

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Adición del líquido folicular como suplemento al medio de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya provenientes de ovarios de matadero**

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

**Autor:**

Nidia Nataly Aguinsaca Yauri

Mishel Stefanía Motoche Castro

**Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

**Cuenca, Ecuador**

2023-06-26

### Resumen

En los últimos años se ha tratado de mejorar el proceso de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de cobayas, sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora son contradictorios. Por lo tanto, el presente estudio pretendió validar un protocolo de obtención de líquido folicular (LF) de cobaya en celo y luego, evaluar el efecto de la suplementación de este en diferentes porcentajes en un medio convencional de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya. Para el primer experimento se utilizaron 10 cobayas mestizas, que recibieron un protocolo de sincronización del celo, a base de progesterona oral durante 15 días consecutivos; se obtuvo 200  $\mu$ l de LF. En el segundo experimento se obtuvieron complejo cúmulus ovocitos (COC's) de ovarios de cobaya mediante la técnica de *slicing*. Los COC's aptos fueron repartidos al azar en cuatro medios de MIV que contenían diferentes porcentajes de LF (T0= control; T1= 5%; T2= 10% y T3= 20%). Luego de 24 horas se observó en T1 ( $68,1 \pm 3,01\%$ ) y T3 ( $66,6 \pm 3,39\%$ ), mayor expansión de las células del cúmulo (CC), comparado con T2 ( $54,35 \pm 2,72\%$ ) y T0 ( $43,19 \pm 2,43\%$ ), ( $p < 0,05$ ). Además, al evaluar el reinicio de la progresión de la meiosis se observó que los ovocitos del T3 ( $33,46 \pm 2,4\%$ ) y T2 ( $31,06\% \pm 1,93\%$ ) presentaron mayor porcentaje en metafase II, sin diferencia estadística entre los dos tratamientos; comparado con los de T1 ( $24,52 \pm 2,13\%$ ) y T0 ( $14,07 \pm 1,72\%$ ). En conclusión, la suplementación de 10% de líquido folicular de cobaya en un medio convencional de maduración, resultó en un mayor porcentaje de expansión del cúmulo; además, mejoró el porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II.

*Palabras clave:* maduración *in vitro*, cobaya, líquido folicular, COC's, ovocitos

### Abstract

In recent years, the *in vitro* maturation (IVM) process of guinea pig oocytes has been trying to improve. However, the results obtained until now are contradictory. Therefore, the present study sought to validate a protocol for obtaining follicular fluid (FL) from guinea pigs in estrus and then, to evaluate the effect of supplementing it in different percentages in a conventional medium *in vitro* maturation of guinea pig oocytes. For the first experiment, ten mestizo guinea pigs were used, which received a heat synchronization protocol based on oral progesterone for 15 consecutive days as a result 200µl of LF was obtained. In the second experiment, cumulus oocyte complexes (COC's) were obtained from guinea pig ovaries using the *slicing* technique. The COC's were distributed randomly in four IVM media containing different percentages of FL (T0= control, T1= 5%, T2= 10%, and T3 = 20%). After 24 hours, greater expansion of cumulus cells (CC) was observed in T1 ( $68.1 \pm 3.01\%$ ) and T3 ( $66.6 \pm 3.39\%$ ). It compared to T2 ( $54.35 \pm 2.72\%$ ) and T0 ( $43.19 \pm 2.43\%$ ) with  $p < 0.05$ , between groups. In addition, when evaluating the restart of meiosis progression, it was observed that the oocytes from T3 ( $33.46 \pm 2.4\%$ ) and T2 ( $31.06\% \pm 1.93\%$ ) presented a higher percentage of oocytes in metaphase II, without a statistical difference between these two treatments; compared to the oocytes from T1 ( $24.52 \pm 2.13\%$ ) and T0 ( $14.07 \pm 1.72\%$ ). In brief, the supplementation of 10% guinea pig the follicular fluid in a conventional maturation medium resulted in a higher percentage of cumulus expansion, it improves the percentage of oocytes that reach metaphase II.

*Keywords:* maturation *in vitro*, guinea pig, follicular fluid, COC's, oocytes

## Índice de contenidos

<b>Introducción .....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo general.....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>Revisión de literatura.....</b>	<b>16</b>
3.1. Origen del cobayo.....	16
3.2 Morfofisiología del aparato reproductor de la hembra cobaya .....	16
3.2.1 Vulva .....	16
3.2.2 Vagina .....	16
3.2.3 Útero .....	16
3.2.4 Oviducto.....	17
3.2.5 Ovarios.....	17
3.3 Fisiología reproductiva de la cobaya .....	17
3.4 Pubertad .....	17
3.5 Ciclo estral de la cobaya.....	18
3.6 Desarrollo, crecimiento y maduración de ovocitos <i>in vivo</i> .....	18
3.6.1 Ovogénesis y foliculogénesis .....	18
3.6.2 Fases del desarrollo folicular .....	19
3.6.3 Dinámica Folicular de las cobayas .....	20
3.7 Biotécnicas reproductivas utilizadas en la cobaya.....	20
3.7.1 Sincronización del celo.....	20
3.7.2 Maduración <i>in vitro</i> del complejo cúmulos ovocitos (COC's) .....	21
3.8 Criterios de clasificación de ovocitos en cobayas.....	23
3.9 Líquido Folicular .....	23
3.9.1 Formación del líquido folicular. ....	23
3.9.2 Composición del líquido folicular .....	24

3.9.3 Líquido folicular como suplemento en la maduración <i>in vitro</i> .....	25
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>26</b>
4.1 Materiales .....	26
4.2 Métodos .....	28
4.2.1 Área de Estudio .....	28
4.2.2 Unidad experimental .....	29
4.2.3 Diseño experimental .....	29
4.3 Metodología .....	30
4.3.1 Sincronización del celo de las cobayas .....	30
4.3.2 Recolección de los ovarios de cobaya .....	31
4.3.3 Preparación de los ovarios de cobaya .....	31
4.3.4 Obtención de COC's de los ovarios de cobaya .....	31
4.3.5 Clasificación de COC's de cobaya .....	32
4.3.6 Recolección del Líquido Folicular de cobaya .....	32
4.3.7 Adición del LF al medio de MIV de los COC's de cobaya .....	33
4.3.8 Evaluación de la maduración <i>in vitro</i> de los COC's de cobaya .....	33
4.3.9 Análisis estadístico .....	34
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>36</b>
5.1 Protocolo de obtención de líquido folicular de cobaya en celo .....	36
5.2 Maduración morfológica de los COC's de cobaya .....	37
5.3 Maduración nuclear de los COC's de cobaya .....	39
<b>Conclusiones .....</b>	<b>43</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>44</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>51</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Rutas que puede tomar el LF. Desde la teca capilar al líquido folicular y las posibles barreras: endotelio, lamina basal, subendotelio, intersticio y membrana de la granulosa. Las rutas 1 y 3 es el movimiento del líquido entre las células (flechas continuas), y las rutas 2 y 4 muestran las rutas transcelulares (flechas punteadas) (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010).	24
<b>Figura 2:</b> Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología; en la granja de Irquis parroquia Victoria del Portete.	28
<b>Figura 3:</b> Ubicación satelital de la granja comercial "MATUTE", parroquia Baños.	28
<b>Figura 4:</b> Protocolo de sincronización del ciclo estral de las cobayas con altrenogest. Día 0= Inicio del protocolo, aplicación oral de progesterona sintética hasta el día 15; se revisó la membrana vaginal diariamente los 5 días posteriores al retiro de la hormona.	30
<b>Figura 5:</b> Apertura de la membrana vaginal. Panel 1: MV= membrana vaginal cerrada 0%. Panel 2: membrana vaginal semi abierta 50%. Panel 3: membrana vaginal abierta 100%.	31
<b>Figura 6:</b> A= Ovario de cobaya con un folículo >5mm; B= Alícuotas de 0,1ml de líquido folicular almacenadas en tubos cónicos de 1,5ml.	33
<b>Figura 7:</b> Ovocitos post maduración in vitro suplementados con el 10% de líquido folicular, A= ovocitos tipo A; B= ovocitos tipo B; C= ovocitos tipo C.	34
<b>Figura 8:</b> Maduración nuclear con adición del LF al 10%. A= vesícula germinal; B= placa metafásica; C= metafase II con corpúsculo polar.	34
<b>Figura 9:</b> Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los tratamientos T0=control. T1=5% de adición de líquido folicular. T2=10% de adición de líquido folicular. T3=20% de adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística ( $p > 0,05$ ).	37
<b>Figura 10:</b> Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los COC's de tipo A, tipo B y tipo C. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística ( $p > 0,05$ ).	39
<b>Figura 11:</b> Interacción entre tratamiento y tipo de COC's respecto al porcentaje de expansión de las células del cúmulo en T0=control, T1=5% de adición de líquido folicular, T2=10% de adición de líquido folicular, T3=20% de adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5%.	39
<b>Figura 12:</b> Porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II en los tratamientos T0=control, T1=5% de adición de líquido folicular, T2=10% de adición de líquido folicular, T3=20% de adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística.	40

**Figura 13:** Porcentaje de ovocitos de tipo A, Tipo B y Tipo C que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística. ....41

**Figura 14:** Interacción entre tratamiento y tipo de COC's respecto al porcentaje de ovocitos que reiniciaron meiosis y llegaron a metafase II en T0=control, T1=5% de adición de líquido folicular, T2=10% de adición de líquido folicular, T3=20% de adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5% ( $p < 0,05$ ). ....41

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Componentes no hormonales. Adaptado de (Limache Tito, 2015).....	25
<b>Tabla 2:</b> Proyección gráfica de los tratamientos aplicados y el número de COC's en cada uno. n= 100 COC's. ....	30

## Anexos

<b>Anexo A:</b> Aplicación de la progesterona a las cobayas en la granja comercial "MATUTE".	51
<b>Anexo B:</b> Control de sincronización del celo de cobayas.....	51
<b>Anexo C:</b> Cobayas sincronizadas.....	51
<b>Anexo D:</b> Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca .....	52
<b>Anexo E:</b> Equipo de tésistas en cobayas.....	52
<b>Anexo F:</b> Apertura de la membrana vaginal de la cobaya.....	52
<b>Anexo G:</b> Ovario de cobaya .....	53
<b>Anexo H:</b> Recolección de ovocitos de cobaya .....	53
<b>Anexo I:</b> Gotas de 50µl de medio de manipulación, para el lavado de ovocitos de cobaya.	53
<b>Anexo J:</b> Colocación de los COC's el medio de maduración.....	54
<b>Anexo K:</b> Maduración in vitro de los COC's de cobaya, en la estufa de cultivo trigas.....	54
<b>Anexo L:</b> Cuadernillo de apuntes de maniobras .....	54
<b>Anexo M:</b> MIV de ovocitos de cobayas con los tratamientos T0 y T3. ....	55
<b>Anexo N:</b> Tinción con fluorocromo Hoechst 33342 en cuarto oscuro.....	55
<b>Anexo O:</b> Montaje de los COC's en el portaobjetos.....	55
<b>Anexo P:</b> Revisión de las placas, observación de los COC's nuclearmente.....	56
<b>Anexo Q:</b> Microscopio de Epifluorescencia.....	56
<b>Anexo R:</b> Caja portaobjetos.....	56

## Lista de abreviaturas

- MIV**= maduración *in vitro*
- LF**= líquido folicular
- MV**= membrana vaginal
- COC´S**= complejo cúmulus ovocitos
- CC**= células del cúmulo
- SOV**= superovulación
- SFB**= suero fetal bovino
- FSH**= hormona folículo estimulante
- LH**= hormona luteinizante
- EGF**= factor de crecimiento epidérmico
- hMG**= hormona menopaúsica humana
- EGF**= factor de crecimiento epidérmico
- Cys**= cisteamina
- LIF**= factor inhibidor de la leucemia
- PIVE**= producción *in vitro* de embriones
- PGF<sub>2α</sub>**= prostaglandinas F<sub>2α</sub>

## Dedicatorias

Con mucho cariño, este trabajo de titulación va dedicado a mi mami Sayda Yauri y a mi esposo Augusto Zhinin; por su apoyo incondicional en todos estos años y por siempre motivarme a seguir avanzando y a nunca desfallecer.

Nataly Aguinaca

A mi hija Julieta mi motor y mi felicidad eterna, quien desde que llegó a mi vida me enseñó a luchar y a esforzarme por cada objetivo planteado.

A mis padres Milton y Norma que me han enseñado los valores de la vida y me han dado siempre palabras de aliento para superar todos los obstáculos que se presenten.

Mishel Motoche

## Agradecimientos

Dando Gracias a Dios, por siempre cuidarme y protegerme; agradecida con mi mami por su amor y motivación constante a seguir luchando; a ti Augusto muchas gracias por salvarme de ese abismo en el que me encontraba y por el gran apoyo para culminar mi carrera profesional, a mi hijo Leandro gracias por ser esa motivación de todos los días para seguir avanzando y a mi suegra María gracias por cuidarme como una hija más y su apoyo incondicional.

A mis hermanos, que de alguna forma me daban palabras de aliento.

A las personas que aportaron su conocimientos y granito de arena en la realización de esta investigación.

A mi tutor Dr., Luis Ayala gracias por compartimos su experiencia, su guía, apoyo y paciencia en el desarrollo de este trabajo de titulación.

Muchas gracias.

Nataly Aguinaca

A Dios por la sabiduría y discernimiento que ha puesto en mi vida y que me ha ayudado a superar cada situación. A mi tutor el Dr. Luis Ayala quien nos dirigió, enseñó y alentó durante todo este proyecto. De manera muy especial agradezco a mi padre Milton quien a pesar de la distancia he sentido su apoyo incondicional y a mi madre Norma por su gran apoyo emocional y su amor. A mi esposo Geovanny y a mi hija Julieta quienes han sido mi inspiración y me han dado el impulso para cumplir con este objetivo tan anhelado. A mis queridos suegros Alexandra y Federico que siempre han estado dispuestos a brindarme su ayuda. Y a mis hermanos por enseñarme su alegría y unión en cada meta cumplida.

Muchas gracias.

Mishel Motoche

## Introducción

El cobayo (*cavia porcellus*) es un roedor emblemático de la cordillera de los Andes (Avilés et al., 2014), su carne es considerada un alimento de alto valor nutricional para las poblaciones rurales de esta región (Zaldivar, 1997). Además, representa un modelo excelente para el estudio de la reproducción en la especie humana por poseer 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, así como experimentales tienen una gran limitante si es comparado con otras especies de roedores utilizados en laboratorio, como los ratones y ratas, su camada es pequeña y solo se pueden obtener pocos embriones de pre-implantación de una hembra (Dorsch et al., 2008).

Como alternativa para incrementar la descendencia en cobayos se han implementado biotecnologías reproductivas como la sincronización de celo mediante el uso de progesterona que actúa inhibiendo la ovulación durante su administración y reestableciendo la función sexual con la aparición del celo al finalizar el tratamiento (Caravaca et al., 2005). La superovulación (SOV) mediante estimulación ovárica con hormona foliculoestimulante (*Follicle Stimulating Hormone, FSH*) y la hormona menopaúsica humana (hMG) (Suzuki et al., 2003).

En los últimos años se ha tratado de implementar la producción de embriones *in vitro* en la cobaya, para lo cual se obtienen ovocitos mediante las técnicas de *slicing* o la aspiración de folículos de ovarios de matadero (Cañón & Córdova, 2012), ambas técnicas proporcionaron COC's muy heterogéneos, esta alta variabilidad en la calidad de los COC's influye en los resultados de la MIV, según lo descrito en otras especies como la bovina (Ayala et al., 2019).

Además, se han establecido criterios de selección y clasificación de ovocitos para la obtención de una MIV de mejor calidad con la valoración de las características morfológicas de citoplasma y las células del cúmulo (CC) en bovinos (Ayala et al., 2019). A pesar de ello, los resultados en la MIV en cobayas difieren, debido a diversos factores biológicos, ambientales y los componentes del medio de maduración (Wang et al., 2019). De modo que, se han investigado alternativas para mejorar la MIV en cobayas, como es la prueba de azul brillante de cresilo (BCB) (Zhinin & Buñay, 2022), sin embargo, en cobayas no ha tenido el efecto esperado.

En trabajos realizados en 1974 en MIV de ovocitos de cobayas se utilizaron ocho partes de TCM-199 (base de solución de Hanks; Difco) y dos partes de suero fetal bovino, suplementado con NaHCO<sub>3</sub> (2 mg/ml), K-penicilina G (100 unidades/ml) y sulfato de estreptomicina

(50 µg/ml), obteniendo un 65% de ovocitos que llegaron a metafase II (maduros) luego de 24 horas de maduración (Yanagimachi, 1974); no obstante, en este trabajo no se llegó a finalizar el proceso de producción *in vitro* de embriones (PIVE). En otro estudio se valoró la suplementación de factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor, EGF*) en el medio de maduración, concluyendo que mejora el porcentaje de maduración (75%) y evitó la apoptosis de los ovocitos (Cañón-Beltrán et al., 2016); sin embargo, los autores no mencionan si llegaron a obtener embriones *in vitro*.

Finalmente, Wang et al., (2019), utilizaron TCM-199, con adición de suero fetal bovino (SFB), *FSH*, hormona luteinizante (*Luteinizing Hormone, LH*) como medio base y suplementaron cisteamina (*Cysteamine, Cys*) y factor inhibidor de la leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor, LIF*), para mejorar la MIV, obteniendo que entre el 17 y 62% de ovocitos de cobayas que llegaron a metafase II; sin embargo, este mismo autor concluye que se debe profundizar en el medio de maduración.

Se ha descrito en porcinos que la adición de líquido folicular en el medio de MIV mejoró la redistribución de mitocondrias activas (Brevini et al., 2005). Además, la suplementación de líquido folicular en humanos al 10% (Zhu et al., 2008) y bovinos al 1%, 5% y 10% (Ali et al., 2004) ha favorecido la MIV en los ovocitos extraídos. A nuestro entender no existen estudios que indiquen la suplementación de líquido folicular de cobaya en un medio de maduración a base de TCM-199, con la finalidad de mejorar el porcentaje de la MIV, ya que esta fuente proteica contiene hormonas como *FSH, LH*, factores de crecimiento que favorecen el proceso de maduración fisiológico (Somfai et al., 2012). Por lo tanto, en base a estos antecedentes surgió la hipótesis de que la adición de líquido folicular (5%, 10% y 20%) de cobaya en celo en el medio MIV podría influir en el proceso de maduración nuclear del ovocito.

## Objetivo

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes porcentajes de líquido folicular de cobaya (*cavia porcellus*) en celo como suplemento a un medio de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya provenientes de ovarios de matadero.

### 2.2 Objetivos específicos

- Validar un protocolo para la obtención de líquido folicular de cobaya en celo.
- Valorar el efecto de tres porcentajes (5%, 10%, 20%) de líquido folicular de cobaya en celo en la maduración *in vitro* de ovocitos de la misma especie.

## Revisión de literatura

### 3.1. Origen del cobayo

La primera evidencia arqueológica de la existencia del cobayo (*cavia porcellus*) fue encontrada en Perú y Colombia hace 9000 años, y el animal ha sido domesticado para su alimentación y usos espirituales aproximadamente desde 4500–7000 años (Wing, 1986). Es un mamífero roedor originario de la Cordillera de los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, donde ha tenido una buena relación con el pueblo preincaico, en los que se ha usado como animal vinculado a tradiciones que se mantienen hasta la actualidad; además, de que su carne es una fuente de alta proteína y con un bajo contenido de grasa. (Avilés et al., 2014).

### 3.2 Morfología del aparato reproductor de la hembra cobaya

Los órganos reproductivos de la hembra consisten en los ovarios, oviductos, útero, vagina y vulva.

#### 3.2.1 Vulva

La vulva de la cobaya tiene una abertura externa en forma de Y invertida, la cual puede observarse en la parte externa; en su parte interna y ventral está el meato urinario (Solís & Chávez, 2015) y dorsalmente se encuentra el clítoris, el cual está ubicado dentro de una pequeña fosa en la porción caudal de la vagina (Wagner et al., 1976).

#### 3.2.2 Vagina

Está ubicada en la parte caudal del piso pélvico y se curva ventralmente alrededor del arco isquiático, en donde se abre y se comunica externamente con el orificio vaginal; tiene un diámetro exterior menor al del cuello uterino, con paredes más delgadas (Wagner et al., 1976); la vagina tiene una característica única que es la de presentar una membrana de cierre vaginal, que esta perforada solamente en el estro y el parto (Clemons & Seeman, 2011).

#### 3.2.3 Útero

Esta especie presenta un útero bicornes de color rosado, en forma de Y, estructurado por dos cuernos, un cuerpo y un cuello uterino (Clemons & Seeman, 2011). El cuerpo uterino mide 12 mm de longitud y 10 mm de diámetro, y va disminuyendo de craneal a caudal, presenta un ligamento intercornual bien desarrollado. Los cuernos uterinos se unen a los cuellos uterinos los cuales presentan una serie de pequeñas crestas mucosas que se dirigen caudo-medialmente por sus paredes laterales hasta la línea media ventral, mide 25 mm de largo y 14 mm de diámetro cranealmente y 5 mm de diámetro en su extremo dorsal (Wagner et al.,

1976). Se denomina endometrio a estas crestas mucosas que se encargan de secretar sustancias que nutren al huevo o cigoto (Solís & Chávez, 2015).

#### 3.2.4 Oviducto

El oviducto encuentra caudal al ovario y se unen al cuerno uterino, pasa oblicuamente a través de la pared uterina. Se divide en tres porciones: porción infundibular la cual está cerca del ovario, porción del istmo y una porción intramural la cual penetra la pared uterina (Wagner et al., 1976). La función de estos es transporta el ovulo hasta el cuerno uterino, es aquí en donde se realiza la fecundación de los óvulos (Solís & Chávez, 2015).

#### 3.2.5 Ovarios

Los ovarios son órganos amarillentos, con un aspecto que va de liso a nodular dependiendo de la etapa reproductiva en la que se encuentre la cobaya (Clemons & Seeman, 2011). Se encuentran caudal y lateral a los riñones, sostenidos por un mesovario corto. Cada ovario mide aproximadamente de 6 a 8 mm de largo y 4 a 5 mm de diámetro. En cada ciclo reproductivo que dura de 16 a 17 días, se puede observar macroscópicamente los cuerpos lúteos como estructuras rosadas en el ovario, que al décimo día se van desvaneciendo (Wagner et al., 1976).

### 3.3 Fisiología reproductiva de la cobaya

El cobayo es particularmente adecuado para estudios de fisiología reproductiva debido a su fácil manejo, signos distintivos de celo y comportamiento relacionado claramente con cambios físicos en el tracto reproductivo (Young et al., 1935). De todos los pequeños mamíferos de laboratorio, el sistema reproductivo del cobayo se parece más al humano, debido a que tiene un ciclo largo, ovula espontáneamente, y tiene un cuerpo lúteo secretor activamente (Reed & Hounslow, 1971). En condiciones de laboratorio, los cobayos domésticos son reproductores poliéstricos, no estacionales, aunque se han informado ligeras variaciones estacionales en el comportamiento reproductivo (Wagner et al., 1976).

### 3.4 Pubertad

Las hembras alcanzan la pubertad entre los 55 y 70 días de edad; sin embargo, este rango podría ser menor dependiendo de la alimentación, la cual debe ser de alta calidad, por lo tanto, una alimentación inadecuada podría retardar la aparición de la pubertad (Solís & Chávez, 2015). El peso corporal en la pubertad es un parámetro más constante que la edad, debido a que existe relación entre la tasa de crecimiento y el momento de la pubertad, lo que indica

que existe una interacción entre los centros hipotalámicos que controlan el crecimiento y el inicio de la ciclicidad reproductiva (Mills & May, 1971).

### 3.5 Ciclo estral de la cobaya

El ciclo estral normal en la cobaya tiene una duración media de  $16,1 \pm 0,2$  días con un rango de 13 a 22 días (Shi et al., 2000). El proestro dura 1-1,5 días, estro de 8 a 24 horas, metaestro 1-1,5 días y diestro de 13 a 15 días (Kuhne & Mendoza, 1992).

### 3.6 Desarrollo, crecimiento y maduración de ovocitos *in vivo*

#### 3.6.1 Ovogénesis y foliculogénesis

La ovogénesis es el proceso de formación de nuevas células germinales (Plates, 1964), que ocurre durante el desarrollo fetal mediante un proceso de diferenciación que sufren las células germinales del ovario, las cuales se transforman en ovogonias mediante varias divisiones mitóticas que, al iniciar la primera división meiótica, darán lugar a ovocitos primarios (Solís & Chávez, 2015).

La ovogénesis dura alrededor de 50 días donde pasan por diferentes etapas, las cuáles son: leptoteno que se da a los 35 días, cigoteno a los 40 días y paquiteno a los 50 días. Las células germinales primero migran a las crestas genitales en donde se da la ovogénesis, que después de sufrir varias divisiones mitóticas, entran en la profase de la meiosis y cuando estas células ya han pasado por la profase, se convierten en ovocitos. El número de células germinales del ovario aumenta entre los 30 a 41 días posteriormente estos se reducen a los 12 meses, esto ocurre debido a que existe un proceso constante de atresia que afecta las células germinales en las primeras etapas del desarrollo (Plates, 1964).

La foliculogénesis de la cobaya es similar a la foliculogénesis humana. Durante la vida fetal, se forman la mayoría de los folículos primordiales e inmediatamente varios de ellos inician su crecimiento y desarrollo en folículos de múltiples capas. Al nacer y dos días después, se logran observar algunos folículos antrales (Bookhout, 1945).

El desarrollo de los folículos ocurre en dos oleadas en las cobayas, los folículos más grandes de la primera ola alcanzan su diámetro máximo entre los días 10-11 del ciclo, experimentando atresia debido a la supresión de *LH* por retroalimentación negativa de la progesterona del cuerpo lúteo. La segunda ola inicia al día 12 del ciclo, se produce el reclutamiento y la selección de los folículos más grandes alrededor del día 13. A menudo se seleccionan de tres

a cinco folículos ovulatorios ocurriendo la ovulación al final de la segunda ola día 17 del ciclo (Sadeu et al., 2007).

### 3.6.2 Fases del desarrollo folicular

#### 3.6.2.1 Folículos primordiales.

Al nacer, una capa de células foliculares rodea a los ovocitos primarios, formando una monocapa de células planas foliculares denominadas pre-granulosa (Pino, 2015). Al mismo tiempo, a medida que toman forma los folículos primordiales, las células pre-granulosas dejan de dividirse y entran en un periodo de inactividad. Los ovocitos de los folículos primordiales quiescentes permanecen detenidos en diploteno; no se reanuda hasta que el folículo empiece a crecer y posteriormente sea reclutado o atrofie (Hirshfield, 1991). Esta reserva de folículos primordiales se forma en la vida fetal o neonatal temprano dependiendo la especie (Fortune, 1994).

#### 3.6.2.2 Folículos primarios.

Una vez activado el desarrollo de los folículos primordiales, estos pasan a ser primarios cuando la capa de células foliculares en forma cubica o cilíndrica, con núcleos ovales, esta monocapa se conforma desde 14 a 41 células; también aumenta el tamaño del ovocito (Sadeu et al., 2007).

#### 3.6.2.3 Folículos secundarios o pre-antrales

Formado por varias capas de células de la granulosa, algunas de estas capas comienzan a diferenciarse en la teca interna y externa (Williams & Erickson, 2012). Se caracteriza por desarrollar la zona pelúcida, formada por secreciones de las células de la granulosa cercanas al ovocito, a medida que crece el folículo se va formando pequeñas fisuras llenas de líquido formando un antro folicular (Pino, 2015)

#### 3.6.2.4 Folículos terciarios o antrales.

En esta etapa el folículo terciario o de Graff crece drásticamente por la formación del antro, conteniendo líquido folicular (Mora, 2015). Las células de la granulosa rodean que rodean al ovocito pasan a ser cilíndricas y se disponen radialmente, formando a la corona radiada, que está separada del ovocito por la zona pelúcida. Al finalizar esta fase los folículos son llamados folículos maduros (Pino, 2015).

### 3.6.3 Dinámica Folicular de las cobayas

La dinámica folicular es regulada por señales endocrinas (gonadotropinas y esteroides), hormonas peptídicas producidas localmente en los ovarios y por algunos factores de crecimiento; es el proceso de crecimiento continuo y la regresión de folículos antrales que conducen el desarrollo del folículo preovulatorio (Espinoza et al., 2007). En las cobayas se desarrolla en dos ondas foliculares, siendo una relación armónica y simultánea de folículos antrales, que están atravesando estadios de reclutamiento y dominancia folicular, la primera onda folicular culmina en el día 10 a 11 y la segunda onda termina en ovulación (Bland, 1980).

Los folículos pequeños y medianos alcanzan su crecimiento máximo a los 6 – 7 días; aumentando las células de la granulosa 6-7 veces más, la cohorte da lugar entre 2 a 6 folículos preovulatorios y folículos grandes que sufrirán atresia; la apoptosis comienza en las células de la granulosa de los folículos grandes (Logothetopoulos et al., 1995)

## 3.7 Biotécnicas reproductivas utilizadas en la cobaya

### 3.7.1 Sincronización del celo

El control del ciclo estral de la hembra permite obtener embriones en etapa de mórula o de blastocisto temprano y también preparar receptoras sincrónicas para la transferencia de embriones (Grégoire et al., 2012). También se sincroniza el celo en animales en los que se realizará inseminación artificial, por lo tanto, es importante disponer de métodos con lo que sea posible una sincronización segura y una ovulación en menor tiempo posible y en un momento más o menos predecible (Palma, 2001).

#### 3.7.1.1 Sustancias utilizadas en la sincronización del celo

Existen varios métodos en los que se utilizan directamente hormonas o productos sintéticos, que cumplen funciones similares a las hormonas que controlan normalmente el ciclo sexual de los animales. Se ha utilizado la progesterona natural mediante la aplicación de inyecciones intramusculares repetidas esto debido a que tiene una vida media de 3 a 4 minutos, por lo que se degrada rápidamente en el organismo del animal (Caravaca et al., 2005).

Un fármaco de este grupo es el altrenogest el cual es seguro y eficaz, respeta el bienestar animal en cobayos, y consiste en un tratamiento de 15 días con 0,22mg/kg por vía oral, induciendo la ovulación en 4 a 5 días (Grégoire et al., 2012). También se ha utilizado la gonadotropina coriónica equina en un momento específico del ciclo sexual, la cual induce la SOV en cobayos cuyo ciclo sexual está sincronizado por la implantación a largo plazo de progesterona (Kosaka & Takahashi, 1989).

Otro método es la utilización de sustancias luteolíticas como son las prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), las cuales se producen en el endometrio y provocan la luteólisis; por lo tanto, la ovulación y la aparición del celo, también se utilizan los estrógenos como el benzoato de estradiol, el cual estimula la secreción uterina de prostaglandinas y así mismo tiene una acción antiluteotrópica, la cual inhibe el desarrollo de cuerpos lúteos (Caravaca et al., 2005). Se ha utilizado  $PGF_{2\alpha}$  en cobayas con la aplicación de 0,02mg, para la presentación de celo de forma rápida, lo cual permite asegurar una reproducción inmediata (Echeverría, 2013).

### 3.7.2 Maduración *in vitro* del complejo cúmulos ovocitos (COC's)

En el desarrollo fetal de los mamíferos, los ovocitos están detenidos en el dictioteno de la primera división meiótica, estos ovocitos detenidos se denominan ovocitos primarios, caracterizándose por poseer un núcleo grande denominado vesícula germinal (VG), que contiene la cromatina descondensada (Downs, 1993). La maduración *in vitro* implica la transformación de un ovocito detenido en metafase II, altamente polarizado y un pequeño cuerpo polar que consigue la haploidía que a su vez retienen los componentes maternos, donde consiste en la división asimétrica de ovocitos mediante la polarización (Maro & Verlhac, 2002). Dentro de la maduración, los ovocitos se desarrollan a través de varios cambios a nivel del núcleo y citoplasma hasta la etapa de blastocisto, en donde las tasas de blastocistos obtenidos están directamente relacionadas con el diámetro del folículo del que se recuperan los ovocitos, esta técnica reproductiva es clave, para lograr una eficiencia en los programas de producción de embriones *in vitro* (Presicce, 2020).

En la cobaya la maduración *in vitro* se ha desarrollado mediante la aplicación de medios de cultivo que pretenden alcanzar con éxito la MIV. En donde se han identificado que la maduración *in vitro* en cobayas podría estar relacionado con la edad, la cual mejora en ovocitos recolectados de cobayas de 2 meses de edad (Wang et al., 2019).

Un factor que resultará en el poco éxito de maduración *in vitro* es la selección de ovocitos meióticamente incompetentes (Fujii et al., 2000). Se considerada parámetros indicadores de competencia meiótica a la apariencia morfológica de los ovocitos, las células del cúmulo y el diámetro del ovocito (Nickson et al., 1993).

#### 3.7.2.1 Técnicas de obtención de ovocitos

Para la evaluación de la morfología y la configuración nuclear de los ovocitos se han examinado dos técnicas de recuperación de ovocitos en equinos, la aspiración de folículos y *slicing*, en donde se ha descrito que la técnica de *slicing* ha generado tasas de recuperación

más altas que la aspiración folicular siendo esta, una alternativa eficaz para recuperar un elevado número de ovocitos (Dell'aquila et al., 1997).

Sin embargo, se debe tener en cuenta las diferencias entre especies al momento de realizar la elección de la técnica de recuperación de ovocitos. Además, se ha evaluado el efecto de las técnicas de recuperación de ovocitos sobre la maduración *in vitro* y la calidad de los ovocitos; se ha determinado que la técnica de *slicing* produce más ovocitos por ovario, pero de menor calidad para la maduración *in vitro* (Wahid et al., 1992).

#### 3.7.2.2 Medios de maduración utilizados en cobayos.

Existen varios medios de suplemento que se han utilizado para mejorar las tasas de maduración *in vitro*, como el estudio en el que se determinó que el medio de maduración con Cys y el LIF, mejora la eficiencia de maduración de los ovocitos de cobaya (Wang et al., 2019).

Otro estudio concluye que la combinación de 50ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor, EGF*), y 10% de suero de ternero fetal (*Fetal Calf Serum, FCS*), resultaron ser un medio adecuado para el sistema de maduración *in vitro* en ovocitos de cobaya (Cañón-Beltrán et al., 2016).

#### 3.7.2.3 TCM 199

El medio de maduración TCM199 se ha utilizado para la evaluación de diversos estudios en diferentes especies, debido a que posee características antioxidantes protegiendo al ovocito del efecto de los radicales libres (Bilodeau et al., 2001); por lo tanto, se ha comparado la eficacia de varios medios de maduración y se ha identificado que el TCM199 actuando solo, no logra desarrollar una buena capacidad de maduración para la posterior fertilización (Vargas et al., 2021), de modo que, este medio de maduración es utilizado con más suplementos que ayudan a mejorar el microambiente de los ovocitos, como es el líquido folicular (Sena et al., 2019), suero fetal bovino (Das et al., 1996), suero de vaca en estro (Kim et al., 1989) y también se ha establecido como medio base en la maduración y fertilización *in vitro*.

El líquido folicular puede ser usado como suplemento natural equivalente al SFB en medios de maduración *in vitro* para ovocitos de alpaca (Milagros Tania, 2018). La adición del 10% de LF al medio de maduración de ovocitos puede sustituir la inclusión de hormonas en la producción *in vitro* de embriones bovino (Limache Tito, 2015). No existe investigaciones del uso del líquido folicular como medio de maduración *in vitro* en ovocitos de cobayas.

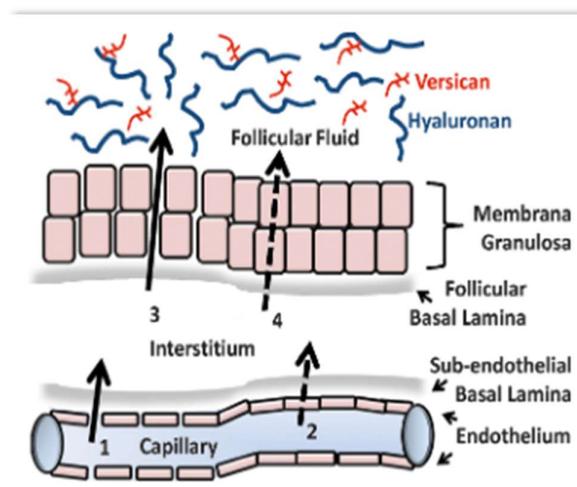
### 3.8 Criterios de clasificación de ovocitos en cobayas

Para conseguir una maduración *in vitro* efectiva, es importante considerar la clasificación de ovocitos óptimos, mediante criterios específicos que debe cumplir la célula ovocitaria. Se inicia con la obtención de ovarios de cobayas, seguido de la aplicación de un protocolo que garantice la viabilidad de los ovocitos obtenidos por la técnica de aspiración o *slicing*. Se continúa con la clasificación, la cual Wang et al., (2019), categorizó en 3 tipos en ovocitos: los tipos I, con 4 o más capas de células del cúmulo, tipo II con 1 a 3 capas de células del cúmulo y los tipos III con algunas células de cúmulo o desnudos. Así mismo Ayala et al., (2019) clasificaron a los ovocitos en aptos y no aptos basándose en las características morfológicas de las células del cúmulo y del citoplasma del ovocito, agrupándolos en categorías A y B para los aptos y categoría C para no aptos.

### 3.9 Líquido Folicular

#### 3.9.1 Formación del líquido folicular.

Durante el desarrollo de los folículos, hay propagación de las células de la teca, células de la granulosa que van formando el antro folicular, este es un espacio lleno de líquido que se forma entre las células de la granulosa (Roche, 1996). En el folículo ovárico, no hay drenaje del líquido folicular, por lo que se acumula aumentando el volumen del antro, se forma al aumentar la vascularización de la teca, por el aumento de la presión de la sangre y el aumento del flujo de los capilares cercanos a la teca (**Figura 1**) (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010).



**Figura 1:** Rutas que puede tomar el LF. Desde la teca capilar al líquido folicular y las posibles barreras: endotelio, lamina basal, subendotelio, intersticio y membrana de la granulosa. Las rutas 1 y 3 es el movimiento del líquido entre las células (flechas continuas), y las rutas 2 y 4 muestran las rutas transcelulares (flechas punteadas) (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010).

### 3.9.2 Composición del líquido folicular

El líquido folicular contiene todas las materias primas, como los iones esenciales y una fuente de energía para el crecimiento celular. También, contiene componentes específicos como las hormonas esteroideas que son secretados de las células de la granulosa; por consiguiente, contiene factores de crecimiento, hormonas y diversos nutrientes, este líquido proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento y maduración del ovocito durante el crecimiento folicular (**Tabla 1**) (Zahra et al., 2021).

	<b>Componentes</b>	<b>Ref.</b>
Electrolitos	Na, K, Cl, HCO <sub>3</sub> , PO <sub>4</sub> , Mg y Ca.	Iwata et al. (2004) Leroy et al. (2004) McDowall (2004)
Carbohidratos	Glucosa, Piruvato, Lactato.	Matoba et al. (2014) Orsi, Gopichandran, Leese, Picton, & Harris (2005) McDowall (2004)
Ácidos grasos	Mirístico, Pentadecanoico, Palmitoleico, Palmitoleico Palmítico, Oleico y Linoleico, Esteárico Heptanoico, Heptadecanoico, Araquidónico.	Matoba et al. (2014) Leroy et al. (2004)
Aminoácidos	Alanina, Valina, Leucina, Prolina, Glicina, Serina, Treonina, Glutamina, Metionina, Aspartato, Cisteína, Fenilalanina, Glutamato, Arginina, Lisina y Tirosina.	Matoba et al. (2014) Orsi, Gopichandran, Leese, Picton, & Harris (2005)

Proteínas	Prealbúmina, Albumina, Gc-globulina, IgG, IgM, $\alpha$ 1-lipoproteína, $\beta$ 2-glicoproteína y $\alpha$ 2-macroglobulina.	Anderson, Kroll, Byskov, & Faber (1976) Leroy et al. (2004)
Metabolitos	Urea	Matoba et al. (2014)

**Tabla 1:** Componentes no hormonales. Adaptado de (Limache Tito, 2015).

### 3.9.3 Líquido folicular como suplemento en la maduración *in vitro*.

Se han realizado varios estudios que incluyen al líquido folicular como suplemento para la maduración *in vitro* en varias especies, como en la especie bovina, en la que se estudia el efecto de líquido folicular bovino en la expansión de las CC, en el cual existe una tasa de expansión más alta para la MIV (Sena et al., 2019). Además, al ser una sustancia con altos componentes bioactivos que podrían apoyar el proceso de maduración, en la yegua se ha analizado el efecto de las vesículas extracelulares del líquido folicular de ovarios pequeños y se sugiere que podrían cumplir un papel importante para mejorar la tasa de MIV (Gabrys et al., 2022).

El líquido folicular se ha usado junto con varios medios de maduración como el TCM 199, como medio base; en la especie canina se evaluó el efecto de LF al 20% y 10%, y suero al 30% y 40% en medio base TCM 199, y se concluyó que el tratamiento con mejor efecto fue al 10% de líquido folicular y 40% de suero, generando una influencia positiva en la MIV en ovocitos caninos (Hu et al., 2020). Así mismo, en busca de mejorar la MIV y fecundación *in vitro* (FIV) en bovinos se realizó una evaluación de líquido folicular bovino al 10, 30 y 60%, en un medio base TCM 199, y se logró identificar que al suplementar líquido folicular de folículos pequeños en un medio de maduración base con estradiol puede generar una maduración completa de los ovocitos por lo tanto eso sugiere una mejora en la producción de embriones *in vitro* (K. Kim et al., 1995).

## Materiales y Métodos

### 4.1 Materiales

#### a) Materiales Biológicos

- Cobayas
- Ovarios
- Ovocitos
- Altrenogest (Regumate®, MSD, España)
- Líquido folicular
- Factor Inhibidor de la Leucemia (L5158-5UG)

#### b) Materiales Químicos

- Esmalte de uñas
- Alcohol 70%
- Agua destilada
- Jabón líquido
- Gentamicina
- Lactato de Ringer + polivinilalcohol (PVA 0.1%)
- Hialuronidasa
- Medio de maduración
- Medio de montaje
- Glicerol (Sigma G – 5150)
- Glutaraldehído 25% (Sigma B – 5882)
- Hoechst 33342 (Sigma B – 2261)
- TCM – 199 (Sigma M – 4530)
- NaHCO<sub>3</sub> (Sigma S- 5761)
- Hepes (Sigma H – 6147)
- Glutamina (Sigma G – 8540)
- Penicilina (Sigma P – 3032)
- Estreptomina (Sigma S – 9137)

c) Materiales Físicos

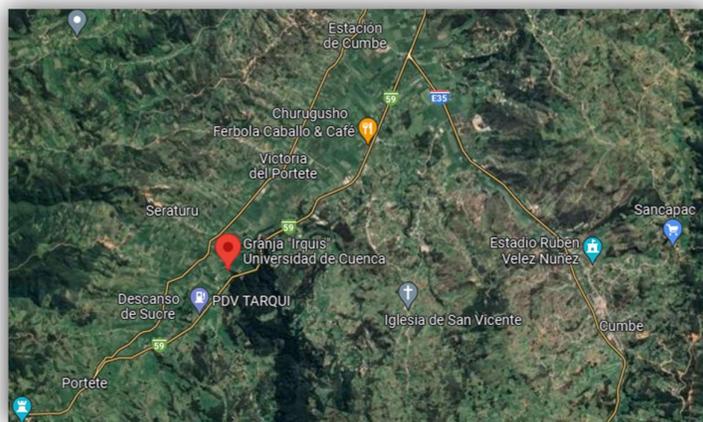
- Termo de acero inoxidable (transportador de ovarios)
- Termómetro de superficies
- Cuadernillo de maniobras
- Marcadores permanentes punta fina
- Regla
- Computadora

d) Materiales de Laboratorio

- Mandil
- Zapatones
- Cubrebocas
- Equipo de disección
- Guantes de nitrilo
- Jeringas de 1 ml (27G), 10 ml (22G), 20ml (21G)
- Bisturí #11
- Baño María
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Puntas de pipeta variables
- Cajas Petri 35mm
- Cajas monopetri 90 x 15mm
- Placas de búsqueda 100mm
- Tubos cónicos de 1,5ml y 15ml
- Estereoscopios (SMZ745, Nikon – Japón)
- Micropipetas de volumen variable (1 a 20  $\mu$ l, 20 a 200  $\mu$ l y 100 a 1000  $\mu$ l)
- Microscopio de Epifluorescencia (Eclipse Ci-E epi-fluorescence set, Nikon – Japón)
- Caja para portaobjetos
- Centrifuga
- Estufa de cultivo Trigas
- Platina térmica
- Cabina de flujo lamina

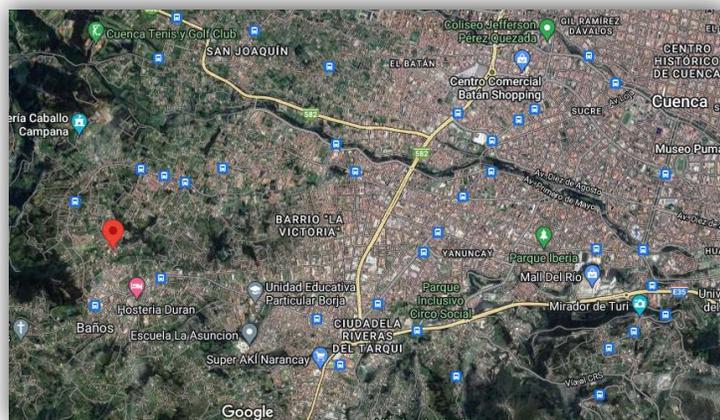
## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Área de Estudio



**Figura 2:** Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología; en la granja de Iruquis parroquia Victoria del Portete.

**Fuente:** Google Maps 2023.



**Figura 3:** Ubicación satelital de la granja comercial “MATUTE”, parroquia Baños.

**Fuente:** Google Maps 2023.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca, ubicado en la Granja de Iruis, área que se encuentra en la parroquia Victoria del Porte, cantón Cuenca, provincia del Azuay, país Ecuador. A 20 km de la ciudad de Cuenca, coordenadas Latitud sur: 4'48.34"S y Longitud Oeste 79° 4'30.12"O (**Figura 2**). La granja Iruis se encuentra ubicada a una altitud de 2671 m s.n.m., donde predomina una temperatura media de 12 ° C.

La sincronización de cobayas se llevó a cabo en la granja comercial "MATUTE", ubicado en el barrio Paraíso, parroquia Baños, cantón Cuenca, provincia del Azuay, país Ecuador coordenadas Latitud sur: 2°54'54.2"S y Longitud Oeste: 79°03'51.2"O (**Figura 3**). La cual se encuentra a una altitud media de 2694 m s.n.m., y con una temperatura promedio de 14 °C.

#### 4.2.2 Unidad experimental.

Inicialmente, se sincronizó el celo de 10 cobayas mestizas, con edad entre 4-6 meses de edad, con un peso entre 1000-1200 g., multíparas (**Anexo C**). De estos animales se recuperaron los ovarios para luego aspirar el líquido folicular.

Para la segunda etapa del estudio, se recolectaron ovarios de cobayas del centro de faenamiento Peñalosa – Jaramillo, ubicado en la ciudad de Cuenca, de cada ovario se recolectaron los COC's mediante la técnica de *slicing*, estos fueron seleccionados y clasificados de acuerdo con la metodología descrita por Wang et al., (2019). Para luego ser colocados en un medio de maduración *in vitro*.

#### 4.2.3 Diseño experimental

- Ensayo 1: Desarrollo del protocolo de obtención del LF, experimento descriptivo.
- Ensayo 2: Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo bifactorial de los tipos de COC's y tratamientos (control, 5%, 10% y 20%), en el que se evaluó el efecto de la adición del líquido folicular en el medio convencional (TCM199) de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya.
- Variables Independientes:
  - Control y porcentaje de LF (5, 10 y 20%)
  - Tipos de COC's (A; B; C)
- Variables Dependientes:
  - Porcentaje de maduración morfológica de las células del cúmulo al finalizar el período de maduración.
  - Porcentaje de ovocitos en metafase II al finalizar el período de maduración.

**Tipos y número de COC's de cobaya**

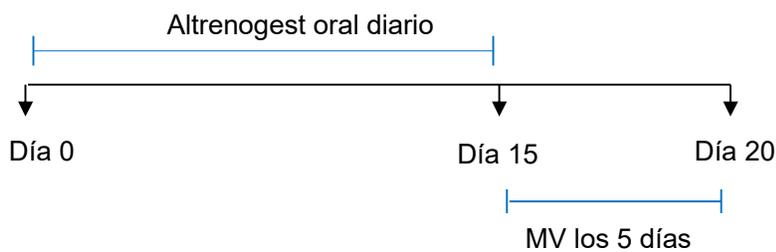
	Tipo A	Tipo B	Tipo C
T0 (control)	n	n	n
T1 (5%)	n	n	n
T2 (10%)	n	n	n
T3 (20%)	n	n	n

**Tabla 2:** Proyección gráfica de los tratamientos aplicados y el número de COC's en cada uno. n= 100 COC's.

**4.3 Metodología**

4.3.1 Sincronización del celo de las cobayas

El protocolo de sincronización de celo en cobayas se realizó mediante la aplicación de un progestágeno sintético, cuyo principio activo es Altrenogest (Regumate®, MSD Animal Health, Francia). Se utilizó dosis de 0,22 mg/Kg de peso vivo durante 15 días consecutivos por vía oral, y se revisó la membrana vaginal (MV) los 5 días posteriores al retiro de la progesterona, según la metodología aplicada por Grégoire et al., (2012) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Protocolo de sincronización del ciclo estral de las cobayas con altrenogest. Día 0= Inicio del protocolo, aplicación oral de progesterona sintética hasta el día 15; se revisó la membrana vaginal diariamente los 5 días posteriores al retiro de la hormona.

Brevemente, en el día 0 se administró la progesterona vía oral (**Anexo A**); este proceso se repitió a la misma hora hasta el día 15, a partir del día 16 se observó dos veces al día la membrana vaginal (08h00 y 18h00), cuando la MV presentó un 50% de apertura se consideró a la cobaya en celo. Para el monitoreo diario de los cambios en la MV se siguió la metodología descrita por Wilson et al., (2021) que 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 registró si la membrana estaba “cerrada” o “abierta”; esta observación la repetimos diariamente por la mañana aproximadamente a la misma hora del día (ej. 8am -10am) al igual que por las tardes (ej. 4pm), hasta observar la membrana vaginal perforada, al visualizar la apertura de la membrana vaginal perforada se registró la fecha y la hora. (**Figura 5**).



**Figura 5:** Apertura de la membrana vaginal. Panel 1: MV= membrana vaginal cerrada 0%. Panel 2: membrana vaginal semi abierta 50%. Panel 3: membrana vaginal abierta 100%.

#### 4.3.2 Recolección de los ovarios de cobaya.

Los ovarios fueron recogidos del Centro de Faenamiento Peñaloza Jaramillo habilitado oficialmente con logotipo “MABIO” (Matadero bajo inspección oficial) ubicado en el cantón Cuenca. Los ovarios se trasladaron en solución salina de NaCl (0,9%) a temperatura de 35°C hasta el laboratorio, en un tiempo no mayor a dos horas.

#### 4.3.3 Preparación de los ovarios de cobaya.

En el laboratorio se retiraron los tejidos anexos que se hayan encontrado en los ovarios, fueron lavados 3 veces en solución fisiológica a una temperatura de 35°C hasta quedar totalmente limpios y se los mantuvo en la platina térmica hasta su procesamiento alrededor de 5min.

#### 4.3.4 Obtención de COC's de los ovarios de cobaya

Para la colecta de los COC's se utilizó la técnica de *slicing*, descrita por Solís & Chávez, (2015), con ciertas modificaciones hechas en nuestro estudio. Una vez que los ovarios se

colocaron en la caja cuadrículada de 100 mm, se agregó 1 ml de lactato suplementado con Polivinilalcohol. Posteriormente, se realizaron cortes longitudinales y transversales a cada lado del ovario, al finalizar la técnica los ovarios fueron lavados con 5ml del medio de manipulación en la misma caja de búsqueda; a continuación, fueron retirados los restos de ovarios dejando los COC's listos para su selección y clasificación.

#### 4.3.5 Clasificación de COC's de cobaya

La valoración de los COC's se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (SMZ 745, Nikon, Japón). El criterio de clasificación de los COC's se basó en aspectos morfológicos de las células del cúmulo, homogeneidad del citoplasma del ovocito e integridad de la zona pelúcida, tal como lo describió Wang et al., (2019) con ciertas modificaciones. Brevemente, los ovocitos fueron clasificados en 3 categorías:

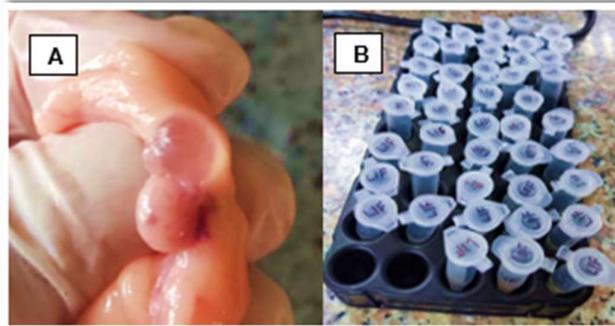
- ❖ Tipo A: ovocitos que tenían cuatro o más capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo y zona pelúcida integra.
- ❖ Tipo B: ovocitos con una a tres capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo y zona pelúcida integra.
- ❖ Tipo C: ovocitos desnudos o que poseían pocas células del cúmulo adheridas a la zona pelúcida, tenían forma de medialuna y/o citoplasma irregular y oscuros.

Los COC's seleccionados fueron lavados dos veces en el medio de manipulación y colocados en el medio de maduración *in vitro* (**Anexo J**).

Algo importante a considerar, desde el inicio del *slicing* hasta la colocación de los COC's en el medio de maduración, transcurrió un tiempo máximo de **60 minutos**, ya que pasado dicho tiempo los COC's comienzan a deteriorarse.

#### 4.3.6 Recolección del Líquido Folicular de cobaya.

Una vez verificado que la cobaya estaba en celo, estas fueron sacrificadas siguiendo la metodología establecida en el manual S.E.A Animalario OMG, (2005), que consiste en la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis triplicada 100-150 mg/kg (Penta-Hypnol®, Agrovvetmarket, Perú). Luego fueron recuperados los ovarios y se procedió a aspirar los folículos >1 mm de diámetro, obteniendo 200 µl de líquido folicular de cobaya en celo (**Figura 6; Panel A**), a continuación, fueron almacenados en los tubos cónicos de 1,5ml y transportados al laboratorio de biotecnología a una temperatura de 38°C. (**Figura 6; Panel B**).



**Figura 6:** A= Ovario de cobaya con un folículo >5mm;  
B= Alícuotas de 0,1ml de líquido folicular almacenadas  
en tubos cónicos de 1,5ml.

#### 4.3.7 Adición del LF al medio de MIV de los COC's de cobaya.

El medio convencional era el propuesto por Sena et al., (2019) con ciertas variaciones, el cual consistieron en TCM-199 (con sales de Earle's) suplementado con 26,2 mM de bicarbonato de sodio, 0,2 mM de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 10 IU/ml de ECG, 10UI de hCG, 100 µM de Cisteamina (Sigma M-9768) y 1000 IU/ml de factor inhibidor de la leucemia (Sigma L-5158), al cual se le adicionaba el líquido folicular en concentraciones de 5%, 10% y 20% dependiendo el tratamiento a utilizar. La maduración *in vitro* se realizaba por 24 horas bajo condiciones de cultivo controladas (93% de humedad, 5% CO<sub>2</sub>, 38.8 °C).

#### 4.3.8 Evaluación de la maduración *in vitro* de los COC's de cobaya

Después de la MIV los COC's fueron evaluados mediante estereomicroscopia, observando si existía o no expansión de las células del cúmulo, según lo determinado por Machado et al., (2015); la clasificación del 1 al 3 se basó en el grado creciente de expansión de las células del cúmulo (**Figura 7**); así:

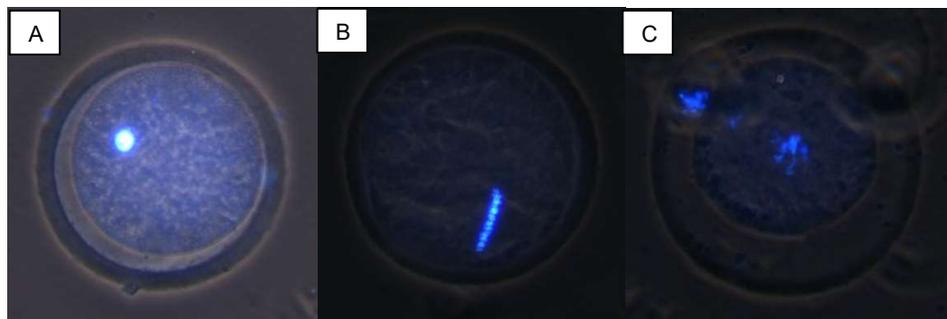
- a) 1= expansión moderada, la cual fue caracterizada por pocos cambios morfológicos
- b) 2= expansión parcial
- c) 3= expansión completa o casi completa



**Figura 7:** Ovocitos post maduración *in vitro* suplementados con el 10% de líquido folicular, A= ovocitos tipo A; B= ovocitos tipo B; C= ovocitos tipo C.

Para la determinación del estado de maduración nuclear (**Figura 8**), se usó el protocolo propuesto por Sena et al., (2019). Los COC's de cada tratamiento fueron desnudados mediante pipeteo con hialuronidasa como medio, luego los COC's fueron incubados en glutaraldehído (0,5% de DPBS) por 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente se lavaron en DPBS por 5 minutos y se tiñeron con el fluorocromo Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma B-2261) por 15 minutos en un cuarto oscuro (**Anexo N**).

El medio de montaje usado fue DPBS con glicerol y Hoechst (1:1:0.001) y las preparaciones fueron selladas con esmalte de uñas para su preservación. La evaluación se realizó mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse Ci-E Epifluorescence set, Japón) a una longitud de onda de 405 nm bajo magnificaciones de 200X y 400X.



**Figura 8:** Maduración nuclear con adición del LF al 10%. A= vesícula germinal; B= placa metafásica; C= metafase II con corpúsculo polar.

#### 4.3.9 Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se ejecutó mediante el programa estadístico InfoStat. La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de

Kolmogorov Smirnov, resultando que los **datos mostraron normalidad**. El efecto del porcentaje de líquido folicular en el medio de maduración *in vitro* y del tipo el COC´s sobre la expansión de las células del cúmulo pos-maduración y la proporción de ovocitos con núcleo en metafase II, se analizó mediante análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5%.

## Resultados y Discusión

### 5.1 Protocolo de obtención de líquido folicular de cobaya en celo

A continuación, se detalla el procedimiento:

Selección de cobayas, edad entre 4-6 meses, peso entre 1000-1200 gramos, multíparas.

1. Sincronización del celo, con progesterona vía oral (Regumate®, MSD Animal Health, Francia) en dosis de 0,22 mg/Kg de peso vivo durante 15 días consecutivos.
2. Determinación del celo, mediante la observación de la membrana vaginal (apertura 50%), post - retiro de la progesterona (día 16; **Figura 5**).
3. Recuperación de los ovarios de cobayas en celo.
4. Aspiración del líquido (LF) de folículos mayores a 5mm, mediante el uso de una jeringa de insulina de 1ml con aguja 27G (**Anexo A**).
5. Proceso de centrifugación del LF a 3.000 rpm, 20 minutos.
6. Recuperación del sobrenadante después del proceso de centrifugación en tubos cónicos de 1,5ml.
7. Almacenamiento del LF en alícuotas de 100µl en tubos cónicos de 1,5ml a -20°C
8. Inactivación del LF a 56°C durante 30 minutos.
9. Adición de LF (5%, 10%, 20%) al medio de maduración convencional (igualado a 1000µl).
10. Filtrado mediante poro de membranas de 0,22µm de diámetro.
11. Listo para emplear (Sistema de microgotas en una caja de 35mm de diámetro de 70ul + 4000ul de aceite mineral).

Mediante este protocolo se logró obtener 200 µl de LF de folículos antrales >5mm, sin embargo, de folículos <5mm fue complicado recuperar líquido folicular, para nuestro estudio era necesario un stock de 2000 µl de LF. Por lo tanto, el faltante se obtuvo de folículos >5mm de ovarios de cobaya de camal.

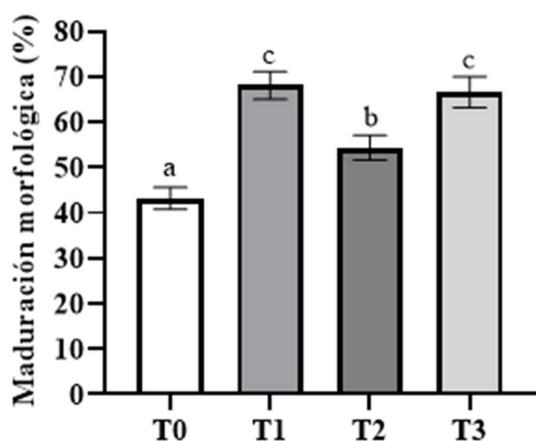
Si bien a nuestro entender, este es el primer trabajo que utiliza LF de cobaya en celo para el proceso de maduración de ovocitos de este roedor, razón por la cual se siguió el protocolo utilizado en equinos, en el que se aspiraron folículos preovulatorios (>50 mm), llegando a

obtener de 30 a 60 ml, posteriormente, el LF fue centrifugado dos veces a 500 g durante 10 min y a continuación el sobrenadante fue inactivado a 56°C durante 30min y antes de usar el LF fue filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m (Dell'aquila et al., 1997).

## 5.2 Maduración morfológica de los COC's de cobaya

Luego de 24 horas de la MIV se observó una mayor expansión de las células del cúmulo (CC) en T1 ( $68,1 \pm 3,01\%$ ) y T3 ( $66,6 \pm 3,39\%$ ), comparado con T2 ( $54,35 \pm 2,72\%$ ) y T0 ( $43,19 \pm 2,43\%$ ), ( $p < 0,05$ ). Los tratamientos suplementados con líquido folicular tienen diferencia estadística con el control (**Figura 9**).

Los resultados demuestran que la adición de LF mejoró el porcentaje de expansión de las células del cúmulo en ovocitos de cobayo, puesto que es una fuente de proteína, citocinas y factores de crecimiento, como EGF, TGF- $\beta$ , IGF-I, activina e inhibina, que soportan el desarrollo de ovocitos y la expansión de las células del cúmulo; además, contiene glucosa, lípidos y estradiol que intervienen en el proceso de maduración citoplasmática (Dumesic et al., 2015). Debido a la limitada información del LF de cobaya como suplemento en el medio de maduración *in vitro* de cobayas, se hace referencia a la especie bovina. En tal sentido, se ha descrito que la adición de 10 y 30% de LF en el medio de maduración de ovocitos, generó mayores tasas de expansión de células del cúmulo (Lopes et al., 2019); de igual forma, la expansión de las células del cúmulo de ovocitos de alpaca fue mayor luego de suplementar el medio de maduración con 10% de líquido folicular en comparación con el tratamiento control (Castro, 2018).

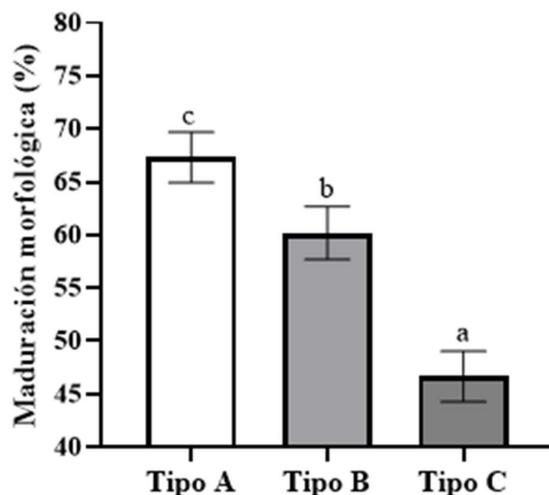


**Figura 9:** Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los tratamientos T0=control. T1=5% de adición de líquido folicular. T2=10% de adición de líquido folicular. T3=20% de

adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística ( $p > 0,05$ ).

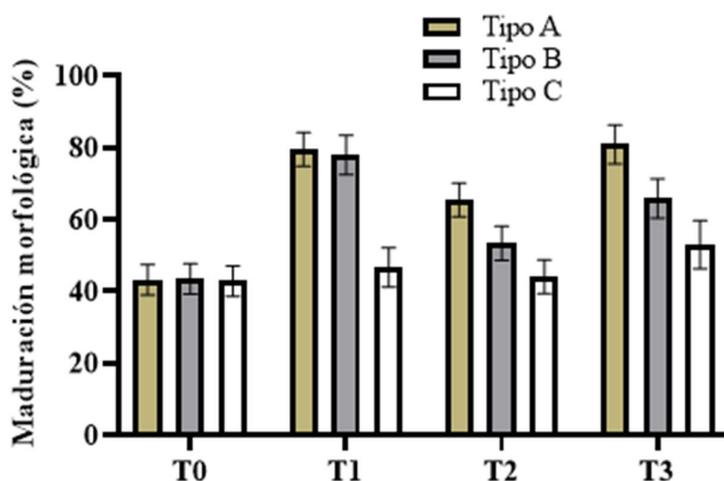
Al valorar la expansión de las células del cúmulo de los COC's tipo A; B y C, se observó que los de tipo A ( $67,3 \pm 2,3\%$ ) tuvieron alrededor de 20 puntos porcentuales más de maduración morfológica comparado con los de tipo C ( $46,7 \pm 2,39\%$ ) y 7 puntos porcentuales más que los de tipo B ( $60,2 \pm 2,4\%$ ), ( $p < 0,05$ ) entre los tres grupos (**Figura 10**). Estos resultados están en concordancia con otros estudios donde se demostró que los ovocitos con más capas de CC presentaron una tasa de maduración más alta, esto debido a que las células del cúmulo proporcionan *FSH* y *LH* que al unirse a los receptores localizados en las células de la granulosa inducen la actividad de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), la cual desencadena la síntesis de estrógeno y progesterona que permiten el proceso final de maduración de ovocitos (Wang et al., 2019).

En otras especies como la bovina, se ha demostrado que los ovocitos de tipo A y B, experimentaron porcentajes de maduración mayor que los tipos C y D (Ayala et al., 2020). Además, se ha analizado el efecto de LF en ovocitos de yegua recuperados y clasificados, siendo similar a la clasificación (tipo A; B; C) planteada en este estudio, donde se obtuvo una tasa de maduración más alta en COC's compactos y expandidos (Gabryś et al., 2022). Por lo tanto, se confirma que los COC's tipo A y B alcanzan mayores porcentajes cuando son suplementados con líquido folicular.



**Figura 10:** Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los COC's de tipo A, tipo B y tipo C. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística ( $p > 0,05$ ).

En relación con la interacción entre los tratamientos y el tipo de COC's, se observó que el grupo control logró porcentajes de expansión del cúmulo inferiores al resto de tratamientos y no presentó diferencia estadística entre los COC's tipo A, B y C. También se observó que el tratamiento 1 y 3 alcanzaron porcentajes similares (79,3% y 80,9% respectivamente) en expansión del cúmulo en sus COC's tipo A; a su vez los COC's tipo C no se diferencian, a pesar de que fueron sometidos a diferentes tratamientos (**Figura 11**).



**Figura 11:** Interacción entre tratamiento y tipo de COC's respecto al porcentaje de expansión de las células del cúmulo en T0=control, T1=5% de adición de líquido folicular, T2=10% de adición de líquido folicular, T3=20% de adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5%.

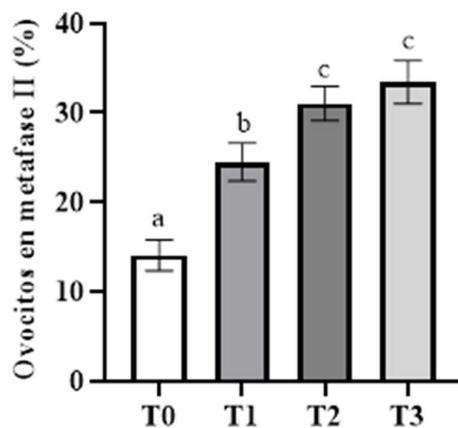
### 5.3 Maduración nuclear de los COC's de cobaya

La evaluación progresión nuclear después de 24 horas de la MIV en los tratamientos, determinó que los COC's de T3 ( $33,46 \pm 2,4\%$ ) y T2 ( $31,06\% \pm 1,93\%$ ) alcanzaron similar porcentaje de COC's en metafase II, en comparación con T1 ( $24,52 \pm 2,13\%$ ) y T0 ( $14,07 \pm 1,72\%$ ) que fue diferente entre ellos ( $p < 0,05$ ) (**Figura 12**).

Igual se observó en la especie caprina, que la adición de líquido folicular de esta misma especie (gFF) en porcentajes de 15% ( $67,79\%$ ) y 10% ( $66,66\%$ ) como suplemento del medio de maduración (TCM-199) proporcionó ovocitos maduros hasta metafase II (Asad et al., 2018). Además, se analizó el efecto del líquido folicular en un medio base (TCM 199) en la

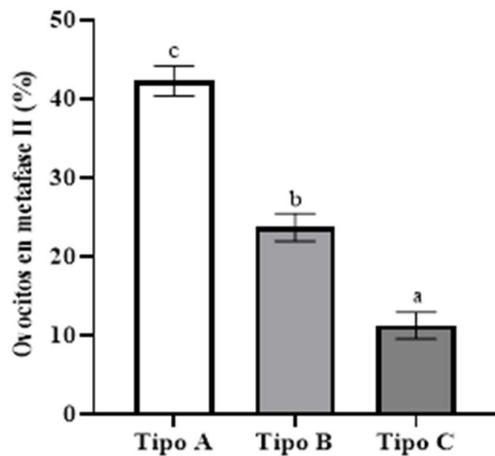
especie canina y se observó que la adición del 40% de suero estral y 10% de LF, ayudaron a que una mayor cantidad de ovocitos alcanzaran la metafase I y II; además, se obtuvo menor tasa de degeneración de ovocitos, lo que sugiere que la adición de LF en un medio base influyó positivamente en la maduración nuclear de ovocitos (Hu et al., 2020).

Sin embargo, en nuestro estudio el porcentaje de maduración nuclear desciende a la mitad en comparación con la maduración morfológica descrita anteriormente.



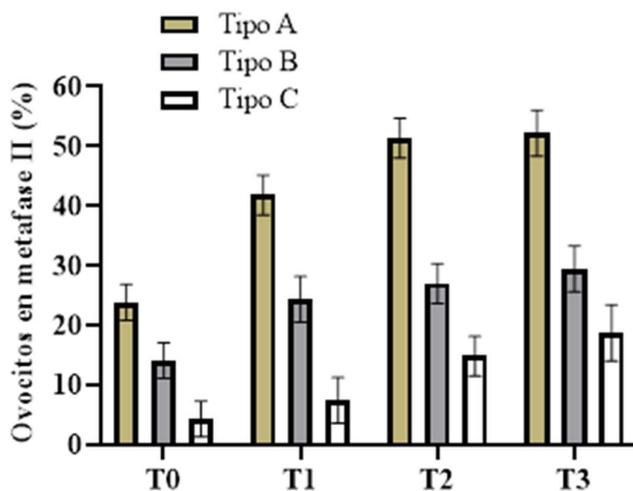
**Figura 12:** Porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II en los tratamientos T0=control, T1=5% de adición de líquido folicular, T2=10% de adición de líquido folicular, T3=20% de adición de líquido folicular. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística.

Al comparar el porcentaje de maduración nuclear de los COC's de tipo A, B y C, se determinó que los COC's tipo A ( $42,31 \pm 1,89\%$ ) presentaron 31 puntos porcentuales más de reanudación de la meiosis que los de tipo C ( $11,29 \pm 1,7\%$ ) y un 18% más de maduración nuclear que los de tipo B ( $23,72 \pm 1,76\%$ ) con diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) entre grupos. De igual manera, en el estudio de (Zahra et al., 2021), se analizó el efecto del líquido folicular en la maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros de ratón y resultó un mayor porcentaje de maduración al adicionarse LF (**Figura 13**)



**Figura 13:** Porcentaje de ovocitos de tipo A, Tipo B y Tipo C que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II. Prueba de Duncan al 5%. ab=letras diferentes demuestran diferencia estadística.

La interacción entre los tratamientos y los tipos de COC's (**Figura 14**) indicó que los COC's tipo A y B presentaron mayor porcentaje de maduración nuclear en los tratamientos con liquido folicular y se observa que en los tipos A y B existe diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) en todos los tratamientos.



**Figura 14:** Interacción entre tratamiento y tipo de COC's respecto al porcentaje de ovocitos que reiniciaron meiosis y llegaron a metafase II en T0=control, T1=5% de adición de líquido

folicular, T2=10% de adición de líquido folicular, T3=20% de adición de líquido folicular.  
Prueba de Duncan al 5% ( $p < 0,05$ ).

## Conclusiones

- La recuperación del líquido folicular de cobaya en celo mediante el protocolo aplicado en este trabajo fue exitoso en folículos >5 mm. En los folículos <5 mm no fue posible recuperar líquido folicular satisfactoriamente.
- La suplementación de líquido folicular en diferentes porcentajes en el medio de maduración *in vitro* mejoró la expansión de las células del cúmulo e incremento la proporción de ovocitos de cobaya que alcanzaron la maduración nuclear.
- Los mejores resultados luego de la maduración *in vitro* se obtuvieron al adicionar al medio 10% de líquido folicular de cobaya en celo.

### Referencias

- Ali, A., Coenen, K., Bousquet, D., & Sirard, M. A. (2004). Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 62(9), 1596–1606. <https://doi.org/10.1016/J.theriogenology.2004.03.011>
- Asad, L., Khandoker, M., Hoque, S., & Saha, S. (2018). Effect of follicular fluid on in vitro maturation, fertilization and development of goat embryos using fresh semen. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 6(6), 2319–1473.
- Avilés, D. F., Martínez, A. M., Landi, V., & Delgado, J. V. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*): un recurso andino de interés agroalimentario the guinea pig (*Cavia porcellus*): An Andean resource of interest as an agricultural food source. *Animal Genetic Resources/Ressources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales*, 55, 87–91. <https://doi.org/10.1017/s2078633614000368>
- Ayala, L., Tito Palacios, C., Pedro Nieto, E., Guido Calle, O., Ramiro Rodas, C., Jorge Dutan, S., Murrillo, Y., & Jorge Samaniego, C. (2019). Competence to restart meiosis of oocytes from different follicle sizes obtained from slaughterhouse ovaries. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(3), 1164–1174. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15437>
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)
- Bland, K. P. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 73–76. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0600073>
- Bookhout, C. G. (1945). The development of the guinea pig ovary from sexual differentiation to maturity. *Journal of Morphology*, 77(2), 233–263. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1050770207>
- Brevini, T. A. L., Vassena, R., Francisci, C., & Gandolfi, F. (2005). Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes 1. *Biology of Reproduction*, 72, 1218–1223. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038141>

- Cañón, Karina, & Córdova, X. (2012). Evaluación de la maduración in vitro de oocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) en Ecuador: resultados preliminares. *Reduca Recursos Educativos*, 57. <http://www.revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/1422/1440>
- Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Carrera, R., Lorenzo, P. L., Rebollar, P. G., Garcia-Garcia, R. M., & Arias-Alvarez, M. (2016). In vitro maturation of guinea pig oocytes supplemented with Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor I. *Developmental Biology and Physiology of Reproduction*, 13(3), 637.
- Caravaca, F. P., Castel, J. M., Guzman, J. L., Delgado, M., Mena, Y., Alcande, M. J., & Gonzales, P. (2005a). *Bases de la producción animal*. <https://books.google.com.ec/books?id=YQxTe3v1GqkC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Clemons, D. J., & Seeman, J. L. (2011). *The laboratory guinea pig* (D. V. M. Mark A. Suckow, Ed.; Second edi).
- Das, S. K., Chauhan, M. S., Palta, P., Katiyar, P. K., & Madan, M. L. (1996). *Replacement of fetal fluid in bovine serum and FSH with buffalo follicular vitro maturation of buffalo oocytes*. 245.
- Dell'aquila, M. E., Cho, Y. S., Minoia, P., Traina, V., Lacalandra, G. M., & Maritato, F. (1997). Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection\*. *Human Reproduction*, 12(12), 2766–2772.
- 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>
- Downs, S. (1993). Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, 39(1), 65–79. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90024-Y](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90024-Y)
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: Follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, 103(2), 303–316. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>
- Echeverria, V. E. (2013). Sincronización del celo en cuyes (*cavia porcellus*) con la utilización de la prostaglandina (f2 alfa) [Tesis]. <Http://Repositorio.Utn.Edu.Ec/Handle/123456789/2336>.

- Espinoza, J., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J., & Aréchiga, C. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93–99. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442007000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442007000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Fortune, J. E. (1994). Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals'. *Biology of Reproduction*, 50, 225–232.
- Fujii, M., Otoi, T., Murakami, M., Tanaka, M., Une, S., & Suzuki, T. (2000). The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 62(3), 305–307. <https://doi.org/10.1292/JVMS.62.305>
- Gabryś, J., Kij-Mitka, B., Sawicki, S., Kochan, J., Nowak, A., Łojko, J., Karnas, E., & Bugno-Poniewierska, M. (2022). Extracellular vesicles from follicular fluid may improve the nuclear maturation rate of in vitro matured mare oocytes. *Theriogenology*, 188, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.022>
- Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M., & Joly, T. (2012). Control of the estrous cycle in guineapig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY*, 124.
- Hu, M., Du, Z., Zhou, Z., Long, H., & Ni, Q. (2020). Effects of serum and follicular fluid on the in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, 143, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.040>
- Kim, C. I., Ellington, J. E., & Foote, R. H. (1989). Maturation, fertilization and development of bovine oocytes in vitro using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. *NBER Working Paper Series*, 58(58), 99–104. <https://www.unhcr.org/publications/manuals/4d9352319/unhcr-protection-training-manual-european-border-entry-officials-2-legal.html?query=excom> 1989
- Kim, K., Mitsumizo, N., Utsumi, K., & Fujita, K. (1995). *The effects of follicular fluid on in vitro maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos*. 606(05760211), 787–799.
- Kosaka, T., & Takahashi, K. W. (1989). *Effect of Pregnant in Guinea Mare's Pigs Serum with Gonadotropin Synchronized on Increased Estrous Cycle Ovulation An ability of Pregnant*

*Mare' s Serum Gonadotropin (PMSG) to induce superovulation was investigated in guinea pigs with synchronized e.* 38(1), 81–83.

Kuhne, W., & Mendoza, A. S. (1992). Scanning Electron Microscope Investigations on the Vaginal Epithelium of the Guinea Pig during the Estrous Cycle. *Archives of Histology and Cytology*, 55, 205–210. [https://doi.org/10.1679/aohc.55.Suppl\\_205](https://doi.org/10.1679/aohc.55.Suppl_205)

Limache Tito. (2015). *Efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos para la producción in vitro de embriones de bovino (Bos taurus)*. Universidad Nacional Jorge basadre Grohmann - Tacna.

Logothetopoulos, J., Dorrington, J., Bailey, D., & Stratis, M. (1995). Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: Fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *The Anatomical Record*, 243(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/ar.1092430106>

Machado, M. F., Caixeta, E. S., Sudiman, J., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Lima, P. F., Price, C. A., & Buratini, J. (2015). Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro–produced embryos in cattle. *Theriogenology*, 84(3), 390–398. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.03.031>

Maro, B., & Verlhac, MH. (2002). Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/ncb1202-e281>.

Milagros Tania. (2018). *Efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración ovocitaria in vitro de alpaca (Vicugna pacos)*.

Mills P, & May, R. (1971). *The onset of first oestrus in the guinea-pig and the effects of gonadotrophins and oestradiol anterior pituitary glands from adult male and female guineapigs (weighing about Purified sheep gonadotrophins. 1963)*.

Mora, I. (2015). *Efecto de la capsaicina administrada en la bolsa ovarica sobre el desarrollo folicular y la pubertad de la cobaya* [Benemérita Universidad Autonoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/10006/795015TL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Nickson, D., Boyd, J., Eckersall, P., Ferguson, J., Harvey, M., & Renton, J. (1993). *Métodos de biología molecular para monitorear la maduración de ovocitos y la fertilización in vitro en perras* - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8229931/>

- Palma, G. A. (2001). *Biotecnología de la reproducción* (Primera Ed).
- 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]. in *repositorio de tesis ucsm*. <https://core.ac.uk/download/pdf/198133271.pdf>
- Plates, W. T. W. O. (1964). *Oogenesis in the guineapig*. 12(December), 673–691.
- Presicce, G. (2020). *Reproductive Technologies in Animals*.
- Reed, M., & Hounslow, W. F. (1971). Induction of ovulation in the guineapig. *The Journal of Endocrinology*, 49(2), 203–211. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.0490203>
- Roche, J. F. (1996). Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Reviews of Reproduction*, 1(1), 19–27. <https://doi.org/10.1530/ROR.0.0010019>
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1021–1029. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.109.082941>
- Sadeu, J. C., Adriaens, I., Cortvrindt, R., & Smits, 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>
- Sena, J., Canha-Gouveia, A., Paris-Oller, E., & Coy, P. (2019). Supplementation of bovine follicular fluid during in vitro maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number. *Theriogenology*, 126, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.010>
- Shi, F., Watanabe, G., Trewin, A. L., Hutz, R. J., & Taya, K. (2000). Localization of ovarian inhibin/activin subunits in follicular dominance during the estrous cycle of guinea pigs. *Zoological Science*, 17(9), 1311–1320. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.1311>
- Solís Campaña, R. J., & Chávez Viteri, 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*. 87.
- Somfai, T., Inaba, Y., Watanabe, S., Geshi, M., & Nagai, T. (2012). Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes.

*Reproduction, Fertility, and Development*, 24(5), 743–752.  
<https://doi.org/10.1071/RD11251>

- 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>
- Vargas, J. G., Jorge, W. R., Pachorro, F. A., Marín, Y. G., Martín, M. M., Alor, M. S., Falcón, J. M., Zevallos, O. B., Zegarra, J. D., & Fuster, M. R. (2021). Effect of two fertilization medium on the in vitro development of Creole bovine embryos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(5), 1–9. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.18709>
- Wagner, J. E., Manning, P. J., & American College of Laboratory Animal Medicine. (1976). *The Biology of the guinea pig*. 317.
- Wahid, H., Gordon, I., Sharif, H., Lonergan, P., Monaghan, P., & Gallagher, M. (1992). Effect and efficiency of recovery methods for obtaining ovine follicular oocytes for in vitro procedures. *Theriogenology*, 37(1), 318. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(92\)90387-7](https://doi.org/10.1016/0093-691x(92)90387-7)
- Wang, J., Liu, Z., Sun, Q., Xia, S., Cui, J., Yang, L., An, L., Zhang, J., Su, L., Su, Y., & Du, F. (2019). Combined treatment with cysteamine and leukemia inhibitory factor promotes Guinea pig oocyte meiosis in vitro. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7479–7491.
- Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2012). Morphology and Physiology of the Ovary. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- 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 2021, Vol. 4, Page 58*, 4(3), 58. <https://doi.org/10.3390/MPS4030058>
- Yanagimachi, R. (1974). Maturation and fertilization in vitro of guinea-pig ovarian oocytes. *Reproduction*, 38(2), 485–488. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0380485>
- Young, W. C., Dempsey, E. W., & Myers, H. I. (1935). Cyclic reproductive behavior in the female guinea pig. *Journal of Comparative Psychology*, 19(2), 313–335. <https://doi.org/10.1037/h0060351>

- Zahra, S., Moghadam, T., Gholam, S., Jorsaraei, A., Khanbabaei, R., Tabari, M. G., & Ahmadi, A. A. (2021). The Effect of follicular fluid on in Vitro Maturation of Mouse Immature Oocytes. In *IBBJ Spring 2021* (Vol. 7, Issue 2).
- Zaldivar, L. C. de. (1997). Producción de cuyes. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación Roma, 1997*, 120. [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/docrep/w](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/w)
- Zhinin, A., & Buñay, P. (2022). *Implementación de un protocolo de maduración in vitro de ovocitos de cobaya (Cavia porcellus)*.
- Zhu, X. M., Zhu, Y. M., Xu, C. M., Qian, Y. L., Jin, F., & Huang, H. F. (2008). Autologous mature follicular fluid: its role in in vitro maturation of human cumulus-removed oocytes. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1094–1102. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1323>





**Anexo D:** Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de



**Anexo E:** Equipo de tesis en cobayas



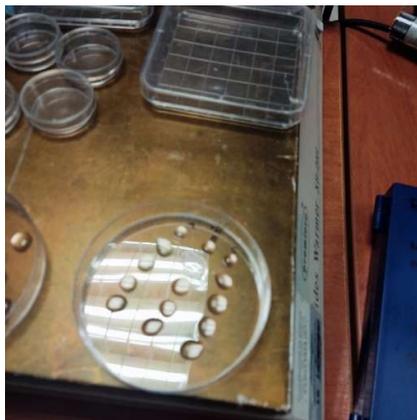
**Anexo F:** Apertura de la membrana vaginal de la cobaya



**Anexo G:** Ovario de cobaya



**Anexo H:** Recolección de ovocitos de cobaya



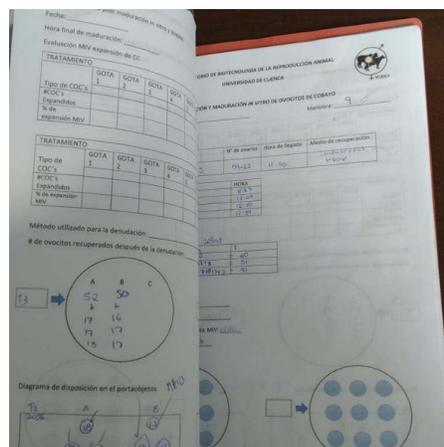
**Anexo I:** Gotas de 50 $\mu$ l de medio de manipulación, para el lavado de ovocitos de cobaya



**Anexo J:** Colocación de los COC's el medio de maduración



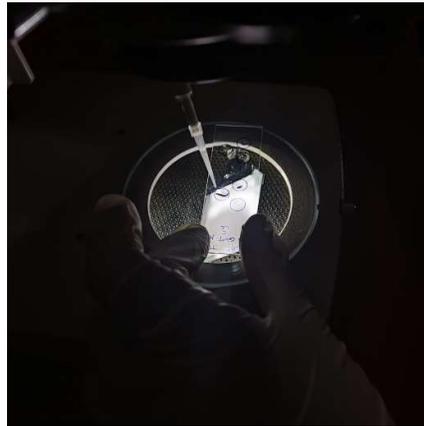
**Anexo K:** Maduración in vitro de los COC's de cobaya, en la estufa de cultivo trigas.



**Anexo L:** Cuadernillo de apuntes de maniobras



**Anexo M:** MIV de ovocitos de cobayas con los tratamientos T0 y T3.



**Anexo N:** Tinción con fluorocromo Hoechst 33342 en cuarto oscuro.



**Anexo O:** Montaje de los COC's en el portaobjetos.



**Anexo P:** Revisión de las placas, observación de los COC's nuclearmente.



**Anexo Q:** Microscopio de Epifluorescencia.



**Anexo R:** Caja portaobjetos