

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Respuesta ovárica en cobayas (*Cavia porcellus*) empleando un protocolo de superovulación basado en la aplicación de la hormona folículo estimulante-recombinante

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

Autores:

Cristhian Erick Cuenca Espinoza

Mateo Sebastián Ñauta Díaz

Director:

José Luis Pesántez Pacheco

ORCID:  0000-0002-5669-6014

Cuenca, Ecuador

2023-03-24

Resumen

La respuesta ovárica de cobayas (*Cavia porcellus*) se evaluó administrando un protocolo de superovulación basado en la administración intraperitoneal de la hormona folículo estimulante-recombinante (rFSH). Seleccionando 18 hembras multíparas con edad media de 80 ± 15 días, con un peso entre 800g y 1150g, tuvieron un proceso de adaptación de 15 días con concentrado. Antes de la superovulación, las hembras fueron sincronizadas con progesterona (P4) (Altrenogest®, 0,22mg/kg) vía oral durante 15 días. Al finalizar la administración de P4 las hembras fueron divididas aleatoriamente en tres grupos: grupo 1 (A-rFSH) recibió una dosis total de 30 UI de rFSH (Gonal-F®) dos veces al día antes del retiro de P4; grupo 2 (D-rFSH) recibió la misma dosis después del retiro de P4; y grupo 3 (control) no recibió dosis. La administración de rFSH antes y después del retiro de P4 no modificó la cantidad de estructuras colectadas en las cobayas. Asimismo, la administración de rFSH después del retiro de P4 ocasionó que las hembras entren en celo en menor tiempo (D-rFSH $11,15 \pm 2,3$; A-rFSH $45,15 \pm 2,8$; C $44,5 \pm 4,1$ horas, $p < 0,0001$). Al igual que la administración de rFSH ocasiona un menor volumen ovárico (A-rFSH $39,8 \pm 10,2$; D-rFSH $29,6 \pm 8,1$ vs. C $75,8 \pm 44,5$, $p < 0,01$). En conclusión, la superovulación con rFSH antes y después del retiro de P4 no ocasiona efecto sobre la respuesta ovárica de la cobaya y por consiguiente sobre el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas. Sin embargo, muestran modificadas las características morfológicas del ovario, sugerente a que la administración de rFSH pudiera alterar las características ováricas, más no la respuesta superovulatoria ovárica en cobayas.

Palabras clave: respuesta ovárica, cobayas, hormona folículo estimulante recombinante, superovulación

Abstract

The ovarian response of guinea pigs (*Cavia porcellus*) was evaluated by applying a superovulation protocol through a recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH). 18 multiparous females were selected from ages of 80 ± 15 days, weights from 800g and 1150 g, which had an alimentary adaption process of 15 days with concentrate. Before the superovulation, females were synchronized with progesterone (P4) (Altrenogest®, 0.22mg/kg) orally for 15 days. Before the end of the administration of P4 females were randomly divided into three groups: group 1 (A-rFSH) received a total dose of 30 IU of rFSH (Gonal-F®) twice a day before the withdrawal of P4; group 2 (D-rFSH) received the same dose after the withdrawal of P4; and group 3 (control) did not receive any dose. Administration of rFSH before and after the withdrawal of P4 did not change the number of structures collected in guinea pigs. Likewise, the administration of FSH after the withdrawal of P4 causes females to enter into heat season in a shorter time (D-rFSH $11,15 \pm 2,3$; A-rFSH $45,15 \pm 2,8$; C $44,5 \pm 4,1$, $p < 0,0001$). Like the administration of rFSH, it causes a lower ovarian volume (A-rFSH $39,8 \pm 10,2$; D-rFSH $29,6 \pm 8,1$ vs. C $75,8 \pm 44,5$, $p < 0,01$). In conclusion, superovulation with rFSH before and after the withdrawal P4 does not cause an effect on the ovarian response of guinea pigs and consequently on the number, type and quality of recovered structures. However, guinea pigs show modified ovarian morphology characteristics, suggesting that rFSH treatment may alter morphology characteristics, but not ovarian superovulation response in guinea pigs.

Keywords: ovarian response, guinea pigs, recombinant follicle-stimulating hormone, superovulation

Índice de contenido

1. Introducción.....	12
2. Objetivos	14
3. Revisión de literatura.....	15
3.1. Morfofisiología del aparato reproductor de la cobaya	15
3.1.1. Ovarios.....	15
3.1.2. Oviducto	15
3.1.3. Útero	15
3.1.4. Vagina y vulva	16
3.2. Pubertad.....	16
3.3. Ciclo estral.....	17
3.3.1. Proestro.....	17
3.3.2. Estro.....	17
3.3.3. Metaestro	18
3.3.4. Diestro.....	18
3.4. Funcionamiento endócrino	18
3.5. Ruptura de membrana vaginal	18
3.6. Fecundación.....	19
3.7. Protocolos de sincronización	19
3.8. Superovulación.....	20
3.9. Gonadotropinas recombinantes.....	20
4. Materiales y métodos	22
4.1. Materiales.....	22
4.2. Metodología.....	22
4.2.1. Área de estudio	22
4.2.2. Preparación de las unidades experimentales	23
4.2.3. Preparación de dosis de r-FSH	24
4.2.4. Revisión de apertura vaginal	25

UCUENCA

5

4.2.5.	Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras	26
4.2.6.	Evaluación del desarrollo y calidad de estructuras colectadas	26
4.2.7.	Volumen ovárico, número y diámetro de cuerpos lúteos y folículos	27
4.3.	Procesado y análisis estadístico.....	28
5.	Resultados	29
5.1.	Clasificación de estructuras recuperadas	29
5.2.	Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas	29
6.	Discusión.....	33
7.	Conclusiones	36

Índice de figuras

Figure 1. Oviductos, útero y cérvix de cobaya (<i>Cavia porcellus</i>)	15
Figure 2. Aparato reproductor de cobaya (<i>Cavia porcellus</i>).....	16
Figure 3. Vagina y vulva de cobaya (<i>Cavia porcellus</i>).....	16
Figure 4. Cronología del desarrollo embrionario	19
Figure 5. Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.....	23
Figure 6. Protocolo de sincronización y de estimulación ovárica con rFSH antes del retiro de P4 (Grupo 1, A-rFSH), después del retiro de P4 (Grupo 2, D-rFSH), y sin aplicación de rFSH (Grupo 3, Control).....	24
Figure 7. Monitoreo de la apertura de membrana vaginal (AMV) en cobayas.	25
Figure 8. Calidad del embrión según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés).	27
Figure 9. Esquematización de la medición del volumen ovárico.....	27
Figure 10. Esquematización de la medición del diámetro del cuerpo lúteo.....	28
Figure 11. Monitoreo de apertura de membrana vaginal (AMV) de cobayas desde el retiro de la fuente de progesterona (Altrenogest) hasta la manifestación de celo (panel A) y monitoreo de la apertura de membrana vaginal de cobayas desde el inicio de la aplicación del tratamiento con rFSH hasta la manifestación de celo (panel B)..	30
Figure 12. Volumen ovárico en mm ³ (VO) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con r-FSH.	31
Figure 13. Número total de cuerpos lúteos (CLs) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH (Panel A); Diámetro de cuerpos lúteos (DCLs) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH (Panel B); y Número total de folículos en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH (Panel C).....	31
Figure 14. Diámetro de folículos (DFOLs) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH..	32

Índice de tablas

Tabla 1. Duración de las fases del ciclo estral en cobayas.....	17
Tabla 2. Materiales usados en trabajo de campo.	22
Tabla 3. Clasificación de estructuras recuperadas.	29
Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de las cobayas.	29

Dedicatorias

A mis padres Luis y Paquita, este trabajo de titulación va dedicado a ustedes, al ser el pilar fundamental a lo largo de mi carrera, gracias por incentivar me al estudio desde muy temprana edad y por haberme enseñado todos los valores y la humildad. Que el universo les pague por todo el amor y el cariño, los amo.

Johanna y Carol, mis adoradas hermanas mayores, gracias por siempre creer en mi potencial siempre las tendré en mi corazón. A mis sobrinos Robinson, Jamileth y Josué por haberme tratado siempre como su hermano mayor y ejemplo a seguir, los adoro con mi vida.

A mis queridos abuelos Teresa, Elva y Luis, les agradezco por nunca dejar de tratarme como aquel niño que soñaba con ser grande algún día.

Al Doctor José Luis Pesantez, por ser una gran persona y excelente guía. Gracias por brindarme su apoyo, por su paciencia y sabiduría durante este trabajo.

A mis más grandes amigos de infancia sin excluir a nadie Joaquín, Jorge, José Luis, Daniel y María José. A Lyan quien fue mi "roomate" y más grande ayuda por muchos años. A grandes personas y colegas, Liz y Kevin que me enseñaron a nunca desistir y siempre seguir adelante a pesar de las adversidades, les agradezco por todas las experiencias vividas y por vivir.

Y finalmente a Camila, mi compañera de vida, parte fundamental que de una u otra manera me apoyó para culminar mi carrera universitaria.

Con mucho cariño para ustedes.

Cristhian Cuenca Espinoza.

Este trabajo de tesis, dedico con todo mi corazón a las personas que han sido pilar fundamental a lo largo de mi carrera universitaria. A mis padres, Jaime y Carmita, por su amor, trabajo y sacrificio, quienes me apoyaron incondicionalmente en todos estos años y me enseñaron a afrontar las dificultades presentadas y tener buena actitud.

A mis hermanos y cuñados, quienes siempre con sus palabras de ánimo me ayudaron a avanzar satisfactoriamente en este proceso.

También a mi pareja, Elizabeth, por ser la persona que estuvo apoyándome en cada decisión que tomara, por su paciencia y entrega hacia mi persona, y por siempre motivarme a avanzar con pasos firmes.

Mateo Ñauta Díaz.

Agradecimientos

Como no agradecer a las personas que contribuyeron ampliamente al desarrollo de este presente trabajo. En primer lugar, a Mateo por ser mi compañero, por su buen empeño en el presente trabajo y por brindarme su amistad por muchos años.

Al Dr. José Luis Pesantez por su paciencia y por siempre compartir sus experiencias y conocimientos. Al Dr. Xavier Samaniego y técnicos del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción de la Universidad de Cuenca, sin su apoyo este trabajo práctico no habría dado a la luz. Estoy totalmente agradecido.

Cristhian Erick Cuenca Espinoza

Primero agradecer a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el desarrollo de mi carrera.

A nuestro tutor, Dr. José Luis Pesantez. Sin sus virtudes, paciencia y constancia en este trabajo no hubiésemos logrado tan fácil la culminación del mismo.

A mis padres, por haber sido el motor que impulsan todos mis logros y por ser siempre esa guía de vida indispensable. Gracias por siempre creer en mí.

A mi compañero de tesis Cristhian, por llegar a ser ese compañero de aventura y empeño en el transcurso de la carrera universitaria, por siempre haber tenido la perseverancia de hacer las cosas bien.

A todos mis familiares y amigos más cercanos, por nunca haber dejado que mi persona se rinda ante cualquier dificultad.

Finalmente agradecer a Elizabeth, por haberme siempre motivado a estar firme en todo el desarrollo de la carrera y por ser siempre un pilar fundamental en mi vida.

Mateo Ñauta Díaz.

Abreviaturas utilizadas

rFSH= Hormona folículo estimulante recombinante

P4= Progesterona

GnRH= Hormona liberadora de gonadotropina

CL= Cuerpo lúteo

AMV= Apertura de membrana vaginal

Introducción

La domesticación de roedores como el cobayo (*Cavia porcellus*) juega un rol importante en la alimentación de la población indígena de la Cordillera de los Andes, por cuanto su carne es la principal fuente de proteína para estas personas. Sin embargo, las condiciones de crianza de esta especie se encuentran aún en sistemas de producción artesanal o familiar y solamente unas pocas explotaciones aplican un modelo de crianza tecnificado (Ramos, 2017).

El cobayo es un animal que se explota para su crianza y consumo, pero también es un animal que se utiliza de manera habitual desde el siglo 18 en el campo de la investigación como un animal de laboratorio (Taylor & Lee, 2012). Es utilizado para estudios reproductivos en humanos (Edwards et al., 2005), ya que es el único de los roedores de laboratorio que posee un ciclo estral dividido en estro, metaestro, diestro y proestro, asemejándose a las características del ciclo reproductivo de humanos y animales domésticos (Araníbar & Echevarría, 2014; Chang et al., 2021). El uso de otros roedores como la rata y ratón son muy buenos modelos en los campos de biomedicina por su ciclo generacional corto, son prolíficos y su adaptación a las condiciones de laboratorio son buenas, sin embargo, su utilización se basa primordialmente en el tipo de investigación que se pretende realizar, por cuanto al ser una especie utilizada de manera prioritaria en laboratorios no implica que sea un modelo para todas las investigaciones (Edwards et al., 2005).

Por las características mencionadas, las investigaciones que se han realizado hasta ahora en cobayas se han enfocado en mejorar los diferentes métodos de control de ciclo estral (Grégoire et al., 2012) por medio de la administración de hormonas exógenas como progestágenos y/o prostaglandinas (Salcedo, 2016). El uso de progestágenos en cobayos logró tener una tasa de sincronización de celo de hasta un 95% (Grégoire et al., 2012). Los resultados obtenidos hasta ahora con prostaglandinas en cobayos no son los deseables, dado que esta hormona usada por sí sola no ha producido resultados satisfactorios en el control del ciclo estral (Obregón, 2009).

Otras investigaciones reproductivas en cobayas son la respuesta ovárica a los tratamientos de superovulación (Suzuki et al., 2003), esto como objetivo de obtener un mayor número de ovocitos o embriones dependiendo el caso, para utilizarlos en estudios futuros o para desarrollar técnicas de reproducción asistida en esta especie. Los tratamientos para promover el aumento del número fisiológico de ovulaciones en roedores (ratones, ratas y cobayos), se basa en la administración exógena de hormonas gonadotrópicas (Grégoire et al., 2012) y el uso de inmunoneutralizantes como las vacunas contra inhibina (Shi et al., 2000).

Las gonadotropinas son constituidas por dos subunidades (cadena α y cadena β) (Pierce & Parsons, 1981). La cadena A es específica de especie y tiene una secuencia de aminoácidos idénticas para todas las hormonas. Por el contrario, la subunidad B es única de cada hormona y determina la especificidad biológica de la molécula. A todo esto, las subunidades β de diferentes especies comparten una homología en la secuencia de aminoácidos lo que sugiere que los preparados con subunidad β reducirían el riesgo de obtener efectos secundarios indistintamente de la especie (Baenziger & Green, 1988; Pierce & Parsons, 1981).

Al administrar la FSH exógena se incrementa la concentración endógena de ésta, lo que favorece el crecimiento folicular, la diferenciación, la maduración y la ovulación, siendo necesario al final de este tratamiento con FSH la administración de una dosis de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de gonadotropina coriónica humana (hCG) para que provoque la ovulación (Edwards et al., 2005).

En años recientes, se da la introducción de gonadotropinas recombinantes obtenidas por ingeniería genética, con un grado de pureza absoluto y una bioactividad potencialmente ilimitada que no disponen los preparados actuales como la pFSH (Balasch, 2020; Howles, 1996)

La folitropina alfa (Gonal-F) es uno de los preparados de FSH recombinante estructuralmente idéntica a la FSH endógena teniendo potenciales ventajas que han permitido mejorar los conocimientos sobre el control gonadotrófico del ciclo estral y evitar los efectos secundarios asociados a la existencia de proteínas contaminantes en los productos comerciales actuales (Goa & Wagstaff, 1998; Howles, 1996).

De las características mencionadas anteriormente se deduce que, si bien ambos preparados gonadotróficos son clínicamente útiles, la hormona folículo estimulante recombinante (rFSH) tiene una mayor biopotencia en comparación con la p-FSH, por lo cual la duración tratamiento es menor. Además, su pureza le confiere la capacidad de evitar posibles efectos secundarios que interferirían la acción de la FSH. Sin embargo, existen pocos estudios en los que se haya utilizado la rFSH en cobayas (Edwards et al., 2005; Tapanainen et al., 1993) siendo necesario profundizar en su efecto sobre la estimulación folicular ovárica y el desarrollo embrionario en estos animales en especial en roedores.

1. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de un protocolo de superovulación basado en la aplicación de la hormona folículo estimulante-recombinante (rFSH) sobre la respuesta ovárica de cobayas.

Objetivos específicos

- Valorar el efecto de la rFSH sobre la respuesta ovárica de cobayas sincronizadas.
- Valorar el efecto superovulatorio de la rFSH sobre el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas.

2. Revisión de literatura

2.1. Morfofisiología del aparato reproductor de la cobaya

2.1.1. Ovarios

Son órganos de color blanco amarillento y de forma ovalada. Se encuentran localizados en la cavidad abdominal, craneal a los cuernos uterinos y recubiertos por una membrana serosa (bolsa ovárica). Su diámetro es de 3-6 mm de largo x 2-4mm ancho x 2-3 mm de profundidad (Hargaden & Singer, 2012). Su irrigación proviene de la arteria ovárica y uterina (Buñay & Zhinin, 2022). Tiene una superficie lisa exceptuando las áreas con folículos maduros que se proyectan para la ovulación (Grégoire et al., 2012). Los ovarios tienen una función muy dinámica que se inicia en la pubertad y continúa durante toda la vida reproductiva. Como función principal está el producir ovocitos y secretar hormonas como estrógenos y progesterona (Pino, 2015).

2.1.2. Oviducto

Los oviductos se ubican lateralmente a la bolsa ovárica (Figura 1) y miden 57 mm de largo x 1,5 mm de diámetro (Buñay & Zhinin, 2022). Este se divide en tres partes: infundíbulo, ampulla e istmo. Estas estructuras cumplen la función de transportar ovocitos hacia la intersección entre el ampulla e istmo donde se llevará a cabo la fertilización y desarrollo temprano del embrión (Aucapiña & Marín, 2016).

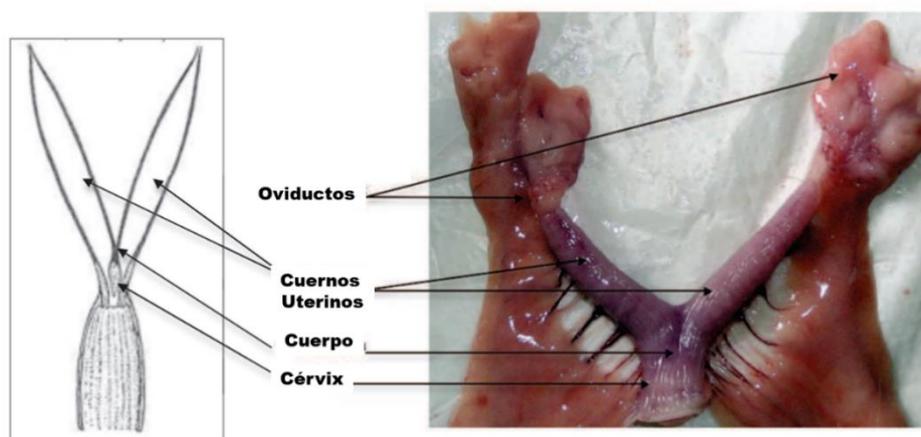


Figure 1. Oviductos, útero y cérvix de cobaya (*Cavia porcellus*). Adaptado de Grégoire, (2012)

2.1.3. Útero

El útero es un órgano bicornes en forma de “Y”, tiene un cuerpo corto y aplanado dorso-ventralmente. Los cuernos uterinos miden 30-50mm de largo x 3mm de ancho y disminuye su diámetro en dirección cráneo-caudal (Hargaden & Singer, 2012). Su lado dorsal se encuentra en contacto con el recto y el lado ventral con los intestinos (Figura 2). Su principal función es recibir al embrión para su implantación y nutrición (Cañón-Beltrán et al., 2015).

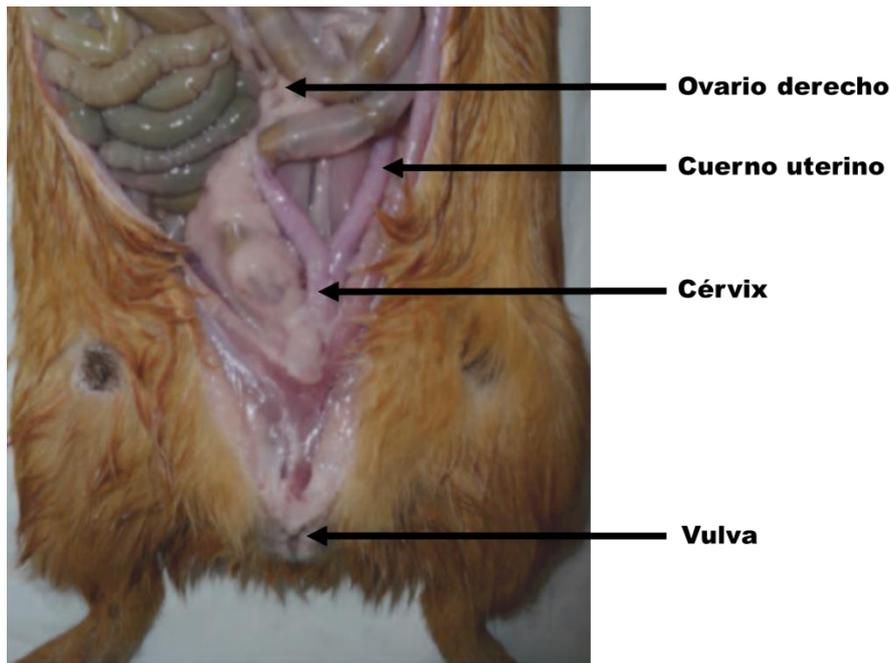


Figure 2. Aparato reproductor de cobaya (*Cavia porcellus*). Adaptado de Grégoire, (2012)

2.1.4. Vagina y vulva

Es un órgano constituido por músculo fibroelástico y mide aproximadamente entre 30-40 mm de largo. Se ubica en la cavidad pelviana relacionándose dorsalmente con el recto y ventralmente con la vejiga (Hargaden & Singer, 2012). A diferencia de otros roedores, las cobayas poseen una membrana epitelial que cubre el orificio de la vagina, exceptuándose en la fase de estro y el parto (Grégoire, 2012). La vulva tiene una abertura en forma de “Y” (Figura 3) y posee un diámetro pequeño en relación con el cuello uterino que llega a medir hasta 25 mm (Solís & Chávez, 2015).

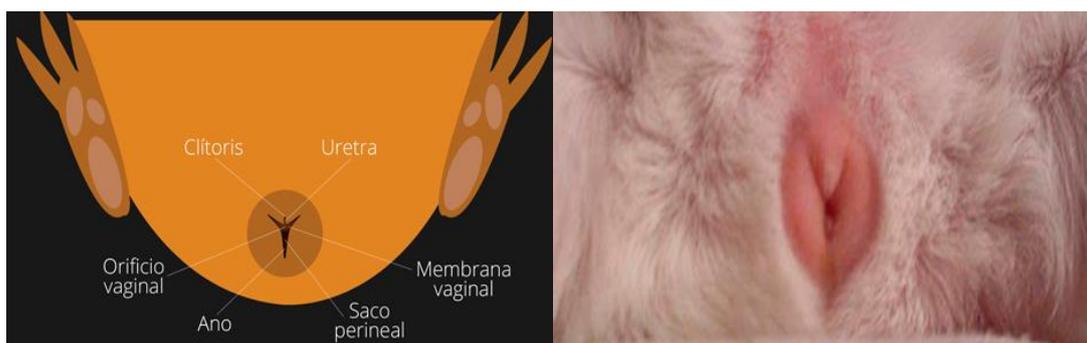


Figure 3. Vagina y vulva de cobaya (*Cavia porcellus*). Adaptado de Grégoire, (2012)

2.2. Pubertad

Las crías de cobaya frecuentemente son destetados a los 15-18 días de nacimiento con un peso promedio de 200 a 300 gramos (Pino, 2015). Luego del destete, las cobayas se vuelven muy precoces y pueden alcanzar su pubertad a los 28 o 30 días de edad, pero no se aconseja

a tener hembras y machos juntos a edades muy tempranas ya que puede ser preñada por su propio padre (Aliaga, 1990). Si bien es cierto que las hembras alcanzan su madurez sexual a los 28 a 30 días, esto no quiere decir que sea óptima para ser cubiertas por el macho y aptas para ser madres. Teniendo como producto crías completamente pequeñas y raquílicas, susceptible a enfermedades (Aliaga, 1990).

2.3. Ciclo estral

Las cobayas son Poliéstricas continuas y ovulación espontánea. La hembra es sexualmente madura a los tres meses de edad (Grégoire, 2012) y tienen un promedio de duración del su ciclo estral de 16 ± 3 días, teniendo un promedio de ovulación de 3,14 folículos por ciclo (Araníbar & Echevarría, 2014). La duración de cada fase del ciclo estral se detalla en la Tabla 1.

Las hembras pueden aparearse con un peso aproximado de 800 gramos, tomando en cuenta que su peso influye en un mejor tamaño de la camada y peso de las crías al nacimiento y destete (Aliaga, 1990).

Tabla 1. Duración de las fases del ciclo estral en cobayas.

FASE	DURACIÓN
PROESTRO	14 horas
ESTRO	8-9 horas
METAESTRO	18-24 horas
DIESTRO	13-16 días

Adaptado de Araníbar & Echevarría, (2014)

2.3.1. Proestro

Esta etapa dura alrededor de 14 horas y se presentan cambios externos como aumento considerable del tamaño y flujo sanguíneo de los genitales externos, además de secreciones serosas (Araníbar & Echevarría, 2014).

2.3.2. Estro

El estro, también denominado calor o celo, dura alrededor de 8 a 11 horas y ocurre frecuentemente en la noche. La cobaya empieza presentando inquietud, estiramiento de la espalda, elevación de la pelvis, mucosidad vaginal y acepta la monta del macho. Esta etapa también se observa a las 2-3 horas post-parto (Obregón, 2009). (Araníbar & Echevarría, 2014). La ovulación es de forma espontánea y ocurre 10 horas después de haberse iniciado el celo (Hargaden & Singer, 2012); estos óvulos tienen aproximadamente 15 horas de vida. De 3 a 4 horas después del parto se produce un celo con ovulación, la cual la hace fértil existiendo en consecuencia madres lactantes y gestantes a la vez (Obregón, 2009).

2.3.3. Metaestro

En esta etapa existen un rechazo total de la hembra hacia el macho, dura de 18 a 24 horas.

2.3.4. Diestro

En este periodo el cuerpo lúteo aumenta de tamaño y el útero ya es apto para permitir la gestación y desarrollo del embrión. A diferencia de las etapas anteriores, el diestro dura aproximadamente de 13 a 16 días (Ruiz et al., 1998).

2.4. Funcionamiento endócrino

Además de la producción de ovocitos, el ovario tiene importante función de secretar hormonas sexuales femeninas, como estrógenos y progesterona (Pino, 2015). Durante el estro, se produce principalmente los estrógenos por las células de la granulosa. Asimismo, convierten los andrógenos secretados por las células de la teca interna en estrógenos. Estas inducen el crecimiento y desarrollo del aparato reproductor femenino y mostrar el comportamiento de celo (Grégoire et al., 2012).

Los principales órganos productores de progesterona son: las células lúteas y también la placenta (Balgobin et al., 2013). Esta estimula el desarrollo de glándulas uterinas, lo que ocasiona que el endometrio se acondicione para ser receptivo a la implantación del embrión (Grégoire et al., 2012).

El crecimiento y maduración de los folículos están controladas por hormonas gonadotróficas pituitarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). El nivel máximo de FSH ocurre un día antes de presentar el celo. Consecuente a la secreción ovárica de estrógenos, se dispara una liberación de un pico ovulatorio de LH, nivel máximo de LH, induciendo así la ovulación (Grégoire et al., 2012). La LH, a su vez, inicia la formación del cuerpo lúteo al interactuar con receptores de la pared folicular ya rota, iniciando así la luteinización y secreción de progesterona. Si existe gestación, el cuerpo lúteo persiste. Si no, la regresión del cuerpo lúteo se da por el principal factor luteolítico, la prostaglandina F_{2a} (Pino, 2015).

2.5. Ruptura de membrana vaginal

El monitoreo de los cambios en la membrana vaginal es una simple pero valiosa forma de diagnosticar ciertos periodos del ciclo estral, descrito por primera vez en la investigación de Stockard & Papanicolau., (1919). Durante la actividad estral, el orificio vaginal externo se encuentra más o menos abierta en la que se puede observar un poco de líquido o sangre. Esto es debido a que la vulva se inflama muy levemente antes del estro y la membrana estirada se rompe. Por lo tanto, al romperse la membrana es el momento en que la hembra está en celo y lista para copular. El cierre de la membrana no solo se da en la cobaya joven,

sino que se irá destruyendo regularmente y se reforma después de cada periodo de celo durante toda la vida de la hembra (Wilson et al., 2021).

2.6. Fecundación

Después de la ovulación, los ovocitos viajan al ámpula en 3-4 horas y luego permanecen ahí alrededor de 30 horas. El momento exacto de fecundación no ha sido determinado con precisión, pero se estima que tiene lugar entre 1 y 2 horas de llegar al ámpula (Grégoire, 2012). Una vez fecundado, los embriones viajan a través del oviducto y entran al útero aproximadamente 72 horas post fecundación en una etapa de desarrollo de 8 a 12 células (Chavatte-Palmer & Guillomot, 2007). La implantación tiene lugar el día 6 después de la ovulación (Chavatte-Palmer & Guillomot, 2007; Grégoire, 2012) (Figura 4).

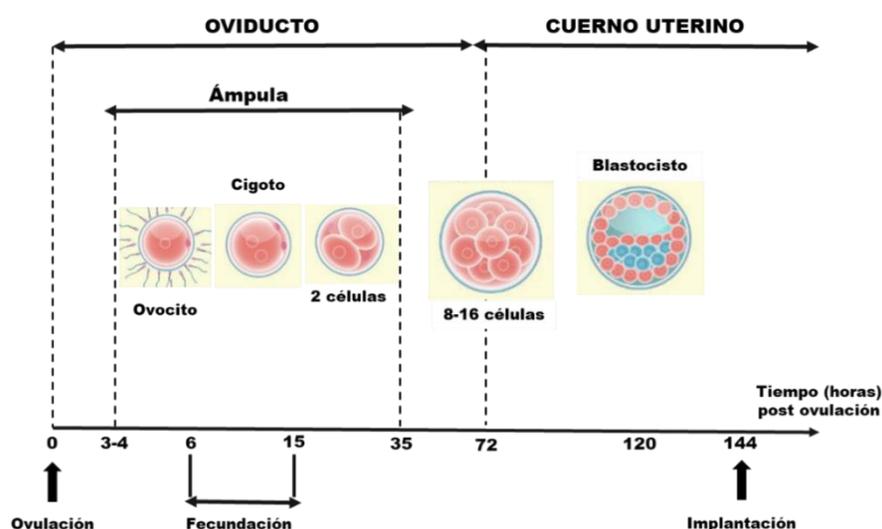


Figure 4. Cronología del desarrollo embrionario. Adaptado de Grégoire, (2012)

2.7. Protocolos de sincronización

Los principales tratamientos para el control del ciclo estral en cobayas, se basan en la utilización de hormonas exógenas como progestágenos y/o prostaglandinas (Salcedo, 2016). La progesterona endógena se inactiva por su avanzado metabolismo (Orizaba-Chávez et al., 2013), por lo que se opta por mecanismos externos para la sincronización. La progesterona exógena nos ayuda a mantener niveles altos de la misma en el organismo de las cobayas, bloqueando así las ovulaciones consecutivas con las regresiones de cuerpos lúteos, con la finalidad de que se inicie un nuevo ciclo al retiro de la progesterona (Grégoire et al., 2010) Es por esto que el uso de progestágenos en cobayos logra tener una tasa de sincronización del celo de hasta un 95% (Grégoire et al., 2012). Las cobayas al presentar un ciclo estral de 16 ± 3 días (Aranibar & Echevarría, 2014) se sugiere realizar estos protocolos por 15 días (Grégoire et al., 2010).

Por otra parte, los resultados obtenidos hasta ahora con prostaglandinas en cobayas no han sido satisfactorios, dado que, esta hormona usada por sí sola no responde adecuadamente para controlar el ciclo estral (Obregón, 2009).

2.8. Superovulación

Para llegar a producir embriones de cobaya se necesita poder controlar el ciclo estral. En primera instancia, se debe sincronizar el celo para así obtener embriones en etapa de mórula o de blastocito temprano para finalmente, sincronizar la transferencia de embriones (Grégoire et al., 2012).

Diversos estudios se han realizado describiendo el desarrollo folicular durante el ciclo estral de las cobayas. Cuando se requiere de un mayor número de embriones, se usan gonadotropinas antes de la cópula para incrementar el número de ovocitos ovulados, induciendo la superovulación (Portelli, 2013).

Aunque se ha intentado inducir la superovulación utilizando FSH o EcG, no se ha obtenido resultados consistentes. Esto indica que es muy difícil inducir de forma exitosa la superovulación en cobayas. Uno de los estudios que tuvo éxito fue de Garza et al, (1984) en el que aplicaba hormona luteinizante (LH) induciendo la superovulación al prevenir la atresia de los folículos en desarrollo. Así mismo, Shi et al (2000) realizó una investigación donde usó antisuero en contra de la inhibina, que al parecer induce múltiples ovulaciones al producir un aumento de la concentración en el plasma de FSH. Indicando así que la inhibina ya no produce su efecto de retroalimentación negativa en la regulación de la FSH. También se ha probado que la hCG, la cual se usa mucho en ratones y otros animales, no tienen una función eficiente en cobayas (Donovan & Lockhart, 1972).

La hormona folículo estimulante (FSH) recombinante fue introducida al mercado en los años 90s y es usada junto con hCG en clínicas de fertilidad humana, pero su uso en animales ha sido muy limitado. Edwards et al., (2005), en su estudio con FSH recombinante en ratones, demostró que la respuesta ovárica máxima y la producción de un mayor número de embriones resultó de la estimulación con dosis de 10 y 20 UI.

2.9. Gonadotropinas recombinantes

A partir del año 2000, ocurrió la introducción de las denominadas gonadotropinas recombinantes que se obtienen por ingeniería genética mediante la integración estable del gen que codifica la hormona en el genoma de la célula huésped, en este caso los mamíferos (Balasch, 2020).

Las gonadotropinas endógenas son constituidas por dos subunidades (cadena α y cadena β) (Pierce & Parsons, 1981). La cadena α es la que especifica la especie y tiene una secuencia de aminoácidos idénticas para todas las hormonas. Por el contrario, la subunidad β es única de cada hormona y determina la especificidad biológica de la molécula. A todo esto, las

subunidades β de diferentes especies comparten una homología en la secuencia de aminoácidos lo que sugiere que los preparados con subunidad β reducirían el riesgo de obtener efectos secundarios indistintamente de la especie (Baenziger & Green, 1988; Pierce & Parsons, 1981).

La folitropina alfa (Gonal-F) es un preparado de FSH recombinante estructuralmente idéntica a la FSH endógena teniendo potenciales ventajas que han permitido mejorar los conocimientos sobre el control gonadotrófico del ciclo estral y evitar los efectos secundarios asociados a la existencia de proteínas contaminantes en los productos actuales en comercialización (Goa & Wagstaff, 1998; Howles, 1996). La nomenclatura de este producto no tiene nada que ver con las subunidades antes mencionadas y solo se refiere al orden cronológico en el que fue comercializado.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Tabla 2. Materiales usados en trabajo de campo.

Materiales físicos	Materiales biológicos
<ul style="list-style-type: none"> · Jeringas de 1, 5, 20 y 60 ml · Guantes de nitrilo · Torundas · Caja de Bisturí 22G · Equipo de disección · Catéteres de 16G · Agujas hipodérmicas 24G · Tubos Eppendorf · Toalla desechable · Recipientes ámbar estéril 30ml · Hielera · Gel refrigerante 	<ul style="list-style-type: none"> · Cobayos hembras y machos · Embriones · Útero · Ovarios
Materiales químicos	Materiales de laboratorio
<ul style="list-style-type: none"> · FSH recombinante · Progesterona · GnRH · Solución jabonosa de yodo · Solución salina taponada de fosfato · Lactato de Ringer · Solución Estéril para inyección 	<ul style="list-style-type: none"> · Estereomicroscopio · Cajas Petri de inspección cuadrículada · Cajas Petri de exploración · Platina de calefacción · Gradilla de laboratorio

3.2. Metodología

3.2.1. Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la granja Irquis y en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Cuenca, localizado en el km 23 de la vía Cuenca-Girón, a la altura de la Parroquia Victoria del Portete (latitud -3.080534 y longitud -79.075352; Figura 5), a una altitud de 2663 m s.n.m. La precipitación media anual es de 789 mm, y la temperatura oscila entre 10 y 15 °C.

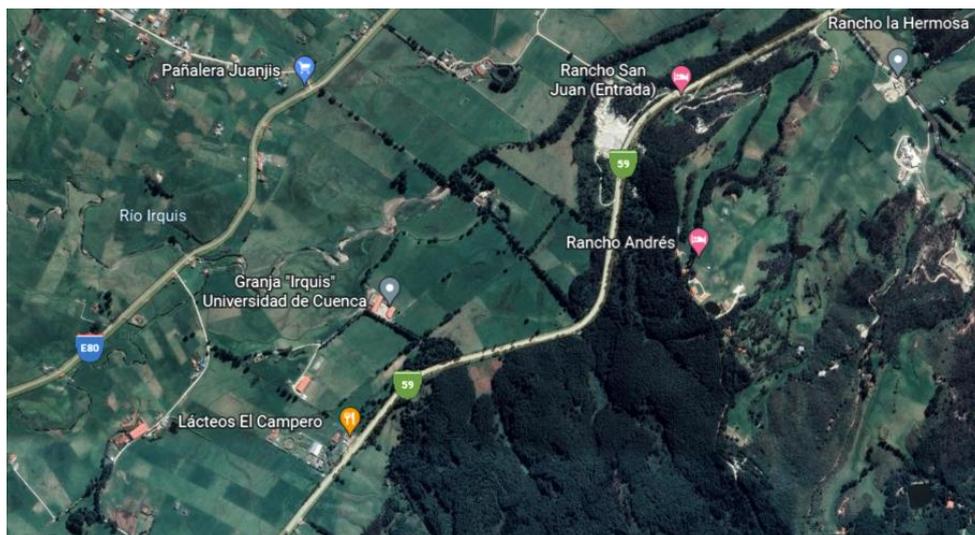


Figure 5. Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de Google Earth (2022)

3.2.2. Preparación de las unidades experimentales

Para el estudio se seleccionaron 21 cobayas múltiparas con una edad media de 80 ± 15 días y un peso entre de 800 y 1150 gramos, provenientes de un núcleo de cobayos de diferentes cruces de líneas genéticas Perú, Inti y Andina. De las 21 hembras solo sobrevivieron 18 que fueron distribuidas en tres tratamientos.

A estos animales se los adaptó por quince días con un concentrado pelletizado a base de forraje. En este periodo se alojaron en una jaula de 2x3 m (Anexo A). Luego, las hembras fueron distribuidas aleatoriamente en una jaula dividida en tres secciones para cada grupo experimental, que permitió albergar 3 animales en cada una (Anexo B). Todas las hembras fueron sometidas a un protocolo de sincronización de celo con un progestágeno, Altrenogest [0,22mg/kg; Regumate®, MSD, España), vía oral durante 15 días (Anexo C). Se consideró día 0 como el día de finalización de la sincronización, es decir, el día que se retiró la progesterona.

Las cobayas fueron aleatoriamente asignadas a tres grupos de animales (Figura 6): **Grupo 1** (n=7): recibió una dosis total de 30 UI rFSH (Gonal-F®, Merck, Alemania, Anexo D) dos veces al día, los días -2, -1 y 0 del retiro del progestágeno. **Grupo 2** (n=7): recibió la misma dosis de rFSH, los días 0, +1 y +2 del retiro del progestágeno. El **Grupo 3** (n=4) no recibió ninguna dosis de rFSH, y se consideró el grupo control.

Asimismo, 12 horas después de la última dosis de rFSH las hembras de los Grupo 1 y 2 recibieron una dosis de 30 UI de hormona liberadora de gonadotropinas (Gonadorelina, Fertagyl MSD Salud Animal, S.A. de C.V, México), para estimular la ovulación de todos los folículos.

El día del retiro del progestágeno se introdujo un cobayo macho en cada jaula experimental para que montara a las hembras, además se revisaron diariamente para detectar la apertura de la membrana vaginal, y que fue referencia del día de inicio del celo. A las 96 ± 24 horas después del apareamiento, se recolectaron las estructuras a través del lavado de oviductos y útero, para luego ser clasificadas. Se valoraron los diámetros de cada ovario para determinar el volumen ovárico (VO) y también se valoró el número de cuerpos lúteos y de folículos presentes en cada ovario, así como el diámetro de los cuerpos lúteos y folículos.

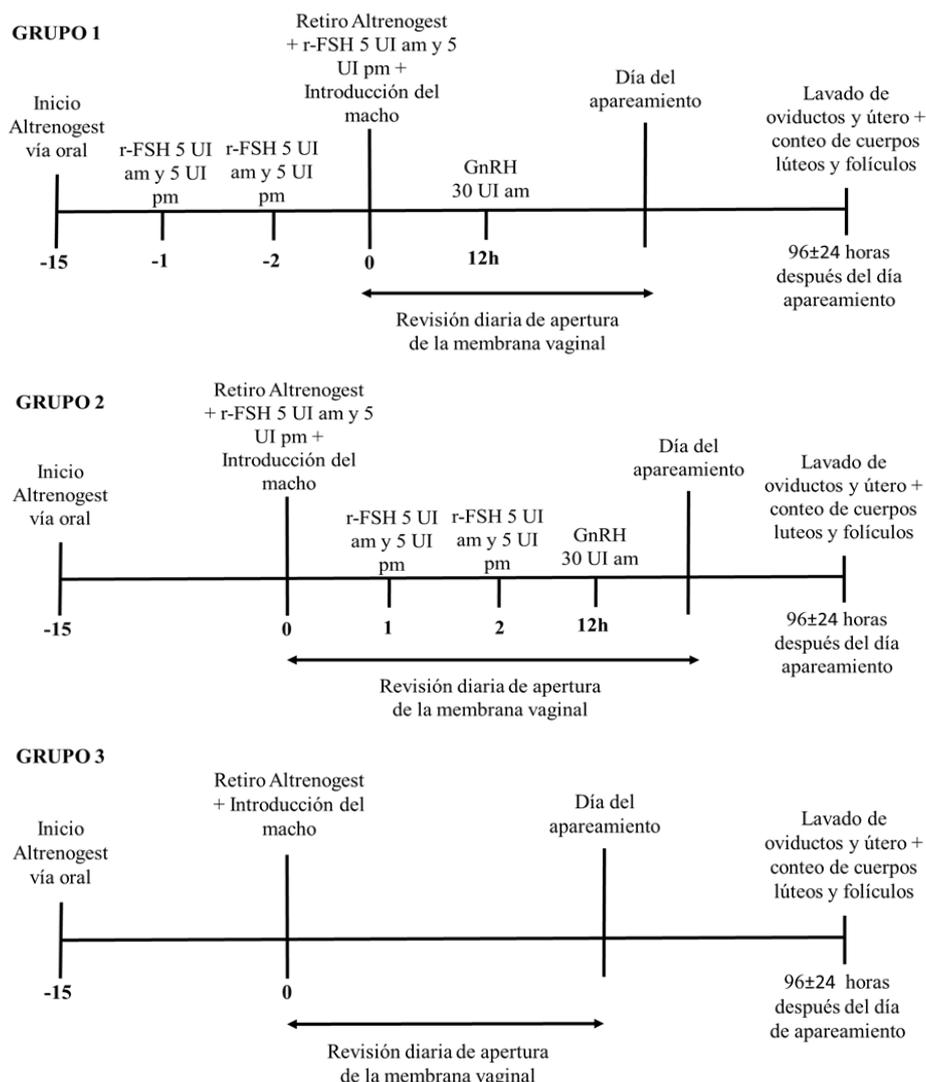


Figure 6. Protocolo de sincronización y de estimulación ovárica con rFSH antes del retiro de P4 (Grupo 1, A-rFSH), después del retiro de P4 (Grupo 2, D-rFSH), y sin aplicación de rFSH (Grupo 3, Control).

3.2.3. Preparación de dosis de r-FSH

Las dosis de r-FSH se prepararon con dos inyecciones dosificadoras de folitropina alfa (Gonal-F®, Merck, Alemania). La folitropina alfa es un preparado estructuralmente idéntico a

la FSH endógena. La presentación utilizada fue de 300 UI/0,5ml (22 µg/ml) prellenadas en un cartucho inyector. Dado que la presentación es de 0,5 ml esta se tuvo que diluir para su posterior uso.

Procedimiento para preparación de viales:

- Se colocó 1 ml de Gonal-F® a un recipiente ámbar estéril de 60 ml.
- Se colocó 59 ml de solución estéril en el mismo recipiente ámbar para completar los 60ml del preparado y se mantuvo en refrigeración hasta distribuir en cada vial de 1 ml que contenía 10UI
- A cada cobaya se dosificó 30UI.

3.2.4. Revisión de apertura vaginal

Para el monitoreo diario de los cambios en la membrana vaginal se siguió la metodología descrita por Wilson et al., (2021). Brevemente consistió en sujetar a la hembra de forma segura usando el pulgar y el dedo índice para manipular suavemente la abertura vaginal; luego se observó si la membrana estaba “cerrada” o “abierta” (Anexo E y F; Figura 7). Este procedimiento se realizó diariamente en la mañana (9:00am) y tarde (16:00 pm), hasta observar la membrana vaginal perforada. Al visualizar la apertura de la membrana vaginal se registró la fecha y la hora en la que se observó por primera vez esta estructura perforada.

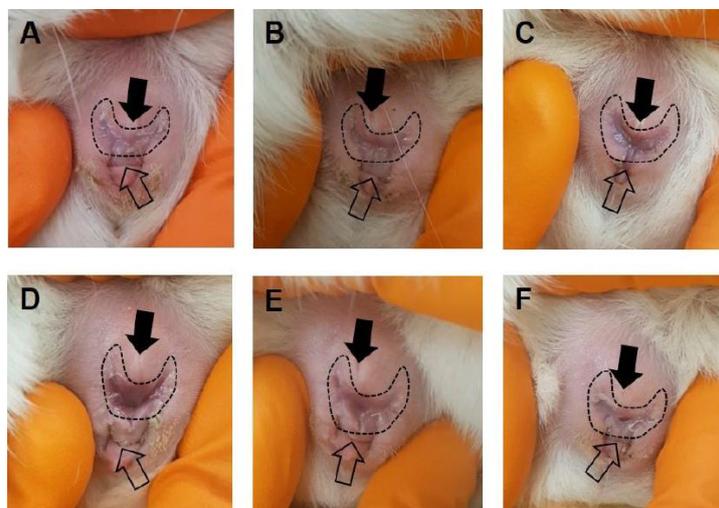


Figure 7. Monitoreo de la apertura de membrana vaginal (AMV) en cobayas. Durante el periodo latente del ciclo estral la membrana se ve cerrada (A, B). De cuatro a cinco días antes de ovular, la membrana cambia de color y se empieza a perforar (C). Cuando se da la ovulación, la membrana se perfora y aumenta la secreción vaginal de moco (D). Luego de la ovulación, la membrana se empieza a cerrar (E, F). Tomado de Wilson et al., (2021)

3.2.5. Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras

Todas las hembras se sacrificaron por inyección intraperitoneal (Flecknell, 1990) de pentobarbital sódico a una dosis duplicada según la concentración del fármaco (40mg/kg; Euthanex®, INVET, Colombia) luego de 96 horas de la comprobarse la apertura de la membrana vaginal.

Para el lavado del tracto reproductor de la hembra se siguió la metodología descrita por Suzuki et al., (2000), que brevemente consistió en rasurar la zona del abdomen y desinfectarla con una solución jabonosa de yodo. Posteriormente, cada cobaya se colocó en decúbito dorsal y se realizó una incisión de 4 cm a lo largo de la línea alba. Luego se localizó el tracto reproductivo, y se extrajo el útero y los ovarios (Anexo G), que se colocaron en una solución salina buffer de fosfato (PBS) a 37 °C hasta llevar al laboratorio.

Para el lavado de los oviductos y útero se utilizó la misma solución buffer fosfato. Las estructuras se recolectaron mediante un flushing de los oviductos y cuernos uterinos. Este procedimiento consistió en localizar la zona del infundíbulo, abrirlo e introducir una aguja hipodérmica de 30G (0,30mm de diámetro) fijar la aguja y adaptarla a una jeringa para lavar por tres ocasiones (Anexo H y I). Este mismo procedimiento se realizó a los cuernos uterinos.

3.2.6. Evaluación del desarrollo y calidad de estructuras colectadas

La valoración y clasificación morfológica de las estructuras se realizó siguiendo la metodología descrita por Suzuki et al., (2000) que brevemente consiste en evaluar las estructuras bajo la luz de un estereomicroscopio con un aumento de 50 a 100x (Anexo J). Primero se clasificó las estructuras en ovocitos sin fecundar y embriones.

Luego, se evaluó el estadio de desarrollo y la calidad del embrión en relación con el momento estimado de ovulación siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés) (Stringfellow et al., 1998) (Figura 8), adaptándolo a nuestro estudio según las indicaciones de Suzuki et al., (2000) y Suzuki et al., (1993) de estructuras aptas y no aptas.



Figure 8. Calidad del embrión según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés). Tomado de Stringfellow et al., (1998)

3.2.7. Volumen ovárico, número y diámetro de cuerpos lúteos y folículos

Asimismo, al término del lavado se cuantificó el número de cuerpos lúteos y de folículos en los ovarios para conocer la respuesta al tratamiento superovulatorio (Anexo K y L). También, se valoró el diámetro de cada ovario para determinar el volumen ovárico y también el diámetro de cada cuerpo lúteo y folículo. Los ovarios recolectados fueron colocados sobre un papel milimetrado y medidos bajo el lente de dos estereomicroscopios (Smz745, Nikon, Japón; Sz61, Olympus, Japón) (Anexo M). Para mayor precisión se tomaron fotografías de los ovarios para ser medidos en un software (ImageJ, Java; Anexo N).

Para hallar el diámetro ovárico, cada ovario fue medido en tres planos (largo, ancho y profundidad) (Carpio, 2014) como se puede observar en la Figura 9. El volumen ovárico se calculó mediante la fórmula de volumen esférico descrito por Penitente-Filho et al., (2015) en su estudio con bovinos, y expresado en mm^3 .

$$\text{Volumen ovárico (mm}^3\text{)} = 0,5 \times D_1 \times D_2 \times D_3$$

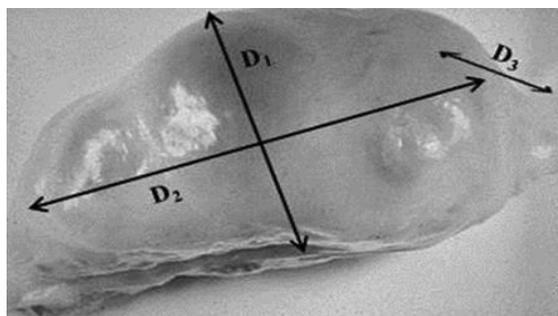


Figure 9. Esquematización de la medición del volumen ovárico. Tomado de Penitente-Filho et al., (2015)

Asimismo, los diámetros del cuerpo lúteo y folículos fueron medidos, pero con dos planos (largo x ancho, Figura 10). Se obtuvo mediante la media aritmética de ambas medidas (D1 y D2) y expresado en mm (Penitente-Filho et al., 2015).

$$\text{Diámetro (mm)} = (D1+D2) / 2$$

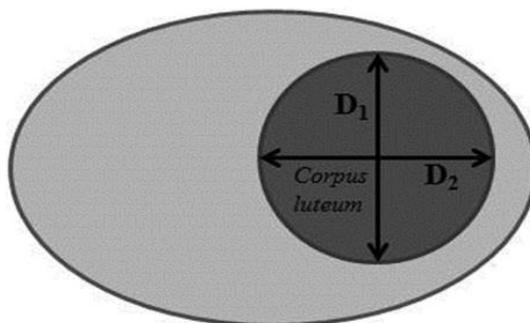


Figure 10. Esquematización de la medición del diámetro del cuerpo lúteo. Adaptado de Penitente-Filho et al., (2015)

3.3. Procesado y análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente se analizaron mediante el paquete estadístico STATISTICAS® 12.0 (Starsolf., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de los datos numéricos de todas las variables. Los efectos de la administración de la hormona folículo estimulante sobre la respuesta (número de cuerpos lúteos, folículos y estructuras recolectadas) y características morfométricas ováricas (diámetro de cuerpos lúteos, folículos y volumen ovárico) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para determinar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba post hoc de Sheffé. Los datos presentados en las figuras se expresaron como valores medios \pm error estándar de la media y los datos presentados en tablas se expresaron como valores medios \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Clasificación de estructuras recuperadas

Posterior al lavado del útero y oviductos, se realizó la valoración y clasificación morfológica de las estructuras recuperadas (Tabla 3). Se obtuvieron 6 estructuras de las 18 cobayas que se usaron en el estudio. De estas estructuras se obtuvieron 4 folículos no fecundados y 2 embriones. En el grupo D-rFSH no se recolectó ningún embrión. Finalmente, solo un embrión fue considerado como apto.

Tabla 3. Clasificación de estructuras recuperadas.

	n	TEST	UFO	EMBRIONES		CEST	
				MOR	BLAST	A	NA
A-rFSH	7	2	1	1		1	1
D-rFSH	7	2	2				2
C	4	2	1	1			2

n=número de cobayas. **TEST**= Total de estructuras. **UFO**= Ovocito sin fecundar. **MOR**= mórula. **BLAST**= blastocisto. **CEST**= Calidad de estructuras. **A**= Apto. **NA**= No apto. **A-rFSH**= Aplicación de rFSH antes del retiro de P4. **DFSH**= Aplicación de rFSH después del retiro de P4. **C**= Sin aplicación de rFSH.

4.2. Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas

Las diferentes características de las hembras en las que se incluyen apertura de la membrana vaginal, número y diámetro de estructuras ováricas se resumen en la tabla 4. A la revisión de apertura de membrana vaginal (AMV) de todas las cobayas después del retiro de la fuente de progesterona, las hembras mostraron AMV a las 31,75±18,4 horas.

Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de las cobayas.

	n	X ± DE	95% del intervalo de confianza para la media	
			Límite inferior	Límite superior
FAMV (horas)	14	52,2±42,6	27,5	76,8
PAMV (horas)	14	31,8±18,4	16,4	47,1
VO (mm ³)	14	55,9±36,5	25,4	86,5
CLs	14	2,6±1,6	1,3	3,9
DCLs (mm)	14	1,0±0,4	0,7	1,3
FOLs	14	3,3±1,9	1,6	4,9
DFOLs (mm)	14	1,7±1,5	0,5	2,9

FAMV= Número de horas transcurridas desde la aplicación de rFSH hasta la apertura de membrana vaginal (AMV). **PAMV**= Número de horas transcurridas desde el retiro de la fuente de progestágeno hasta AMV. **VO**= Volumen Ovárico. **CLs**= Número total de cuerpos lúteos. **DCLs**= Diámetro de los cuerpos lúteos. **FOLs**= Número total de folículos. **DFOLs**= Diámetro de folículos.

El análisis de la AMV mostró que las cobayas a las cuales se les aplicó la rFSH antes del retiro de la fuente de progesterona (grupo A-rFSH), y a las que no se les aplicó hormona (grupo control), tardaron más horas en abrir la membrana vaginal y por lo tanto demostraron conducta estral en mayor tiempo que las cobayas a las que se le aplicó hormona rFSH después del retiro de la fuente de progesterona (grupo D-rFSH) (A-rFSH $45,15 \pm 2,8$; C $44,5 \pm 4,1$ vs. D-rFSH $11,15 \pm 2,3$; $p < 0,0001$).

Del mismo modo, al revisar la AMV desde el momento de la aplicación del tratamiento de rFSH, el grupo A-rFSH presentó un mayor tiempo para apertura de membrana vaginal en comparación con el grupo D-rFSH ($93,14 \pm 2,7$ vs. $11,14 \pm 2,2$; $p < 0,0001$) (Figura 11A y 11B).

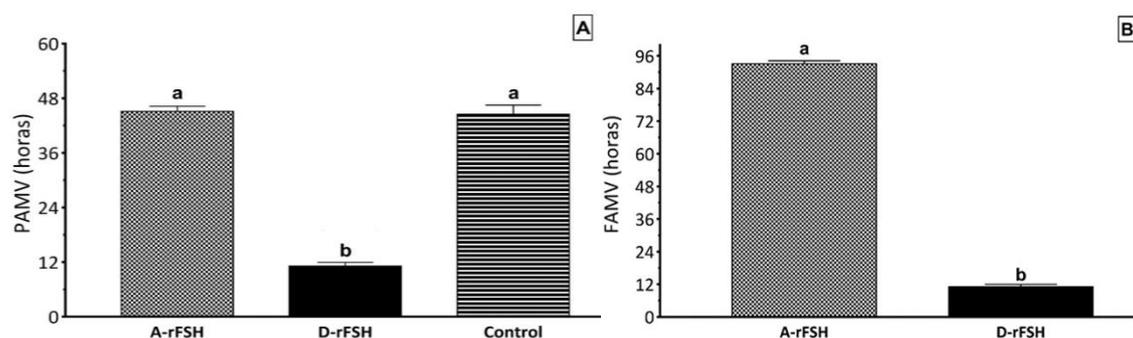


Figure 11. Monitoreo de apertura de membrana vaginal (AMV) de cobayas desde el retiro de la fuente de progesterona (Altrenogest) hasta la manifestación de celo (panel A) y monitoreo de la apertura de membrana vaginal de cobayas desde el inicio de la aplicación del tratamiento con rFSH hasta la manifestación de celo (panel B). Cobayas a las que se les aplicaron diferentes dosis de rFSH antes (Grupo A-rFSH) o después (Grupo D-rFSH) del retiro de la progesterona y cobayas sin aplicación de rFSH (Grupo Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,0001$).

Las características morfométricas del ovario demostraron que el valor medio del volumen ovárico de todas las hembras del estudio fue de $55,9 \pm 36,5 \text{ mm}^3$ (Tabla 4). Así mismo, ambos grupos a los cuales se les aplicó la hormona rFSH mostraron un volumen ovárico menor y similar entre ellos en comparación del grupo control (A-rFSH $39,8 \pm 10,2$; D-rFSH $29,6 \pm 8,1$ vs. C $75,8 \pm 44,5$, $p < 0,01$. Figura 12).

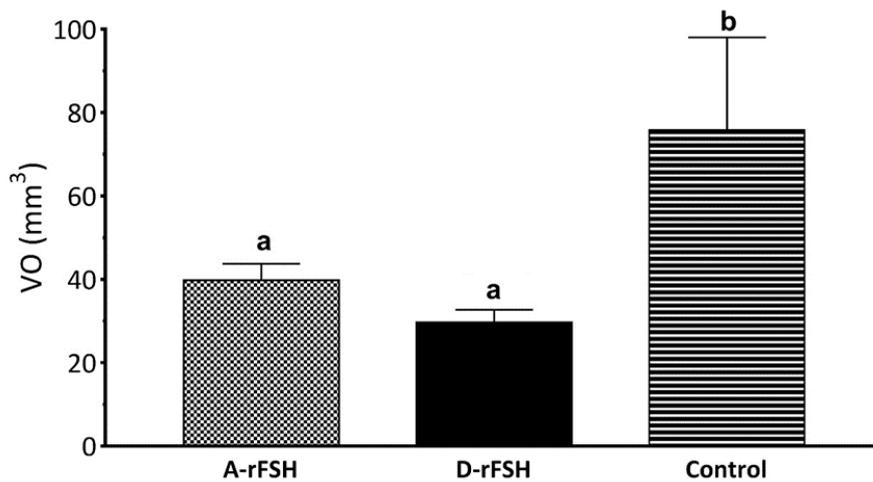


Figure 12. Volumen ovárico en mm³ (VO) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con r-FSH. Cobayas a las que se les aplicaron diferentes dosis de rFSH antes (Grupo A-rFSH) o después (Grupo D-rFSH) del retiro de la progesterona y cobayas sin aplicación de rFSH (Grupo Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$).

El número total de cuerpos lúteos (CLs) observados en cobayas en el día del sacrificio no difirió entre los tratamientos (A-rFSH 3,2±1,8; D-rFSH 2,7±1,1; C 3,0±1,6, $p > 0,05$. Figura 13A).

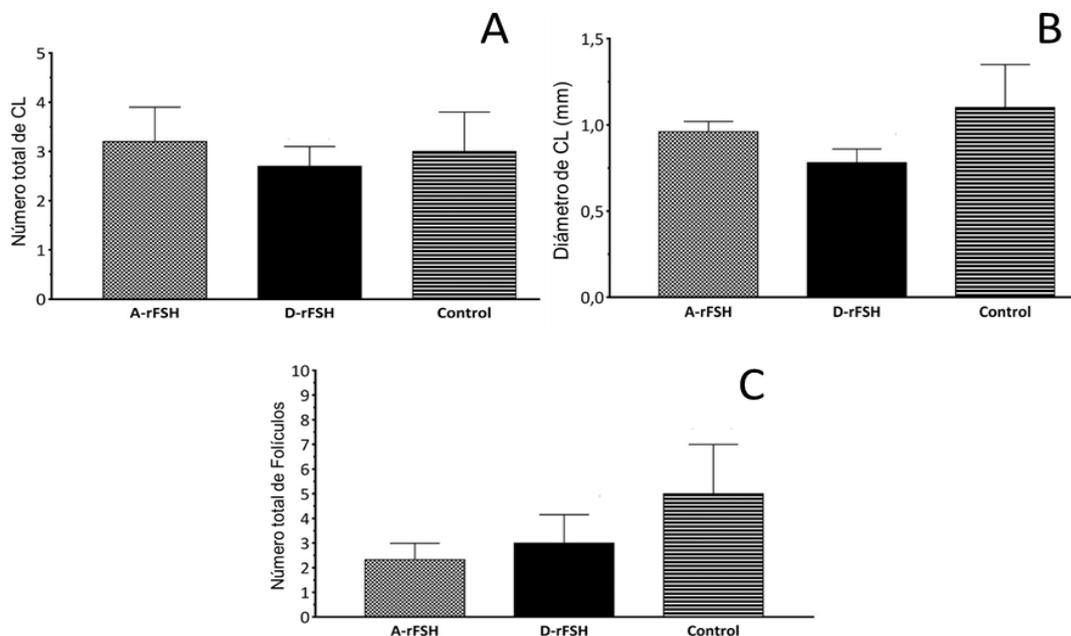


Figure 13. Número total de cuerpos lúteos (CLs) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH (Panel A); Diámetro de cuerpos lúteos (DCLs) en cobayas

sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH (Panel B); y Número total de folículos en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con rFSH (Panel C). Cobayas a las que se les aplicaron diferentes dosis de rFSH antes (Grupo A-rFSH) o después (Grupo D-rFSH) del retiro de la progesterona y cobayas sin aplicación de rFSH (Grupo Control). No existe diferencias significativas entre los grupos.

El diámetro de los cuerpos lúteos (DCLs) observados en cobayas en el día del sacrificio no difirió entre tratamientos (A-rFSH $0,96\pm 0,17$; D-rFSH $0,78\pm 0,22$; C $1,1\pm 0,5$, $p>0,05$. Figura 13B). El número total de folículos observados en cobayas en el día del sacrificio no difirió entre los tratamientos (A-rFSH $2,33\pm 1,15$; D-rFSH $3,0\pm 2,0$; C $5\pm 2,8$, $p>0,05$. Figura 13C), a pesar de que el Grupo control presentó numéricamente un número total de folículos mayor que los demás grupos.

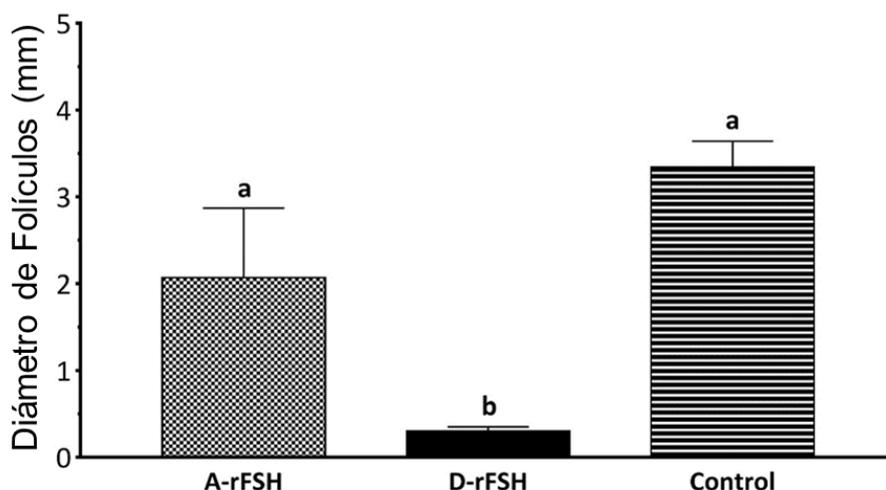


Figure 14. Diámetro de folículos (DFOLs) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con Rfsh. Cobayas a las que se les aplicaron diferentes dosis de rFSH antes (Grupo A-rFSH) o después (Grupo D-rFSH) del retiro de la progesterona y cobayas sin aplicación de rFSH (Grupo Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$).

La valoración del diámetro folicular mostró que el grupo control y A-rFSH tuvieron un valor medio mayor y similar respectivamente, que del grupo D-rFSH (A-rFSH $2,07\pm 1,4$; C $3,34\pm 0,4$ vs. D-rFSH $0,3\pm 0,07$; $p < 0,05$, Figura 14).

5. Discusión

Los resultados del presente estudio sugieren que la aplicación de un protocolo de superovulación basado en la administración de la hormona folículo estimulante recombinante (rFSH) antes y después del retiro de una fuente de progesterona (P4) no ocasiona un efecto sobre la respuesta ovárica de cobaya y por consiguiente sobre el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas. Sin embargo, las cobayas muestran que tienen modificada las características morfológicas del ovario, lo que sugiere que la administración de rFSH como parte del tratamiento de superovulación pudiera alterar la morfología, más no la respuesta ovárica en cobayas.

Un total de seis estructuras (2 mórulas y 4 ovocitos sin fecundar) fueron obtenidas después de 96 ± 24 horas (4 ± 1 día) del apareamiento. Chavatte-Palmer & Guillomot (2007) indican que en cobayas (*Cavia porcellus*) aproximadamente a las 84 horas (3,5 días) después de la fertilización, se puede visualizar un embrión de 8-16 células; a pesar que los datos de este estudio no son iguales a los nuestros, si guardan una relación cercana. Se sabe que en condiciones fisiológicas, un embrión debería alcanzar el lumen y en un lapso de 144 horas (6 días) deberían estar implantados a nivel de los cuernos uterinos tomando como referencia el día de la cópula; lo que indica que el periodo de tiempo en el que nosotros obtuvimos las estructuras está en concordancia con el trabajo reportado por Chavatte-Palmer & Guillomot, (2007). Por lo que suponemos que el mejor día para la recogida de embriones de cobayas superovuladas o no, es el 96 ± 24 horas según nuestro estudio; aunque es algo que no se puede comprobar en las condiciones en las que se realizó el presente estudio.

Edwards et al., (2005) en su estudio con ratones demuestra que la estimulación ovárica inducida con r-FSH a dosis bajas (5 UI) retrasa el desarrollo de embriones, afecta la calidad embrionaria y disminuye la actividad ovárica. Pero sugiere que el número de embriones producidos con dosis altas (>20 UI) tiene impacto positivo en el desarrollo de los embriones, reflejándose en el reclutamiento de folículos que normalmente se vuelven atrésicos, así como folículos que se ven inducidos a madurar antes de tiempo. Sin embargo, en nuestro estudio a pesar de usar una dosis total de 30 UI por animal no se obtuvieron los resultados esperados, no obstante, los embriones obtenidos se encontraban en un desarrollo adecuado según su edad post-fertilización.

Durante la etapa de celo del ciclo estral en la cobaya se da el proceso de la ovulación, este evento fisiológico en esta especie puede ser valorado a través de la visualización de la apertura de la membrana vaginal (AMV) que nos da como referencia del momento que inicia el celo, que fue descrito por primera vez por Stockard & Papanicolau, (1919) en ratones. En nuestro estudio valoramos la AMV siguiendo dos criterios: desde el retiro de la fuente de P4 (PAMV) y desde el momento de la aplicación de la hormona rFSH (FAMV), para valorar si la

administración de rFSH podría tener un efecto sobre la AMV. Las cobayas a las que se les administró FSH en el momento del retiro de la fuente de progesterona demostraron a los $11,15 \pm 2,3$ horas después del retiro de P4, lo que sugiere que la administración de esta gonadotropina recombinante tiene efecto sobre el desarrollo folicular. En algunos estudios se ha reportado que la AMV ocurre dentro de 24 a 72 horas luego de la revisión diaria de la MV durante el ciclo estral de cobayas o puede ocurrir dentro de 72 horas después del retiro de una fuente de progesterona (Altrenogest) (Wilson et al., 2021; Grégoire et al., 2012).

La diferencia de AMV del grupo D-rFSH ($11,15 \pm 2,3$ horas) coincide que la superovulación se inicia un día después del retiro de P4, que según (Obregón, 2009), la cobaya en este tiempo estaría en etapa de proestro del ciclo estral, con una duración de 12 ± 2 horas (Araníbar & Echevarría, 2014), que coincide con el tiempo de este grupo al demostrar conducta estral, y por lo tanto, apertura de membrana. El desarrollo folicular será mejor, en el grupo D-rFSH, al no existir P4 que limite su crecimiento. Y el grupo control, al no recibir dosis de rFSH, no tendrá ningún estímulo ovárico.

Desde el momento de la administración de hormona rFSH, la AMV en el grupo A-rFSH también ocurrió en mayor tiempo en comparación con el grupo D-rFSH, lo que sugiere que la manifestación de conducta estral está relacionada directamente con el desarrollo de los folículos y que este desarrollo puede coincidir con niveles altos de progesterona y como se mencionó anteriormente una fuente de P4 podría retrasar el desarrollo de o los folículos.

En este estudio se observó un menor volumen ovárico en ambos grupos de cobayas a las que se les administró rFSH, indistintamente del momento de aplicación (antes o después del retiro de P4), en comparación con el grupo control. Estos resultados concuerdan con los valores normales de morfometría ovárica de cobayas, evaluadas por Punniakotti et al. (2022), quienes midieron el diámetro ovárico de cobayas normales y timectomizadas. Y también concuerdan con los resultados reportados por Cavia et al., (2022) que midió el diámetro ovárico normal de dos líneas de cobayas de Sudamérica. Sin embargo, en nuestro estudio el volumen ovárico mayor se observó en el grupo control. Esta diferencia en el volumen ovárico se debió a que este grupo presentó folículos de mayor tamaño ($3,34 \pm 0,4$ mm). La estimulación del tamaño folicular se debe directamente a la acción de las hormonas gonadotróficas que pudo ser asincrónica, dando como resultado folículos preovulatorios de mayor tamaño que no responden adecuadamente a las concentraciones altas de las hormonas lo que resulta en el desarrollo de quistes foliculares (Astapova et al., 2019; Bean, 2013; Edwards et al., 1977). En diferentes estudios de medición del volumen ovárico se indica un rango, en condiciones fisiológicas, de 6 a 36 mm³ (3-6 mm x 2-4 mm x 2-3 mm) (Hargaden & Singer, 2012). Pero en nuestro estudio, se sugiere un mayor volumen cuando se superovula con rFSH antes de retirar P4 que después.

La administración de rFSH (30 UI) antes o después del retiro de P4 no incrementó el número de cuerpos lúteos y folículos en las cobayas, estos valores coinciden con el número de folículos que, en condiciones fisiológicas, alcanzan la maduración y ovulan (3,34 folículos) y, por lo tanto, el número de cuerpos lúteos sería igual. Como se describió anteriormente, la estimulación ovárica en ratones hembras a dosis altas tiene una mejor respuesta en el número de folículos y cuerpos lúteos (Edwards et al., 2005). Este efecto también se evidencia en el estudio de Cedano, (2016) en conejas donde se informa que el uso de rFSH, dosis total de 120 UI (3 µg), fue suficiente para superovular conejas sin comprometer la cantidad y calidad de los embriones. Por otra parte, Nicolau, (2012) con 72 UI (1,8 µg) obtuvo una respuesta similar en conejas. Este efecto se debe directamente a la fisiología reproductiva de la coneja ya que la ovulación tiene lugar luego del apareamiento (ovulación inducida) (Castro, 2016). Consecuentemente se estimula un receptor somatosensorial genital que, a través de vías neurales, provoca una liberación masiva de GnRH después del apareamiento (Bakker & Baum, 2000). La calidad de embriones recuperados en conejas no se ve alterada al usar rFSH a comparación de las cobayas, quizás la razón directa de este efecto se deba a que las conejas presentan un tiempo de desarrollo embrionario diferente (Nicolau, 2012), los embriones de coneja alcanzan el estadio de mórula más pronto que la cobaya (72 vs 96 horas) (Chavatte-Palmer & Guillomot, 2007).

Asimismo, el diámetro de los cuerpos lúteos fue similar entre ambos grupos tratados (A-rFSH 0,96 mm±0,17 mm; D-rFSH 0,78 mm±0,22 mm), estos resultados concuerdan con las mediciones realizadas por Lipschutz et al., (1948) y Spies et al., (1964). Ambos llegan a la conclusión que el diámetro del cuerpo lúteo normal, se encuentra alrededor de 1,5 mm. Sin embargo, el diámetro de los cuerpos lúteos fue menor en el grupo D-FSH.

El diámetro de los folículos puede ser afectado por las concentraciones de progesterona antes de inducir el crecimiento folicular con alguna hormona gonadotrópica, lo que podría ocasionar un crecimiento lento del folículo, debido a un perfil endócrino alterado (Atkins et al., 2010). En vacas lecheras que ovulan un folículo dominante (preovulatorio) pequeño las concentraciones plasmáticas de estrógenos son siempre bajas durante el periodo preovulatorio y las concentraciones de progesterona son reducidas en la fase lútea después de la ovulación (Atkins et al., 2010). Grégoire et al., (2012) indica que la duración del tratamiento con Altrenogest debería de adaptarse a las poblaciones con diferente duración del ciclo estral para evitar la presencia de actividad luteal residual al finalizar el tratamiento que, probablemente, afectaron al grupo D-rFSH.

6. Conclusiones

- La administración intraperitoneal de una dosis total de 30 UI de la hormona rFSH antes y después del retiro de una fuente de progesterona (P4) no ocasionó un efecto sobre la respuesta ovárica y por consiguiente sobre el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas.
- La aplicación de rFSH después del retiro de la fuente de progesterona ocasionó que las hembras entraran en celo en un periodo de tiempo más corto.
- La administración de rFSH a cobayas ocasiona una reducción del volumen ovárico por la modificación de la morfología folicular.

Referencias

- Aliaga, L. (1990). Selección y Mejoramiento de los cuyes. *Universidad Nacional Del Centro Del Perú*, Lima, Perú.
- Araníbar, E., & Echevarría, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. In *Rev Inv Vet Perú* (Vol. 25, Issue 1).
- 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>
- Atkins, J. A., Smith, M. F., Wells, K. J., & Geary, T. W. (2010). Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. *Journal of Animal Science*, 88(7), 2300–2310. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2531>
- Aucapiña, C., & Marín, Á. (2016). Efecto de a extirpación de Las espículas del glande del cuy como técnica de esterilización reproductiva y su influencia en agresividad y ganancia de peso en comparación con un método químico (alcohol yodado 2%)". In *Universidad de Cuenca*.
- Baenziger, J. U., & Green, E. D. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: Structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 947(2), 287–306. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(88\)90012-3](https://doi.org/10.1016/0304-4157(88)90012-3)
- Bakker, J., & Baum, M. J. (2000). Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(3), 220–262. <https://doi.org/10.1006/frne.2000.0198>
- Balash, J. (2020). Inducción a la ovulación: Hormonas recombinantes. In *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.
- 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>
- Bean, A. D. (2013). Ovarian Cysts in the Guinea Pig (*Cavia porcellus*). *Veterinary Clinics of NA: Exotic Pet*, 16(3), 757–776. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.05.008>
- Buñay, P., & Zhinin, A. (2022). *Implementación de un protocolo de maduración in vitro de ovocitos de cobaya (Cavia porcellus)*. Universidad de Cuenca.
- Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y., García-García, R., Lorenzo, P., Rebollar, P., & Arias-Álvarez, M. (2015). Effect of epidermal growth factor on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of guinea pig oocytes. *Developmental Biology and Physiology of*

- Reproduction*, 72(1), 793. https://oa.upm.es/40169/1/INVE_MEM_2015_222875.pdf
- Carpio, L. A. (2014). Revisión de la técnica de la evaluación ultrasonográfica de la reserva ováricamediante el recuento de folículos antrales y el volumen ovárico promedio. *Revista Perú*, 3(1), 63.
- Cavia, D., América, D., Fernández, E. A., Rosales, C. A., Garzón, J. P., Daniel, E., Ayala, L. E., Guevara, G. E., Maldonado, J. E., & Perea, F. P. (2022). *Morphological and histological characteristics of ovaries from two genetic groups of guinea pigs (Cavia porcellus) from South America*. 33(4), 1–11.
- Cedano Castro, J. I. (2016). *Effect of ovarian stimulation treatments on the embryo quality in rabbit*. 53.
- Chang, A. M., Chen, C. C., Hou, D. L., Ke, G. M., & Lee, J. W. (2021). Effects of a recombinant gonadotropin-releasing hormone vaccine on reproductive function in adult male ICR mice. *Vaccines*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080808>
- Chavatte-Palmer, P., & Guillomot, M. (2007). Comparative implantation and placentation. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 64(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000101742>
- Donovan, B. T., & Lockhart, A. N. (1972). Growth and regression of the corpora lutea formed in guinea-pigs in response to treatment with exogenous gonadotrophin. *The Journal of Endocrinology*, 54(2), 327–332. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0540327>
- Edwards, L. J., Kind, K. L., Armstrong, D. T., & Thompson, J. G. (2005). Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(5 51-5), 845–851. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00398.2004>
- Edwards, R. G., Fowler, R. E., Gore-Langton, R. E., Gosden, R. G., Jones, E. C., Readhead, C., & Steptoe, P. C. (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*, 51(1), 237–263. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0510237>
- Flecknell, P. (1990). Anestesia en el Animal de Laboratorio. Parte 2. In *Anestesia de animales de laboratorio* (pp. 36–44). Editorial Acribia; S.A.
- Garza, F., Shaban, M. A., & Terranova, P. F. (1984). Luteinizing hormone increases the number of ova shed in the cyclic hamster and guinea-pig. *Journal of Endocrinology*, 101(3), 289–298. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1010289>
- Goa, K. L., & Wagstaff, A. J. (1998). Follitropin alpha in infertility: A review. *BioDrugs*, 9(3), 235–260. <https://doi.org/10.2165/00063030-199809030-00006>
- Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M., & Joly, T.

- (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Grégoire, Anne. (2012). Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*): production et congélation des embryons. In *Journal of architecture and building science*. Université de Lyon, France.
- Grégoire, Anne, Joly, T., Huamán Fuertes, E., Silva Arce, R. M., & León Trinidad, S. (2010). Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones. *Bulletin de l'Institut Français d'études Andines*, 39(39 (1)), 185–188. <https://doi.org/10.4000/bifea.2164>
- 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/B978-0-12-380920-9.00020-1>
- Howles, C. M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F®). *Human Reproduction Update*, 2(2), 172–191. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.2.172>
- Lipschutz, A., Iglesias, R., Bruzzone, S., Humerez, J., & Penaranda, J. M. (1948). Progesterone and desoxycorticosterone in the steroid control of the gonadotrophic function of the hypophysis (exemplified by the behavior of the intrasplenic ovarian graft in the guinea pig). *Endocrinology*, 42(3), 201–209. <https://doi.org/10.1210/endo-42-3-201>
- Nicolau, C. C. (2012). *Efecto de la aplicación de gonadotropinas recombinantes humanas sobre la producción y calidad de ovocitos y embriones en coneja*.
- Obregón, D. A. (2009). *Utilización de dos métodos de sincronización de celos en cuyas multíparas*.
- Orizaba-Chávez, B., Alba-Jasso, G., & Ocharán-Hernández, M. (2013). Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jua Mex*, 80(1), 59–66.
- Penitente-Filho, J. M. aur., Jimenez, C. R. odrigue., Zolini, A. M. oreir., Carrascal, E., Azevedo, J. L. uiz., Silveira, C. O. liveir., Oliveira, F. A., & Torres, C. A. lexandr. A. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 86(2), 148–152. <https://doi.org/10.1111/asj.12261>
- Pierce, J. G., & Parsons, T. F. (1981). Glycoprotein hormones: Structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 50, 465–495. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.002341>
- Pino, T. (2015). *Descripción histológica de ovarios y testículos de cuyes (Cavia porcellus) a los dos meses de edad, suplementados con nucleótidos* [Universidad Católica de Santa María]. <https://core.ac.uk/download/pdf/198133271.pdf>
- Portelli, C. (2013). *Superovulation and Embryo Recovery in the Guinea Pig* (p. 41).

<http://www.huveta.hu/handle/10832/973>

- Punniakotti, M., Nithya, V., & Villanueva, J. (2022). *Histomorphometric changes in the ovaries of thymectomized guinea pigs*. 147–159. <https://doi.org/10.36253/ijae-13680>
- Ruiz, M., Rivera, B., & Ruiz, A. (1998). *Reproducción Animal: Métodos de estudio en sistemas*. IICA Rispal.
- Salcedo, J. M. (2016). Sincronización de celo en cuyes (*Cavia porcellus*) mediante el uso de hormonas y su efecto sobre la tasa reproductiva. In *Universidad Alas Peruanas*. <https://hdl.handle.net/20.500.12990/1389>
- Solís, R. J., & Chávez, P. N. (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*. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Spies, H., Gier, H., & Wheat, J. (1964). Ovarian changes in hormone treated hysterectomized and cycling guinea pigs. *Kansas Academy of Science*, 67(3), 517–526. <http://www.jstor.org/stable/3626883>
- Stockard, C. R., & Papanicolau, G. N. (1919). The Vaginal Closure Membrane, Copulation, and the Vaginal Plug in the guinea-pig, with further considerations of the Oestrous rhythm. *The Biological Bulletin*, 37(4), 222–245. <https://doi.org/10.2307/1536207>
- Stringfellow, D. A., 1944-, & Seidel, S. M. (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. The Society.
- Suzuki, O., Ogura, A., Asano, T., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., & Oike, M. (1993). Development of preimplantation guinea-pig embryos in serum-free media. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(4), 425–432. <https://doi.org/10.1071/RD9930425>
- Suzuki, Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., Watanabe, G., Tsonis, C. G., & Taya, K. (2000). Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 1–7. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1180001>
- Tapanainen, J. S., Lapolt, P. S., Perlas, E., & Hsueh, A. J. W. (1993). Induction of Ovarian Follicle Luteinization by Recombinant Follicle-Stimulating Hormone*. *Endocrinology*, 133(6), 2875–2880.
- 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>

Anexos

Anexo A. Adaptación de cobayas (*Cavia porcellus*) por 15 días.



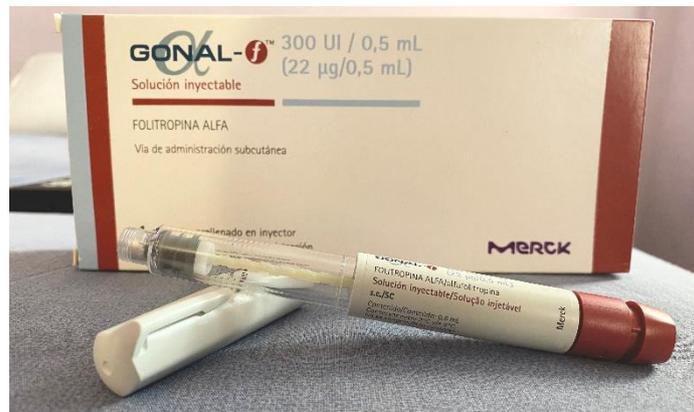
Anexo B. Jaula dividida en tres secciones para cada grupo experimental.



Anexo C. Administración de Altrenogest vía oral a los grupos experimentales.



Anexo D. Hormona folículo estimulante recombinante, folitropina alfa (Gonal-F, Merck, Alemania)



Anexo E. Monitoreo de apertura de membrana vaginal (AMV): Membranas vaginales perforadas (abierta).



Anexo F. Monitoreo de AMV: Membranas vaginales cerradas.



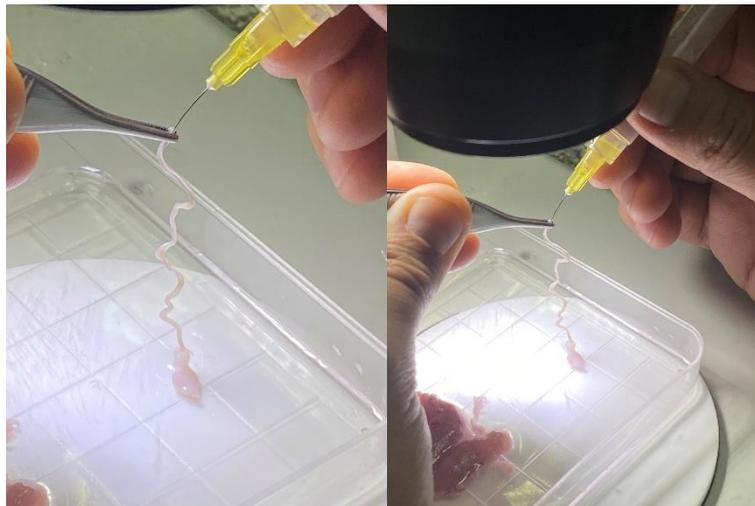
Anexo G. Extracción del aparato reproductor de la cobaya.



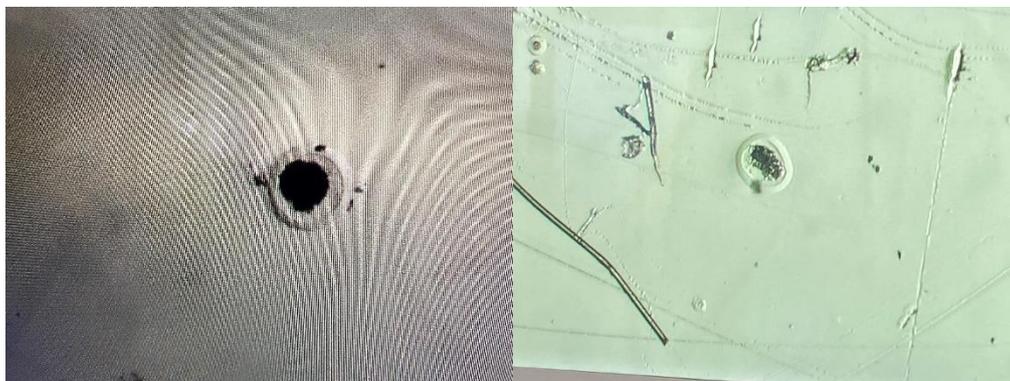
Anexo H. Introducción del catéter en entrada de cérvix para lavado del útero.



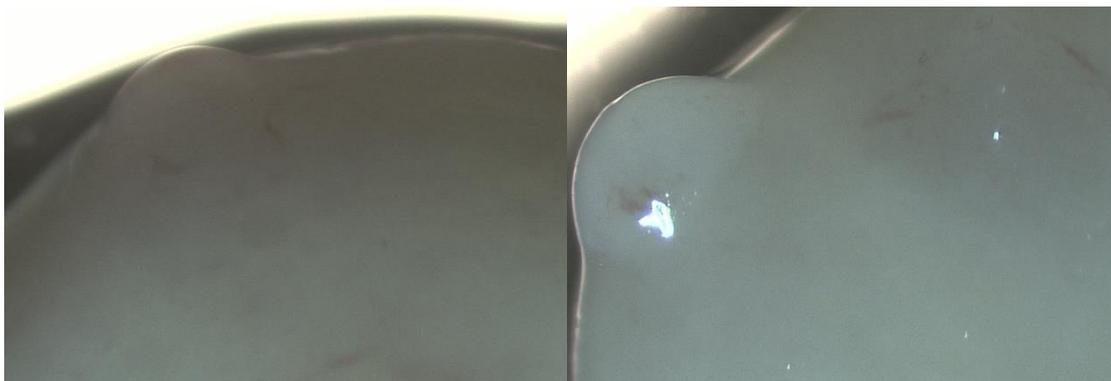
Anexo I. Lavado de oviductos para recuperación de estructuras.



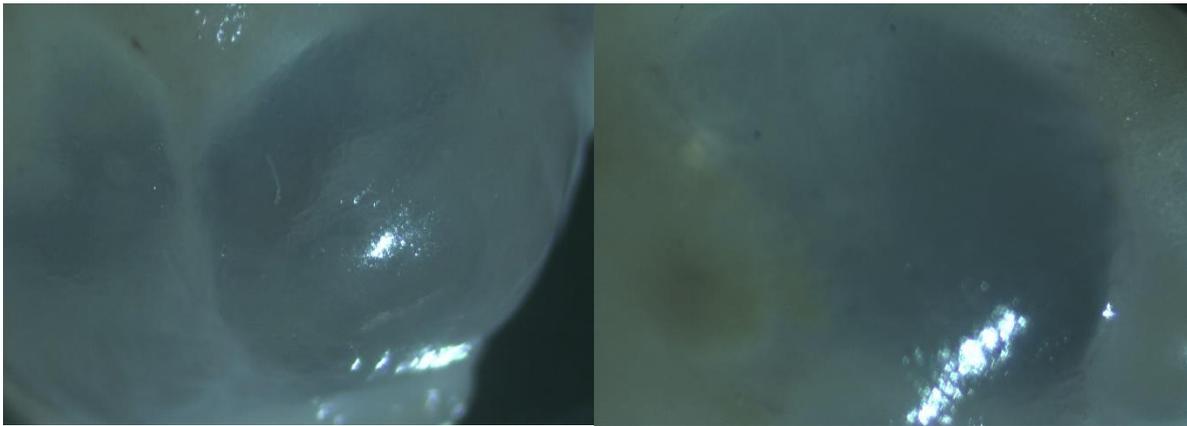
Anexo J. Visualización de Ovocitos sin fecundar (UFO, por sus siglas en inglés).



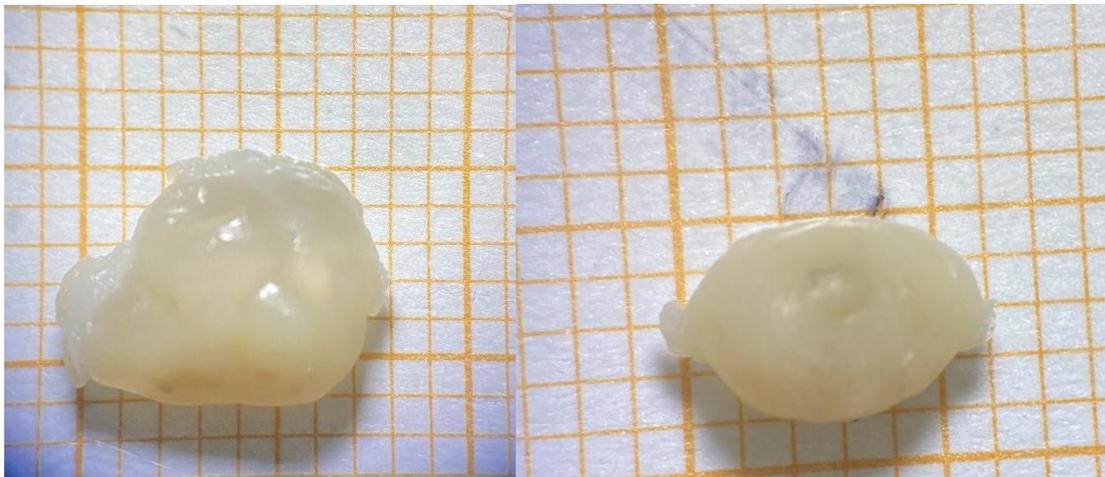
Anexo K. Cuantificación de Cuerpos lúteos bajo lente de estereomicroscopio.



Anexo L. Cuantificación de Folículos bajo lente de estereomicroscopio



Anexo M. Medición del diámetro del ovario, cuerpos lúteos y folículos en papel milimetrado bajo lente de estereomicroscopio.



Anexo N. Medición del diámetro ovárico con el software Imagej.

