 11 ( $20,7 \pm 8,72$  FA), día 8 ( $15,2 \pm 2,72$  FA), día 4 ( $11,18 \pm 2,78$  FA) y día 15 ( $10,1 \pm 1,79$  FA) (Figura 17)



**Figura 17:** Número promedio de folículos antrales; mayores a 1 mm ( $F > 1$  mm); folículos con tamaños entre 0,5 y 1 mm ( $F_{0,5-1}$  mm) y folículos menores a 0,5 mm ( $F < 0,5$  mm), observados en cinco momentos diferentes, días: 15, 1, 4, 8 y 11. ab=diferencia estadística entre grupos valorados en un mismo momento ( $p < 0,05$ )

Los resultados del presente estudio corroboran la información de que la cobaya posee un desarrollo folicular bifásico, con terminación de la primera onda folicular entre el día 10 y 11 con la atresia de los folículos dominantes (FD). En la segunda onda los folículos preovulatorios (FPO) terminan en la ovulación con un diámetro de 0,85 mm (Bland, 1980).

En base a estos resultados se asume que los folículos  $>1$  mm observados en la valoración del día 1 y 11 corresponden con los FD y FPO; mientras que los folículos con diámetros entre 0,5-1 mm serían aquellos que no fueron seleccionados y que ingresaron en el proceso de atresia fisiológica del ciclo anterior (día 1) y de primera onda folicular (día 11 del ciclo estudiado); además, la presencia de folículos  $<0,05$  mm corresponden al nuevo grupo de folículos que entraron en la fase de reclutamiento.

En general de acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que en el día 15 se observaron un total de  $32,6 \pm 4,91$  folículos de los diferentes tamaños, en el día 1 ( $42,6 \pm 4,38$ ), día 4 ( $15,7 \pm 2,48$ ), día 8 ( $28,1 \pm 4,41$ ) y día 11 ( $37 \pm 12,54$ ), dando una media general de  $30,1 \pm$

2,69 folículos antrales de diferentes tamaños que fueron visibles en los ovarios y estarían disponibles para la colección de ovocitos; es decir, en promedio, 15,1 folículos/ovario.

### **5.5 Evaluación del porcentaje de recuperación de ovocitos**

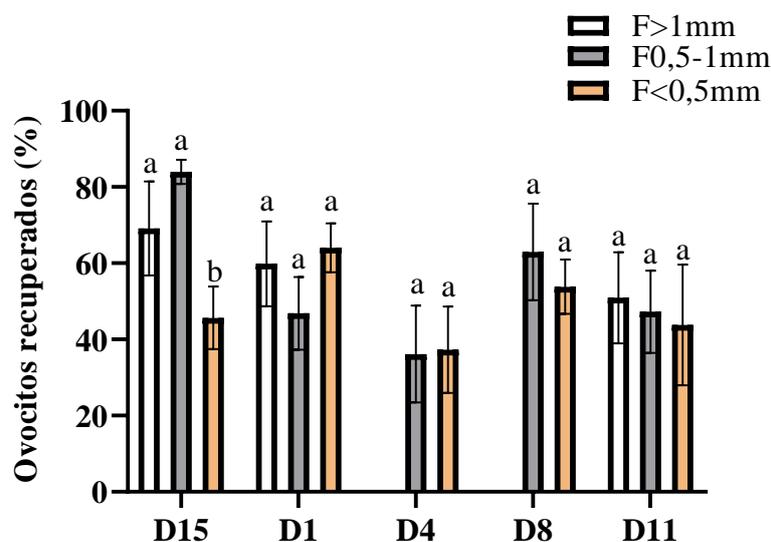
Mediante la técnica de aspiración folicular en el presente estudio se recolectaron 1249 COC´s de 86 ovarios (14,52 COC´s/ovario), con un porcentaje de recuperación del 46,1%.

Sin embargo, al aspirar folículos >1mm se recuperó en general un 32,8% de COC´s, llegando a obtenerse un porcentaje mayor de recuperación en el día 15 (69,1%), seguido del día 1 (59,8%) y día 11 (50,9%), en contraposición en el día 4 y 8 no hubo folículos de esta categoría (Figura 18).

Al aspirar folículos de 0,5-1 mm se obtuvo un 56,7% de recuperación general de COC´s, con un mayor porcentaje en el día 15 (83,9%), seguido del día 8 (62,9%), día 11 (47,2%), día 1 (46,8%) y día4 (36,2%).

Finalmente, la recuperación de COC´s en los folículos <0,5 mm fue en general del 48,8%, con su valor más alto en el día 1 (64,1%), seguido del día 8 (53,8%), día 15 (45,7%), día 11 (43,8%) y día 4 (37,3%).

Estos resultados demuestran que en el día del retiro de la progesterona exógena (día 15) es el momento en el cual se produjo el mayor porcentaje de recuperación de COC´s sumando las tres categorías (>1mm; 0,5-1 mm; <0,5 mm) de folículos en estudio (66,2%), seguido de día 1 (56,9%), día 11 (47,1%), día 8 (38,9%) y día 4 (24,5%) (Figura 18). Estos resultados están en concordancia con el enunciado que manifiesta que el porcentaje de recuperación de ovocitos en cobayos varía dependiendo de la etapa del ciclo reproductivo; además, del tipo de crianza, alimentación, peso y edad (Naranjo, 2010).



**Figura 18:** Número promedio de ovocitos recuperados por aspiración de folículos mayores a 1 mm ( $F>1\text{mm}$ ); folículos con tamaños entre 0,5 y 1 mm ( $F0,5-1\text{mm}$ ) y folículos menores a 0,5 mm ( $F<0,5\text{mm}$ ), observados en cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8 y 11. ab=diferencia estadística entre grupos valorados en un mismo momento ( $p<0,05$ )

Los COC's recuperados en las diferentes categorías de folículos ( $>1\text{ mm}$ ; entre 0,5-1 mm;  $<0,5\text{ mm}$ ) fueron clasificados en tipo A; B; C y D, para luego ser agrupados en aptos (tipo A; B) y no aptos (tipo C; D). En los resultados que se detallan en la Tabla 3 se puede observar que 42,9% de COC's obtenidos de los folículos  $>1\text{ mm}$  fueron clasificados como de tipo A y un 28,6% de tipo B, es decir, que el 71,4% de los COC's recuperados de folículos  $>1\text{ mm}$  fueron COC's aptos. Pero también se obtuvieron porcentajes aceptables de COC's aptos (61,5%) de folículos de 0,5-1 mm, así como de  $<0,5\text{ mm}$  (60%), por lo tanto, se debería aspirar preferentemente folículos  $>1\text{mm}$  para obtener COC's de mejor calidad.

En un trabajo realizado en cobayas se determinó un porcentaje de recuperación de COC's mediante la técnica de cortes del 66,6% COC's de tipo A, 13,3% tipo B y 20% de tipo C (Zhinin & Buñay, 2022). El porcentaje de COC's tipo A y B fueron menores a los obtenidos por nosotros, la explicación esta en la técnica de recuperación empleada.

**Tabla 3:** Porcentaje de complejos cúmulo ovocitos (COC's) encontrado en cada una de las categorías de folículos durante el experimento.

Tamaño Folículos	Tipo de COC's					
	A	B	C	D	Aptos	No aptos
>1 mm	42,9	28,6	14,3	14,3	71,4	28,6
0,5-1 mm	18,3	43,3	14,4	24	61,5	38,5
<0,5 mm	0	60	20	20	60	40

>1 mm=folículos mayores a 1 mm. 0,5-1 mm=folículos con diámetro entre 0,5 1 mm. <0,5 mm=folículos con diámetros menores a 0,5 mm. Tipos de COC's=A, B, C, D. Aptos=A+B. No aptos=C+D.

Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por Zhinin & Buñay, (2022) quienes al clasificar los ovocitos encontraron que 31,05% (236) correspondían a la categoría A, el 34,61% (263) a la categoría B y el 34,34% (261) a la categoría C; Considerándose un 65,66% (499) como aptos (A y B) y un 34,34% (261) de no aptos (C).

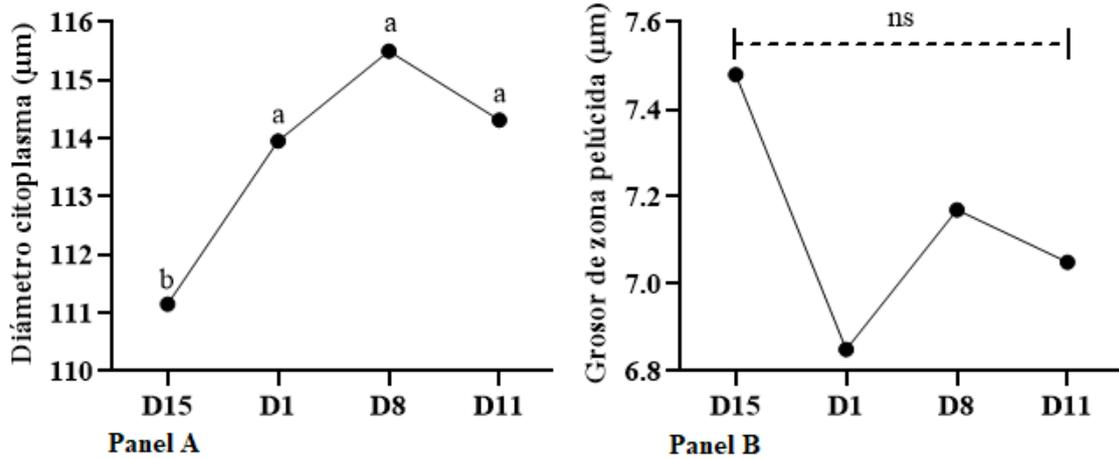
Similarmente, Wang et al. (2019) obtuvieron 52,48% de COC's de tipo A, 36,38% de B y 9,8% de C, lográndose recuperar un 88,5% de aptos; Esta diferencia con nuestro trabajo puede ser explicada debido a que el autor obtuvo los ovocitos exclusivamente de folículos preovulatorios, mientras que en nuestro estudio fueron obtenidos de folículos de diferentes tamaños.

Solís & Chávez, (2015) recuperaron 180 ovocitos de 60 ovarios, de los cuales el 66,6% (120) fueron de categoría A, 13,33% (34) de categoría B y 20% (36) de categoría C, encontrando un total de 154 ovocitos aptos y 36 no aptos para maduración *in vitro*.

## 5.6 Diámetro ovocitario y grosor de la zona pelúcida en ovocitos aspirados de folículos de diferentes tamaños

### 5.6.1 Ovocitos aspirados de folículos de tamaño >1 mm

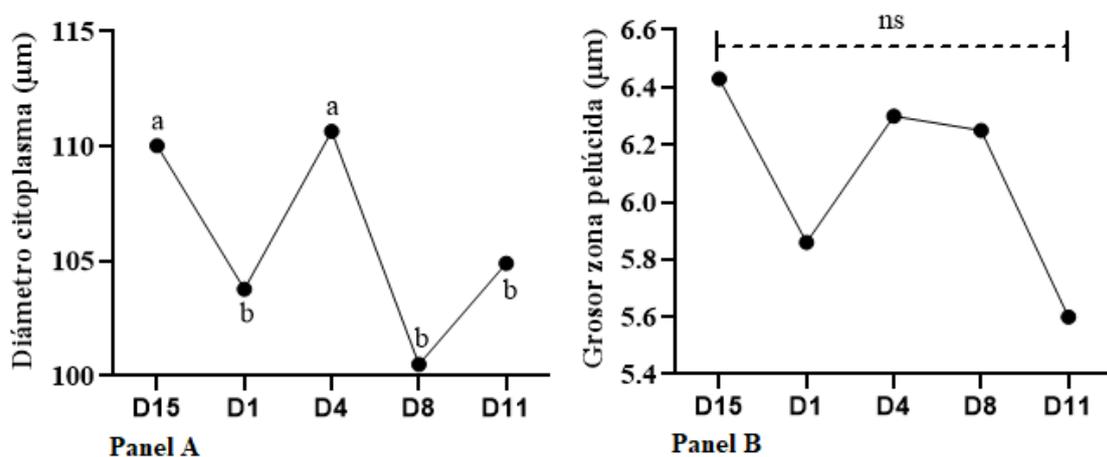
En este apartado se detalla los resultados del diámetro del citoplasma de ovocitos provenientes de folículos >1 mm, determinando que existe diferencia estadística significativa entre los ovocitos recuperados al día 15 ( $111,2 \pm 0,46 \mu\text{m}$ ) y los recuperados los días 1 ( $113,9 \pm 0,60 \mu\text{m}$ ); 8 ( $115,5 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ) y 11 ( $114,3 \pm 0,32 \mu\text{m}$ );(Figura 19 Panel A); mientras que en la (Figura 19 Panel B), se muestra el grosor de la zona pelúcida de ovocitos recuperados al día 15 ( $7,5 \pm 0,49 \mu\text{m}$ ); 1 ( $6,9 \pm 0,25 \mu\text{m}$ ); 8 ( $7,2 \pm 0,57 \mu\text{m}$ ) y 11 ( $7,1 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ), en los que no se observó diferencia estadística entre los diferentes momentos monitoreados.



**Figura 19:** diámetro promedio del citoplasma y de la zona pelúcida de los ovocitos, aspiración de folículos mayores a 1 mm ( $F > 1\text{mm}$ ), en cuatro momentos diferentes: día 15, 1, 8 y 11

**5.6.2 Ovocitos aspirados de folículos de tamaño entre 0,5-1 mm**

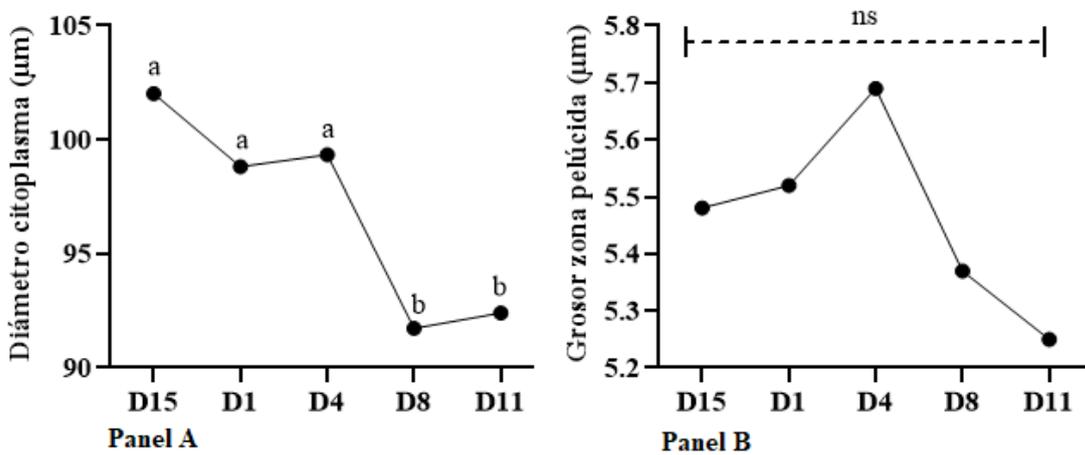
Al medir el tamaño del citoplasma de ovocitos provenientes de folículos entre 0,5-1 mm (selección) se determinó que existe diferencia estadística significativa entre el tamaño del citoplasma de ovocitos recuperados los días 15 ( $110,0 \pm 1,56 \mu\text{m}$ ) y 4 ( $110,7 \pm 2,21 \mu\text{m}$ ) en relación a los ovocitos recuperados los días 1 ( $103,8 \pm 1,21 \mu\text{m}$ ); 8 ( $100,5 \pm 1,58 \mu\text{m}$ ) y 11 ( $104,9 \pm 0,63 \mu\text{m}$ ); (Figura 20, Panel A). Mientras que en la (Figura 20, Panel B), se observa el grosor zona pelúcida de ovocitos recuperados en cinco momentos diferentes: día 15 ( $6,4 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ), 1 ( $5,9 \pm 0,17 \mu\text{m}$ ), 4 ( $6,3 \pm 0,24 \mu\text{m}$ ), 8 ( $6,3 \pm 0,27 \mu\text{m}$ ) y 11 ( $5,6 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ) entre los que no existe diferencia estadística.



**Figura 20:** diámetro del citoplasma y la zona pelúcida de ovocitos aspirados de folículos con tamaños entre 0,5 y 1 mm ( $F_{0,5-1\text{mm}}$ ), en cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8 y 11.

**5.6.3 Ovocitos aspirados de folículos <0,5 mm**

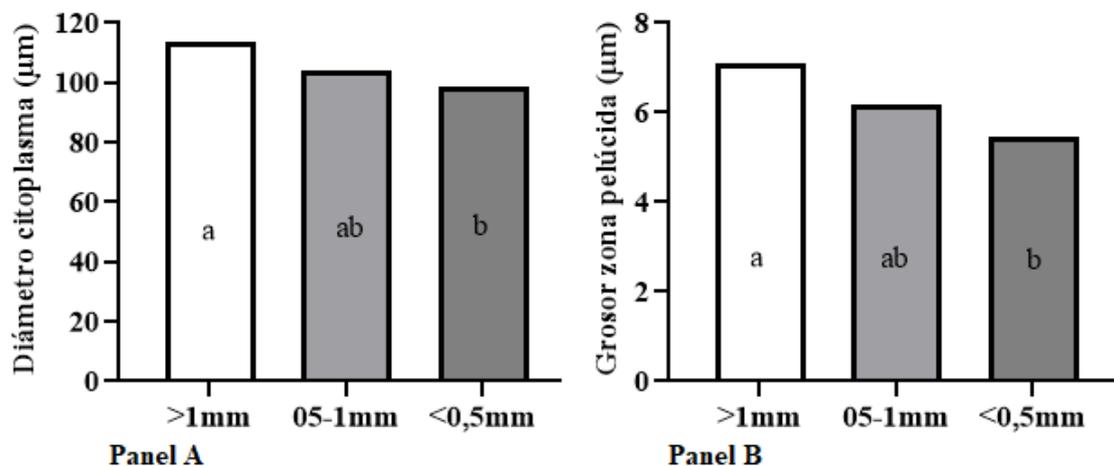
Al medir el diámetro de ovocitos provenientes de folículos menores a 0,5 mm (reclutamiento) se determinó que hubo diferencia estadística, ya que en los días 15 ( $102,0 \pm 0,50 \mu\text{m}$ ); 1 ( $98,8 \pm 1,03 \mu\text{m}$ ) y 4 ( $99,3 \pm 1,31 \mu\text{m}$ ) el diámetro ovocitario fue mayor, comparado con los ovocitos recuperados los días 8 ( $91,7 \pm 0,88 \mu\text{m}$ ) y 11 ( $92,4 \pm 2,66 \mu\text{m}$ ), los cuales tuvieron un tamaño menor (Figura 21; Panel A). En la (Figura 21, Panel B), se observa el grosor de la zona pelúcida de ovocitos recuperados en cinco momentos: día 15 ( $5,4 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ), 1 ( $5,5 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ), 4 ( $5,7 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ), 8 ( $5,4 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ) y 11 ( $5,3 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ), observándose que no existió diferencia estadística entre los grupos.



**Figura 21:** diámetro del citoplasma y la zona pelúcida de ovocitos aspirados de folículos con tamaños menor a 0,5 mm ( $F < 0,5\text{mm}$ ), en cinco momentos diferentes: día 15, 1, 4, 8 y 11.

**5.6.4 Diámetro ovocitario y grosor de la zona pelúcida en ovocitos provenientes de folículos >1mm, entre 0,5-1mm y <0,5 mm independientemente del momento de la valoración**

Se determinó que los ovocitos provenientes de folículos >1 mm ( $113,9 \pm 0,32 \mu\text{m}$ ) y folículos <0,5 mm ( $98,4 \pm 0,50 \mu\text{m}$ ) fueron diferentes estadísticamente en cuanto al diámetro ovocitario (Figura 22, Panel A). De igual forma, en la (Figura 22, Panel B), al valorar el grosor de la zona pelúcida de ovocitos provenientes de folículos >1 mm ( $7,1 \pm 0,17 \mu\text{m}$ ) y <0,5 mm ( $5,5 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ) se determinó que existió diferencia estadística significativa entre dichos grupos.



**Figura 22:** Diámetro del citoplasma y grosor de la zona pelúcida de ovocitos aspirados de folículos con tamaños mayores a 1mm; entre 05-1mm y menor a 0,5 mm durante la valoración del experimento.

Los valores obtenidos en el presente estudio respecto al diámetro del citoplasma y el grosor de la zona pelúcida son menores comparado con los descritos por Fernández et al. (2018), en el cual se determinó que el grosor de la zona pelúcida fue  $12,1 \pm 2,5$  micras, mientras que el diámetro del ovocito fue de  $75,6 \pm 8,2$  micras.

### Conclusiones

- La administración de progesterona oral por 15 días consecutivos en dosis de 0,22 mg/Kg de peso vivo permite mantener la concentración de la hormona sobre los valores basales
- Una vez retirada la fuente de progesterona los niveles de esta hormona descendieron a valores basales, lo cual induce la presencia del celo en una ventana de tiempo entre 2 y 4 días
- El cuerpo lúteo de las cobayas presentó una fase de crecimiento, estática y regresión
- La concentración de progesterona se mantiene por debajo de los 2 ng/ml en el día 1 y 4 del ciclo estral, duplicando sus valores en el diestro: días 8 y 11
- Se corrobora que la dinámica folicular de la cobaya es bifásica, presentando mayor población folicular en el día del retiro de la fuente de progesterona. Además, en este día se observó mayor cantidad de folículos disponibles para la aplicación de biotécnicas como la superovulación y la aspiración folicular
- El folículo preovulatorio en la cobaya presentó un diámetro entre 0,5-1 mm y están presentes en el día 1 del ciclo estral
- Los folículos >0,5 mm proporcionaron COC's de mayor calidad

## Recomendaciones

- Se recomienda continuar con el estudio de la dinámica folicular en este roedor
- Es necesario implementar un estudio de superovulación basados en estos principios fisiológicos observados en este trabajo
- Es importante difundir el protocolo de sincronización del celo en la cobaya a gente involucrada en este tipo de explotaciones

## Referencias

- Áldas, C. M. O. (2012). Evaluación de Dos Métodos de Sincronización del Estro en Cuyes. <Http://Dspace.Espoch.Edu.Ec/Handle/123456789/1612>.
- Aliaga, L. (1990). Selección y Mejoramiento de los cuyes. Universidad Nacional Del Centro Del Perú. Lima.
- Aliaga, L., Moncayo, R., Rico, E., & Caycedo, A. (2009). Producción de cuyes (UCSS).
- Araníbar, E., & Echevarría, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Rev Inv Vet Perú*, 25, 29–36.
- Arcilla, V., Serrano, C., Hernández, M., & Mesa, L. (2005). Estandarización de la citología vaginal exfoliativa correlacionando los niveles séricos de progesterona en perras durante la peri-ovulación. *Speido Mus*.
- Aréchiga, C., Cortés, Z., Hernández, P., Flores, G., Rochín, F., & Ruiz, E. (2021). Revisión: Función y regresión del cuerpo lúteo durante el ciclo estral de la vaca. 8. <https://doi.org/https://doi.org/10.21929/abavet2019.924>
- Astapova, O., Minor, B. M. N., & Hammes, S. R. (2019). Physiological and Pathological Androgen Actions in the Ovary. *Endocrinology*, 160(5), 1166–1174. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00101>
- Ayala, L., Rodas Carpio, R., Almeida, A., Torres, C., & Nieto, P. (2017). Espículas peneanas del cobayo (*Cavia porcellus*), influencia sobre el comportamiento sexual, fertilidad y calidad espermática. *Produccion Animal*, 29(3), 36–42.
- Balgobin, S., Montoya, T. I., Shi, H., Acevedo, J. F., Keller, P. W., Riegel, M., Wai, C. Y., & Word, R. A. (2013). Estrogen alters remodeling of the vaginal wall after surgical injury in guinea pigs. *Biology of Reproduction*, 89(6), 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112367>
- Barahona, M., & Quishpe, O. (2012). Inducción de superovulación en cobayas primerizas, usando Gonadotropina serica con tres dosis diferentes. 140. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/653/1/T-UCE-0014-19.pdf>
- Bean, A. D. (2013). Ovarian Cysts in the Guinea Pig (*Cavia porcellus*). 16, 757–759.
- Behr, B., & Whang, H. (2004). N. 72–76. <http://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/clasificación.pdf>

- Beltrán, K., & Córdova, X. (2012). Evaluación de la maduración in vitro de oocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) en Ecuador: resultados preliminares. REDUCA, 4(15). <http://www.revistareduca.es/index.php/reduca/article/view/1422>
- Bertram, C. A., Müller, K., & Klopfleisch, R. (2018). Genital Tract Pathology in Female Pet Guinea Pigs (*Cavia porcellus*): a Retrospective Study of 655 Post-mortem and 64 Biopsy Cases. Journal of Comparative Pathology, 165, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.09.001>
- Bland, K. p. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle. Journal of Reproduction and Fertility, 73–76. [https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/60/1/jrf\\_60\\_1\\_011.xml](https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/60/1/jrf_60_1_011.xml)
- Cabrera, J., & Jimenez, C. (2012). Evaluación de prostaglandina natural (Dinoprost) y prostaglandina sintética (Cloprostenol) en el porcentaje de preñez con protocolo de sincronización (SIDR) a tiempo fijo en vacas holstein del cantón Nbón provincia del Azuay.
- Campoverde, V. E. C., Hernández, M. I. O., Torres, R. M. L., Vilela, F. Y. G., Jaramillo, Á. V. L., & Cuenca, M. O. B. (2018). Emprendimientos de cobayos en zonas rurales del cantón Saraguro (Loja, Ecuador). Cedamaz, 7(1), 110–121.
- Cañón, K., Cajas, Y., García, R., Lorenzo, P., Carrera, R., Rebollar, P., & Arias, M. (2015). Effect of epidermal growth factor on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of guinea pig oocytes. Developmental Biology and Physiology of Reproduccion.
- Cedano Castro, J. I. (2016). Effect of ovarian stimulation treatments on the embryo quality in rabbit. 53.
- Donal, M. (1981). Endocrinología Veterinaria y Reproducción.
- 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>
- Duma, M. (2019). Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/32159>
- Echeverría, J. (2005). Endocrinología Reproductiva. RED VET.

<https://www.redalyc.org/pdf/636/63612648003.pdf>

Espín, P. (2018). Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración. Redalyc. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=179144263003](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179144263003)

Feder, H., Resko, J., & Goy, R. (1968). Razones de concentración de progesterona en el plasma de la arteria Ip de cobayos durante el ciclo estral. *J. Endoc*, 505–513.

Felipe, A., & Masson, P. (2005). Un modelo descriptivo del sistema reproductor hembra del coipo (*Myocastor coypus*). *RED VET*, 6, 1–22. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617178009>

Felipe, A., Teruel, M., Callejas, S., & Cabodevila, J. (2001). Description of the characteristics of oocytes and cygotes of coypu (*Myocastor coypus*). *Revista Chilena de Anatomía*, 161–165. <https://doi.org/10.4067/s0716-98682001000200007>

Fernández, A. (2003). Dinámica Folicular. 175. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1612/1/17T0835.pdf>

Fernández, A, Encalada, T., Guaman, A., Ayala, L., Argudo, D., Rosales, C., & Perea, F. (2018). Caracterización morfométrica de útero, ovarios y ovocitos de cobayas criollas (*Cavia porcellus*) de la sierra sur de Ecuador. Reunión de La Asociación Latinoamericana de Producción Animal V Simposio Internacional de Producción Animal, XXVI, 149.

Fernández, A, Rosales, C., Garzón, J., Argudo, D., Ayala, L., Guevara, G., Maldonado, J., & Perea, F. (2022). Características morfológicas e histológicas de los ovarios de dos grupos genéticos de cobayos (*Cavia porcellus*) de América del Sur. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 11.

Fernández, Adriana, Encalada, T., Humberto, G., Guamán, A., Ayala, L., Rosales, C., Argudo, D., & Perea, F. (2018). Caracterización morfométrica del útero, ovarios y ovocitos de cobayas nativas (*Cavia porcellus*) de la Sierra Sur de Ecuador. 26, 1. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30751/1/documento.pdf>

Ferrando, G., & Urquieta, B. (1982). Prostaglandinas, un enfoque global. 10. [https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CD/mon\\_vet\\_articulo/0,1412,SCID%253D7479%2526SID%253D411%2526PRT%253D0,00.html](https://web.uchile.cl/vignette/monografiasveterinaria/monografiasveterinaria.uchile.cl/CD/mon_vet_articulo/0,1412,SCID%253D7479%2526SID%253D411%2526PRT%253D0,00.html)

Ferrín, E., & Murudumbay, R. (2022). Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la sincronización de celo en cobayas. 61.

<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/40179/1/Trabajo de Titulacion.pdf>

Flynn, J., Duffy, P., Boland, M., & Evans, A. (2000). Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation in a persistent follicle in cyclic ewe lambs. *Anim Reprod Sci*, 285–296.

Gonzales, H., & Gonzales, H. (2005). Maturation of pig oocytes invitro in a medium whit pyruvate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 869–872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000600008>

Grégoire A, Joly T, Huamán FE, Silva ARM, L. T. (2018). Bulletin de l ' Institut français d ' études andines génétiques del cuy ( Cavia congelación de embriones. 39(1), 1–6.

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, A, Allard, A., Huamán, E., Alvarado, E., Buff, S., Berard, M., & Joly, T. (2012). Control del ciclo estral en la cuy (*cavia porcellus*). *SPRA*, 2.

Grégoire, A, Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. ., Alvarado, E., Buff, M., & Joly, T. (2012). Control del Ciclo Estral en la cuy (*Cavia Porcellus*). *Spermova*.

Grégoire, Anne, Joly, T., Fuertes, E., María, R., Arce, S., & Trinidad, S. (2010). Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones. *Bullet*, 39 (1), 185–188. <https://doi.org/10.4000/BIFEA.2164>

Guilmette, J., Langlois, I., Hélie, P., & De Oliveira, A. (2015). Comparative study of 2 surgical techniques for castration of guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Canadian Journal of Veterinary Research*, 79(4), 323–328.

Hafez, E. (1987). *Folículoogénesis, maduración del óvulo y ovulación* (Interamericana (ed.); 5th ed.).

Hargaden, M., & Singer, L. (2012). *Anatomy, Physiology, and Behavior of the Guinea Pig. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 575–602. <https://doi.org/10.1016/B978-01-2-380920-9.00020-1>

Heap, R., Perry, J., & Rowland, I. (1967). Función de corpus luteum en el cobayo; arterial y los niveles de progesterona lútea, y los efectos de la histerectomía y la hipofisectomía. *J. Reprod. Fert*, 537–553.

- Herdoíza, A., & Javier, A. (2016). Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho. 115.
- Hernández, M. (1994). *Endocrinología Fisiológica General* (1ra ed.).
- Hutz, R. J., & Bejvan, S. M. (1990). Changes in follicular populations, in serum estrogen and progesterone, and in ovarian steroid secretion in vitro during the guinea pig estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 42(2), 266–272. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.2.266>
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 23–32. [https://doi.org/doi:10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6).
- Jiménez, R., & Huamán, R. (2010). *Manual para el manejo de reproductores híbridos especializados en producción de carne*. INCAGRO-ACRICUCEN-UNMSM.
- Kalinowski, R., Berlot, C., Jones, T., Ross, L., Jaffe, L., & Mehlmann, L. (2004). Maintenance of meiotic pothase arrest in vertebrate oocytes by a Gs protein-mediated pathway. *Dev Biol*, 1–13.
- Khurana, N., & Niemann, H. (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cell and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 741–756. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00387-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00387-3)
- Kosaca, T., Obata, M., Sugimoto, K., Saito, T., Takahashi, K., & Sugiyama, M. (1994). Effects of long term progesterone treatment on the timing of puberty in female guinea pigs. *Journals of Reproduction and Development*, 49–54.
- Kühnel, W., & Mendoza, A. (1992). Scanning electron microscope investigations on the vaginal epithelium of the guinea pig during the estrous cycle. *Histol Cytol*, 205–210.
- Laik-Schandelmaier, C., Klopffleisch, R., Schöniger, S., Weiffenbach, G., Staudacher, M., & Aupperle, H. (2017). Spontaneously Arising Tumours and Tumour-like Lesions of the Cervix and Uterus in 83 Pet Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Journal of Comparative Pathology*, 156(4), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.03.002>
- Li, J., & Shen, T. (2015). Expression characteristics of MMP-2 and MMP-9 in guinea pig ovaries during the estrous cycle. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 17329–17340. <https://doi.org/10.4238/2015.December.21.1>
- Lilley, K. G., Epping, R. J., & Hafner, L. M. (1997). *The Guinea Pig Estrous Cycle: Correlation*

- of Vaginal Impedance Measurements with Vaginal Cytologic Findings. *Laboratory Animal Science*, 47(6), 632–637.
- Lilley, K., Hafner, L., & Epping, R. (1997). No El ciclo estral de la cobaya: correlación de la impedancia vaginal mediciones con hallazgos citológicos vaginales. *Lab Anim Sci*.
- López, O. (2013). Sincronización del celo en vacas.
- Lorenzo, M., Tello, M., Fischman, M., Claver, J., & Lombardo, D. (2015). Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. *IN-VET*, 25–34. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=179144263003](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179144263003)
- Lorenzo, P. (2021). Aspectos fisiológicos en la maduración de los oocitos: un largo camino de procesos básicos y aplicados. 100.
- Luis Ayala, G., Tito Palacios, C., Pedro Nieto, E., Guido Calle, O., Ramiro Rodas, C., Jorge Dutan, S., Murrillo, Y., & Jorge Samaniego, C. (2019). Capacidad de reinicio de la meiosis de ovocitos provenientes de folículos de varios tamaños obtenidos de ovarios de camal. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(3), 1164–1174. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15437>
- Martínez, Y. (2013). Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación in vitro. [moz-extension://2e12c3da-a09b-42a1-b271-d94bbd1e8e39/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fdigibuo.uniovi.es%2Fdspace%2Fbitstream%2Fhandle%2F10651%2F17398%2FTFM%3Bjsessionid%3D7F4162638BFD0AD745C8652A624DDB31%3Fsequence%3D1](https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15437)
- Matos, A., Kugelmeier, T., Araújo, D., & Silva, K. (2022). Early puberty in short-haired Guinea pigs kept in laboratory animal facilities. *Animal Reproduction*, 19(1), e20210068. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0068>
- McCracken, J., Custer, E., & Lamsa, J. (1999). Luteólisis: un evento mediado por neuroendócrinos. *PUBMED*. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.263>.
- Mohammadzadeh, M., Fesahat, F., Khoradmehr, A., & Khalili, M. (2018). Influential effect of age on ppcyte morphometry, fertilization rate and embryo development following IVF in mice. *Middle East Fertility Society Journal*, 117–120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.09.006>
- Naranjo Zapata, D. M. (2010). Evaluación de la crioconservación de ovocitos en cuyes (*cavia porcellus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina

veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. 67.

Nilsson, E., & Skinner, M. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development y folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig*, 17–20.

Noonan, D. (1994). The guinea pig (*Cavia porcellus*). *ANZCCART News*, 1–7.

Oñate, C. (2012). Evaluación de dos métodos de sincronización del estro en cuyes. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1612>

Pignon, C., & Mayer, J. (2020). Guinea Pigs. In *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery (Fourth Ed)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48435-0.00021-6>

Pilny, A. (2014). Ovarian Cystic Disease in Guinea Pigs. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 17(1), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.09.003>

Reyes, F., Aguilar, S., Enríquez, M., & Uvidia, H. (2021). Analisis de la producción y comercialización de cuy en el Ecuador. *Dominio de Las Ciencias*, 7(6), 1004–1018.

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>

Sagata, N. (1998). Introduction: meiotic maturation y arrest in animal oocytes. *Semin Cell Dev Biol*, 535–537.

Santos, V. (2007). Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15, 2.

Senger, P. (1999). *Pathways to pregnancy y parturition (2nd ed.)*. Pullman.

Shi, F., Watanabe, G., Trewin, A., Hutz, R., & Taya, K. (2000). Localization of ovarian inhibin/activin subunits in follicular dominance during the estrous cycle of guinea pigs. *Zool Sci*, 1311–1320.

Shively, M. (2008). *Anatomía Veterinaria Básica, comparativa y clínica (6th ed.)*.

Shomer, N. H., Holcombe, H., & Harkness, J. E. (2015). Chapter 6 - Biology and Diseases of Guinea Pigs. In *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00006-7>

Solís, R., & Chávez, P. (2015). Evaluación de producción in vitro de embriones en cuyes

- (*cavia porcellus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi [LATACUNGA / UTC / 2015]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2895>
- Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). *Farmacología Veterinaria* (McGraw-Hill).
- 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>
- Tarazona, A., López, Á., & Olivera, M. (2010). La competencia del ovocito. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/12377/23371>
- Taylor, D. K., & Lee, V. K. (2012). Guinea Pigs as Experimental Models. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0>
- Thomas, F., & Vanderhyden, B. (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 19. <https://doi.org/http://doi.org/10.1186/1477-7827-4-19>
- Touma, C., Palme, R., & Sachser, N. (2001). Different types of oestrous cycle in two closely related South American rodents (*Cavia aperea* and *Galea musteloides*) with different social and mating systems. *Reproduction*, 121(5), 791–801. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210791>
- Ueno, S., & Niimura, S. (2008). Size of Perivitelline Space and Incidence of Polyspermy in Mouse Oocytes Matured In Vivo and In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(1), 44–49. <https://doi.org/10.1274/jmor.25.44>
- Velarde, N. (2000). No Title. [http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/c&d\\_9\\_art\\_28.pdf](http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/c&d_9_art_28.pdf).
- Vivas, T. (2009). *Manual de crianza de cobayos (Cavia porcellus)*. Universidad Nacional Agraria, 1, 49.
- 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*, 7479–7491.
- Wang, Jiqiang, 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), 7479–7491.

Wilson, R. L., Lampe, K., Matuszewski, B. J., Regnault, T. R. H., & Jones, H. N. (2021). Time mating guinea pigs by monitoring changes to the vaginal membrane throughout the estrus cycle and with ultrasound confirmation. *Methods and Protocols*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/mps4030058>

Yao, M., Cheng, W., Liu, L., Zheng, H., Gu, W., Zhang, J., Wang, L., Su, Y., & Liu, Y. (2021). Relación entre la configuración de la cromatina y la capacidad de maduración in-vitro en ovocitos de cobayo. *Wiley*, 8. <https://doi.org/10.1002/vms3.596>

Zhinin, A., & Buñay, P. (2022). Implementación de un protocolo de maduración in vitro de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/39214>

## Anexos

### Anexo A

Pesaje de cobayas



### Anexo B

Valoración de la apertura de la membrana vaginal



## Anexo C

Toma de muestra (hisopado vaginal)



## Anexo D

Muestras de sangre y suero posterior a su centrifugación



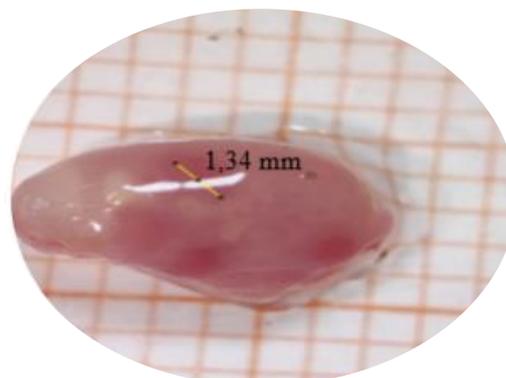
## Anexo E

Ovarios rotulados y listos para ser pesados



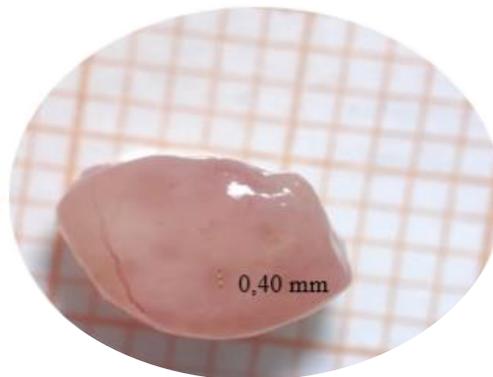
## Anexo F

Folículo mayor a 1 mm



## Anexo G

Folículo menor a 0,5 mm



## Anexo H

Tinción de muestras para citología



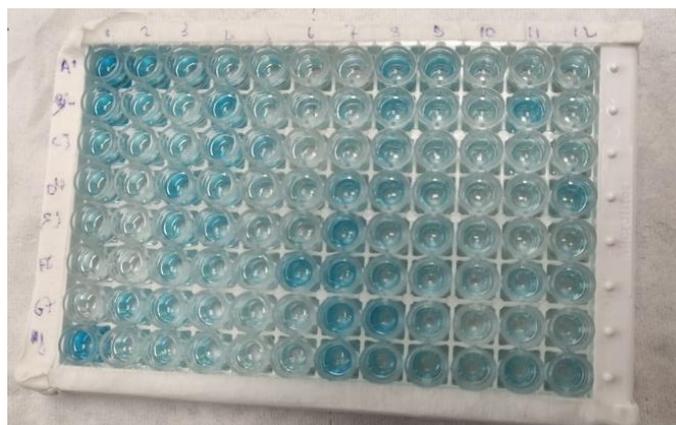
## Anexo I

Reactivos del kit Elisa para medir progesterona en suero



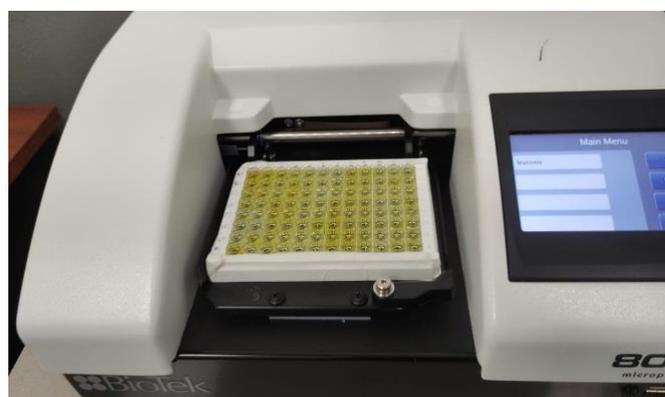
## Anexo J

Muestras de suero posterior a su incubación empleando el kit Elisa



## Anexo K

Procesamiento de muestras de suero con reactivos



## Anexo L

Ovocitos recuperados y clasificados por tamaño del folículo



## Anexo M

Toma de datos y pesaje de ovarios mediante la balanza de precisión



## Anexo N

### Evaluación de la citología vaginal

