

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de la aplicación de un tratamiento a base de hormona gonadotropina menopáusica humana (hMG) en diferentes tiempos, sobre la respuesta ovárica de cobayas sincronizadas

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


Autores:

José Luis Lituma Romero

Daniel Enrique Tapia Sinchi

Director:

José Luis Pesántez Pacheco

ORCID:  0000-0002-5669-6014

Cuenca, Ecuador

2023-07-11

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la hormona gonadotropina menopáusica humana (hMG) aplicada en diferentes momentos sobre la respuesta superovulatoria de cobayas con previa sincronización del ciclo estral. Se seleccionó un total de 21 hembras de edad media de 100 ± 5 días, con un peso entre 800 a 1150 g y que tuvieron un periodo de adaptación alimenticio de 15 días. Se conformaron 3 grupos los cuales fueron sincronizados administrando P₄ oral (Altrenogest®, 0,22mg/kg) durante 15 días; al primer grupo (A-hMG) se administró una dosis de 5 UI/kg/día de hMG los días 13, 14 y 15 de sincronización; el segundo grupo (D-hMG) se administró 5 UI/kg/día de hMG el día 15 de sincronización, 16 y 17 postsincronización; el tercer grupo fue considerado grupo control. La administración de hMG incrementó significativamente ($p < 0,05$) el número de cuerpos lúteos en el grupo D-hMG $17,1 \pm 5,4$ en comparación con el grupo A-hMG $4,5 \pm 0,6$ y control $3,0 \pm 0,7$, además del número total de estructuras recuperadas. No existieron variaciones significativas en la apertura de la membrana vaginal ($p < 0,05$); tomando como referencia el momento de la aplicación y el retiro del progestágeno; así como las demás variables morfométricas: volumen ovárico, tamaño de cuerpos lúteos y folículos, no difirieron significativamente. Los resultados sugieren que la aplicación de hMG, provocó un efecto positivo sobre la respuesta ovárica, incremento del número de estructuras recuperadas y embriones; esto se explica por la presencia de un mayor número de cuerpos lúteos y embriones recuperados.

Palabras clave: sincronización, superovulación, embriones

Abstract

The objective of the study was to evaluate the effect of human menopausal gonadotropin hormone (hMG) applied at different times on the superovulatory response of guinea pigs with prior synchronization of the estrous cycle. A total of 21 females with a mean age of 100 ± 5 days, weighing between 800 and 1150 g, and which had a feeding adaptation period of 15 days, were selected. Three groups were formed, which were synchronized by administering oral P4 (Altrenogest®, 0.22mg/kg) for 15 days; the first group (A-hMG) was administered a dose of 5 IU/kg/day of hMG on days 13, 14 and 15 of synchronization; the second group (D-hMG) was administered 5 IU/kg/day of hMG on day 15 of synchronization, 16 and 17 post-synchronization; the third group was considered the control group. The administration of hMG significantly increased ($p < 0.05$) the number of corpora lutea in the D-hMG group 17.1 ± 5.4 compared to the A-hMG group 4.5 ± 0.6 and control $3, 0 \pm 0.7$, in addition to the total number of structures recovered. There were no significant variations in the opening of the vaginal membrane ($p < 0.05$); taking as reference the moment of application and withdrawal of the progestin; as well as the other morphometric variables: ovarian volume, size of corpora lutea and follicles, did not differ significantly. The results suggest that the application of hMG caused a positive effect on the ovarian response, an increase in the number of recovered structures and embryos; this is explained by the presence of a greater number of recovered corpora lutea and embryos.

Keywords: synchronization, superovulation, embryos

Índice de contenido

Introducción.....	12
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
Revisión de literatura	15
2.1. Características generales de cobayos	15
2.1.1. Biología del comportamiento de los cobayos.....	15
2.1.2. Características generales.....	15
2.2. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya	17
2.3. Fisiología del ciclo reproductivo.....	18
2.4. Protocolos de control del ciclo estral y superovulación.	19
2.5. Ciclo estral de los cobayos	20
2.5.1. Dinámica folicular	21
2.5.2. La membrana vaginal	23
2.6. Sincronización del celo.....	23
2.6.1. Superovulación	24
2.7. Desarrollo embrionario y características de embriones.....	25
Materiales y métodos.....	26
3.1. Materiales.....	26
3.2. Metodología.....	27
3.2.1. Ubicación	27
3.2.1.1. Diseño y preparación de las unidades experimentales.....	27
3.2.3. Lavado de oviductos, útero y recuperación de estructuras	30
3.2.4. Evaluación morfológica y calidad de estructuras colectadas	31
3.2.6. Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	34
4.1. Clasificación de estructuras recuperadas	34
4.2. Efectos de la administración de hMG sobre el desarrollo folicular ..	35

UCUENCA

5

4.3.	Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas.....	36
	Discusión.....	39
	Conclusión.....	44
	Referencias.....	45
	Anexos.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Tracto reproductivo femenino. Fuente: Hargaden y Singer (2012). 17

Figura 2. Representación hormonal durante el ciclo estral en las cobayas. Fuente: Adaptado de Quesenberry *et al.*, (2004); Shi *et al.* (2000); Kühnel y Mendoza, (1992); Reed and Hounslow, (1971); Hermreck and Greenwald, (1964). 23

Figura 3. Ubicación geográfica Granja Iruis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de: Google Earth (2020). 27

Figura 4. Protocolos de sincronización de los grupos experimentales. A-hMG, administración de hMG antes del retiro del P₄ (panel A). D-hMG, administración de hMG después del retiro de P₄ (panel B). Control, no recibe hMG (panel C). 29

Figura 5. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal. Durante el período de latencia del ciclo estral, la membrana se ve cerrada (A, B). Cuatro a cinco días antes de la ovulación, cambia la coloración de la membrana vaginal, signo de una posible perforación de la misma (C). Al momento de la ovulación, se perfora la membrana vaginal y aumentan las secreciones vaginales (D). Tras la ovulación, la membrana vaginal comienza a cerrarse (E, F). (46). 30

Figura 6. Proceso de lavado de los oviductos y cuernos uterinos. 31

Figura 7. Esquematización de la medición del volumen ovárico. Adaptado de Penitente *et al.* (2015). 32

Figura 8. Representación de la medición del diámetro del CL. Adaptado de Penitente *et al.* (2015). 33

Figura 9. Número de cuerpos lúteos (panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG). Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). 34

Figura 10. Número de folículos (panel A) y diámetro de folículos (panel B) de cobayas a las que se les aplico un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG). Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). 36

Figura 11. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal (AMV) de cobayas desde el retiro de la fuente de P₄ (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 hMG hasta la manifestación de celo (panel B Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05)..... 37

Figura 12. Volumen ovárico (VO) de cobayas a las que se les aplico un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopaúsica humana (hMG Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). 38

Índice de tablas

Tabla 1. Valores fisiológicos normales en cobayos.....	16
Tabla 2. Fases del ciclo estral de las cobayas	21
Tabla 3. Clasificación de estructuras de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG).	35
Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humanas (hMG).....	36

Dedicatoria

Este trabajo de tesis se lo dedico a mi madre Rosa, por su gran esfuerzo y sacrificio para impulsarme a culminar mis estudios, muchos de mis logros te los debo y entre los cuales incluyo éste. A mi hijo Elías y a mi pareja Jenny, que han sido mi motivación principal para seguir adelante, para ser perseverante cada día, gracias por depositar su confianza en mí.

A mis familiares, docentes y amigos que me acompañaron y me apoyaron durante cada etapa de esta formación académica.

José Luis Lituma Romero

Dedico esta tesis en primer lugar a Dios por darme la vida y regalarme una maravillosa familia, a mis padres María de Lourdes y Carlos Enrique, a mi hermana Jessica y a mis abuelos, ya que sin ellos no habría sido posible cumplir una meta más, por todo el amor que me han brindado. Siendo un pilar fundamental, por su fortaleza, consejos, valores y principios para nunca rendirme. A los docentes que estuvieron durante mi formación a lo largo de la carrera y mis amigos, gracias por el apoyo ya que de esta manera puedo convertirme en Médico Veterinario Zootecnista.

Daniel Enrique Tapia Sinchi

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por darnos la oportunidad de estudiar la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad de Cuenca.

A nuestros familiares y amigos que de una u otra forma estuvieron a nuestro lado, brindando su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos.

Al Doctor José Luis Pesantez que dirigió nuestra tesis y compartió sus conocimientos y experiencia para el mejoramiento de nuestro trabajo de titulación, así mismo, a todos los docentes que formaron parte de nuestra vida universitaria y que han servido de guía durante nuestra formación como profesionales.

José Luis & Daniel

Abreviaturas utilizadas

hMG: gonadotropina menopaúsica humana

FSH: hormona foliculoestimulante

LH: luteinizante

CL: cuerpo lúteo

PGF2 α : prostaglandina F2 alfa

PBS: solución salina buffer de fosfato

FOLs: folículos

DFOLs: diámetro de folículos

MV: membrana vaginal

AMV: apertura de la membrana vaginal

P₄: progesterona

VO: volumen ovárico

PG: prostaglandinas

INHA: vacunas contra inhibina alfa

eCG/PMSG: gonadotropina coriónica equina

SOV: protocolos de superovulación

E₂: estrógenos

DMS: diferencia mínima significativa

Introducción

El cobayo no es solo un animal que se lo explota para su crianza y consumo, sino también ha sido utilizado desde el siglo XVIII como un animal de laboratorio para procesos investigativos (Taylor & Lee, 2012). Es un excelente modelo para estudios reproductivos en humanos, ya que es el único de los roedores de laboratorio que posee un ciclo estral completo dividido en fase folicular y luteal (Grégoire et al., 2010).

Esta especie poseen ovulación espontánea, y las características morfofisiológicas del cuerpo lúteo y el tamaño de su camada son similares a las de la especie humana, por todas estas razones los trabajos que se han venido realizando hasta ahora se enfocan en mejorar los métodos de control del ciclo estral y respuestas a la ovulación múltiple (superovulación), con miras a recolectar una mayor cantidad de ovocitos o embriones para futuros estudios embriológicos (Grégoire et al., 2010)

Por lo tanto, se necesita tener una mejor comprensión de los diferentes métodos utilizados para el control del ciclo estral y la respuesta a la ovulación múltiple, con la finalidad de diseñar un método más eficiente para aumentar la cantidad y calidad de ovocitos y embriones (Grégoire, Allard, et al., 2012; Suzuki et al., 2003). Además al realizar este tipo de estudios puede proporcionar un mejor entendimiento del funcionamiento del ciclo reproductivo de esta especie que no podría obtenerse si se emplea un modelo como la rata o el ratón (Benavides & Jean, 2003).

Las cobayas presentan un ciclo de $16,1 \pm 0,2$ días en promedio con un rango de 13 a 22 días, la fase lútea varía entre 12 - 13 días y la ovulación es espontánea. Algunos autores mencionan que el proestro dura de 1 - 1,5 días, estro 8 - 24 horas, metaestro 1 - 1,5 días y diestro 13 - 15 días (Kuhnel & Mendoza, 1992). En otros estudios el estro duró de 6 - 11 horas y de 8 - 11 horas (Hermreck & Greenwald, 1964; Quesenberry et al., 2012); el metaestro y diestro tuvieron una duración de 3 y 11 - 12 días respectivamente.

Entre las principales gonadotropinas utilizadas para promover la superovulación en roedores se destacan la hormona FSH, la gonadotropina menopáusica humana (hMG) y la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG). La administración de FSH exógena incrementa la concentración endógena de esta, lo que favorece el crecimiento folicular, la diferenciación, maduración y ovulación, siempre que al término del tratamiento con FSH se administre una dosis de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de gonadotropina coriónica humana (hCG) que provoque la ovulación (Edwards et al., 2005), sin embargo, la vida media corta de esta hormona ocasiona que se la deba

inyectar a intervalos regulares de 12 horas o a través de infusión constante a través de una bomba de infusión continua, por lo que este protocolo para inducir superovulación consume mayor tiempo (Armstrong & Opavsky, 1988), pero los resultados correspondientes a estructuras colectadas son satisfactorios (Edwards et al., 2005), sin embargo el alto costo de esta hormona ocasiona que el uso sea limitado.

La hMG (hormona con actividad folículo estimulante y luteinizante relación 1:1); utilizada en cobayos para inducir superovulación es de administración intramuscular e intraperitoneal, en diferentes momentos del ciclo estral: fase luteal media (días 6, 7 y 8) (Suzuki et al., 2003) y fase preovulatoria (días 14, 15 y 16) (Dorsch et al., 2008; Suzuki et al., 2003). La administración de hMG durante la etapa preovulatoria aumenta el número de ovocitos y por ende el número de embriones, en comparación con la administración de hMG que se la realiza en etapa lútea media ($5,4 \pm 1,6$ vs. $3,6 \pm 0,1$; $p < 0,05$) (Suzuki et al., 1993).

Cabe mencionar que la aplicación de esta hormona debe ser de manera consecutiva (Portelli, 2013). Sin embargo, los protocolos de superovulación (SOV) diseñados hasta ahora con esta hormona se basan en el seguimiento diario del ciclo estral mediante la observación de los cambios de la citología vaginal y apertura de la membrana vaginal, para determinar el momento de la ovulación y con esto determinar la etapa del ciclo en la que la hormona debe ser aplicada (Dorsch et al., 2008; Suzuki et al., 2003). Un protocolo que se basa en el uso de hMG es fiable, rápido y económico que puede ser usado de manera rutinaria en el laboratorio (Dorsch et al., 2008).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la hMG aplicada en diferentes momentos sobre la respuesta superovulatoria de cobayas con previa sincronización del ciclo estral.

Objetivos específicos

- Valorar el efecto de una dosis de hMG distribuida en varios días sobre la respuesta ovárica de cobayas previamente con sincronización del ciclo estral.
- Cuantificar y clasificar el número de estructuras recuperadas después de la ovulación de cobayas superovuladas.

Revisión de literatura

2.1. Características generales de cobayos

Los cobayos son roedores histricomorfos, herbívoros monogástricos con un ciego grande y producen crías precoces después de un período de gestación relativamente largo (Quesenberry et al., 2012). Habitan en una amplia variedad de hábitats, incluyendo pastizales, bosques, pantanos y áreas rocosas. Existen diferentes tipos y cada uno tiene diferentes variedades de color y marcas, que incluyen blanco, rojo, tostado, marrón, chocolate y negro; las capas pueden ser monocromáticas, bicolores o tricolores (Vivas & Carballo, 2013). Han sido utilizados como animales de laboratorio durante más de 500 años, y se dispone de abundante información sobre ellos (Quesenberry et al., 2012). Es el único roedor que tiene un ciclo estral completo ya que la mayoría de los roedores de laboratorio exhiben estros incompletos y diferentes endocrinológicamente, careciendo de fases lúteas funcionales (Suzuki et al., 2003).

2.1.1. Biología del comportamiento de los cobayos

Estos animales presentan cierto comportamiento ante determinadas situaciones. Primeramente, ante la presencia de depredadores su respuesta al peligro percibido es congelarse o huir (Broom, 2000; Dávila et al., 2018). Si están asustados, tienden a quedarse inmóviles o, alternativamente, hacen un intento explosivo de escapar. En segundo lugar, no toleran bien los cambios dietéticos o ambientales. Sus preferencias alimentarias se establecen temprano en la vida y, a menudo, se niegan a comer si su comida cambia en tipo o presentación (Dávila et al., 2018). Además, pueden deprimirse o dejar de comer cuando están hospitalizados; por lo tanto, la actitud y el consumo de alimentos de todos los animales hospitalizados deben monitorearse cuidadosamente. En tercer lugar y no menos importante, requieren una fuente dietética de vitamina C (Quesenberry et al., 2012).

2.1.2. Características generales

Los cobayos tienen cuerpos robustos, extremidades cortas y delicadas, piernas redondeadas sin pelo y sin cola. Los machos son más grandes que las hembras, con un peso de entre 900 a 1200 g en comparación con los 700 a 900 g de las hembras. La vida de los cobayos como mascotas suele ser de 5 a 6 años. Los cobayas salvajes se alimentan al amanecer y al anochecer; viven en pequeños grupos (5 a 10 individuos) en madrigueras o grietas (Donnelly, 1990).

El pelaje de los cobayos está compuesto por grandes pelos protectores rodeados por una capa interna de pelos finos. Las glándulas sebáceas dependientes de andrógenos son abundantes a lo largo del dorso y alrededor del ano y son importantes para marcar. En los machos mayores, se produce una acumulación excesiva de secreciones sebáceas en la piel alrededor de la base de la columna vertebral, en pelaje grueso, apelmazado y grasiento (Breazile & Brown, 1976).

Tabla 1. Valores fisiológicos normales en cobayos.

Parámetros	Valores normales
Tiempo de vida como mascota.	5 – 6 años
Peso adulto	macho: 900 – 1200 g, hembra: 700 – 900 g.
Madurez sexual	machos 3 a 4 meses (600 - 700g), hembras 2 a 3 meses (350 - 450g).
Tipo de ciclo estral	poliéstrico no estacional
Duración del ciclo estral	15 – 17 días
Ovulación	espontanea
Periodo de gestación	59 – 72 días (promedio 68 días)
Temperatura corporal	37,2 – 39,5 °C
Ritmo cardiaco	240 – 310 lpm
Ritmo respiratorio	42 – 104 rpm

Fuente: Adaptado de Quesenberry *et. al*, (2012).

2.2. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya

Los ovarios miden aproximadamente 3 - 6 mm x 2 - 4 mm x 2 - 3 mm. El ovario derecho se encuentra caudolateral al riñón derecho. El izquierdo es craneolateral al riñón izquierdo. Los oviductos miden entre 50 y 60 mm de largo y 1 mm de diámetro. El útero presenta dos cuernos uterinos, cada uno de 30 a 50 mm de largo y 3 mm de diámetro, el cuerpo uterino es corto de aproximadamente 12 a 20 mm de largo y 6 mm de diámetro, y cuello uterino (Hargaden & Singer, 2012).

La vagina mide entre 30 y 40 mm de largo con crestas longitudinales prominentes (Figura 1). No hay vestíbulo entre la vagina y el orificio vaginal externo (Cooper & Schiller, 1975). El orificio vaginal tiene forma de U y está cerrado por la membrana vaginal que se abre en el estro, en el parto y entre los días 20 y 35 de gestación, generalmente en los días 26 o 27 (Hargaden & Singer, 2012).

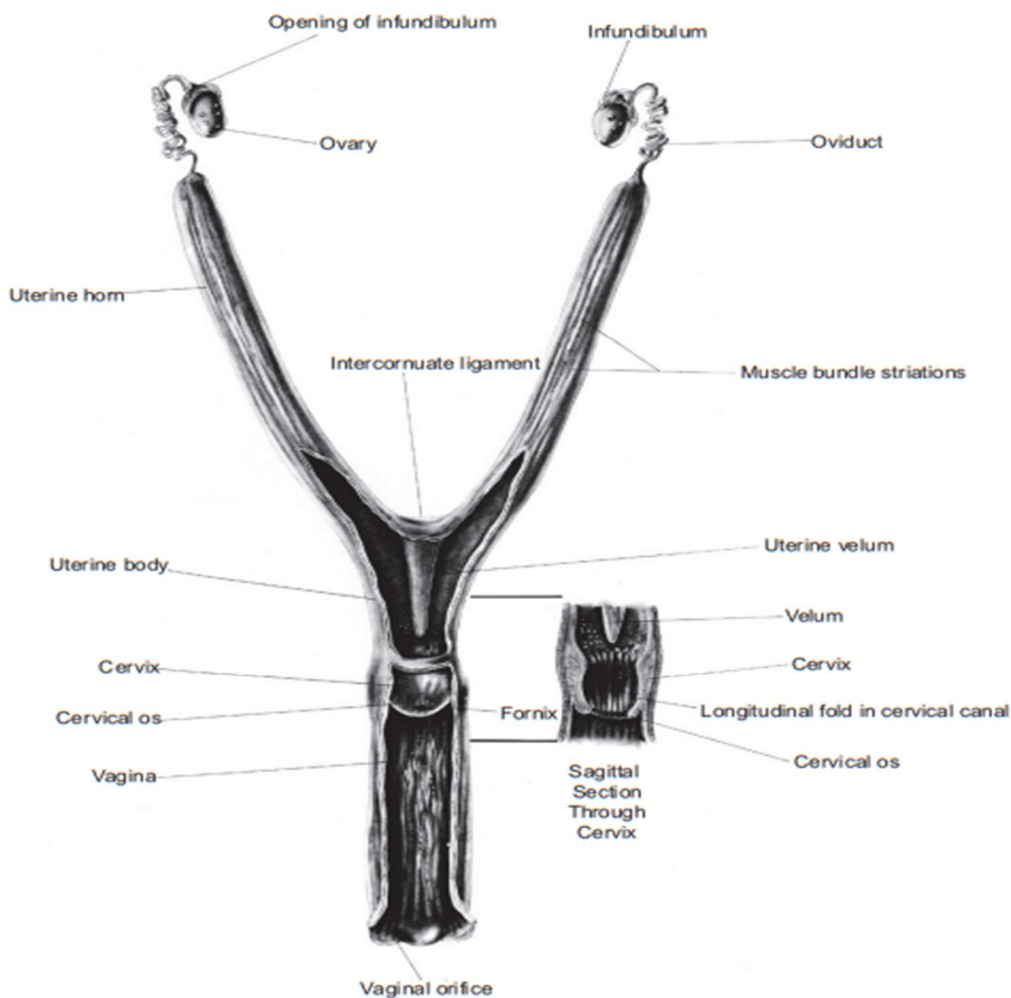


Figura 1. Tracto reproductivo femenino. Fuente: Hargaden y Singer (2012).

2.3. Fisiología del ciclo reproductivo.

Muchas características informadas del ciclo reproductivo (p. ej., la duración del estro y el ciclo estral, el momento del estro posparto, el tamaño de la camada varía según los autores (Hermreck & Greenwald, 1964; Kuhnel & Mendoza, 1992; Quesenberry et al., 2012; Reed & Hounslow, 1971), presumiblemente debido a las variaciones entre los tipos de cobayos. Los números informados aquí se recopilan de varias fuentes diferentes y se mencionan en consecuencia (Quesenberry et al., 2012).

La pubertad, ocurre a los 2 meses de edad en las hembras y a los 3 meses en los machos. Los machos comienzan a montar al mes de edad y la eyaculación es evidente cuando tienen 2 meses de edad, el período reproductivo para las hembras comienza desde los 3 o 4 meses hasta los 20 meses de edad; los animales de compañía pueden reproducirse hasta los 4 o 5 años (Manning et al., 1984). En un sistema de producción los machos se cambian cada tres o cuatro meses, y las hembras tiene una vida reproductiva de alrededor de dos años, controlando así la productividad del grupo y no de forma individual (Robinson, 1975).

Los cobayos son poliéstricos y se reproducen durante todo el año en un entorno de laboratorio. El ciclo estral en la mayoría de las hembras es de 15 a 17 días, y la ovulación es espontánea (Manning et al., 1984). Además esta especie presenta un celo fértil después del parto el cual ocurre en la mayoría de las hembras luego de 2 a 10 horas (Quesenberry et al., 2012).

Las cobayas tienen una membrana vaginal que se abre durante el celo y se cierra después de la ovulación. Se puede confirmar la cópula en cobayas al encontrar el tapón vaginal (copulatorio), es una masa sólida de eyaculación coagulada que sale de la vagina varias horas después del apareamiento. Los tapones copulatorios de roedores son típicamente duros y de consistencia gomosa o cerosa y son el producto exclusivo de las secreciones masculinas. Los tapones copulatorios no se limitan a los roedores y se han informado en algunos murciélagos, insectívoros, primates y marsupiales (Donnelly, 1990).

Existen varias posibles funciones del tapón copulatorio en roedores; pueden almacenar esperma, prevenir la fuga de esperma, inducir un pseudopreñez, efectuar el transporte de esperma, o prevenir la fertilización posterior de la hembra por otros machos (Voss, 1979). Las hipótesis actuales sugieren que la función principal del tapón copulatorio es la imposición de la castidad en los roedores reproductores polígamos. Las otras funciones, especialmente el transporte de esperma, se consideran efectos secundarios

pero necesarios, el tapón copulador evita que la eyaculación competidora llegue al sitio de fertilización (Voss, 1979).

2.3.1. Características de la gestación

La placenta de las cobayas es hemocorial (igual ser humano), lo que significa que los trofoblastos están en contacto con la sangre materna. La duración de la gestación es de 59 a 72 días (promedio, 68 días), dependiendo del tipo de cobayo, número de partos y tamaño de la camada. La gestación suele ser más corta en cobayas primíparas y en aquellas con camadas pequeñas (Quesenberry et al., 2012). La detección de los fetos mediante la palpación se puede realizar desde las 4 o 5 semanas de gestación (Harkness et al., 2010) o desde el día 42 de la gestación, sin embargo, los movimientos del feto son más notables a los 50 días (Richardson, 2000).

El parto inminente está señalado por la separación de la sínfisis púbica; un espacio de 15 mm, es palpable dos días antes del nacimiento de los neonatos y aumenta el ancho (hasta 25 mm o más) (Quesenberry et al., 2012). El parto normal suele ser rápido, con solo unos minutos entre nacimientos. Los cobayos no construyen nidos. El tamaño promedio de la camada varía según las prácticas de manejo, pero normalmente es de 2 a 4 (Weir, 1974). Los pesos al nacer varían de 45 a 115 g y son inversamente proporcionales con el tamaño de la camada (Franz et al., 2011). Los cobayos neonatos son precoces, lo que significa que están completamente cubiertos de pelo, tienen los ojos abiertos y pueden moverse poco después del nacimiento. Sin embargo, no son capaces de valerse por sí mismos en este momento. Deberían recibir leche durante un mínimo de 5 días, y el período normal de lactancia es de 3 semanas (Weir, 1974). Los jóvenes se destetan a los 21 días, o con un peso de 180 g (15 - 28 días de edad) (Manning et al., 1984).

2.4. Protocolos de control del ciclo estral y superovulación.

Para controlar el ciclo estral e inducir la superovulación se emplea hormonas gonadotrópicas como la hormona foliculoestimulante (FSH), para lo cual es indispensable conocer cuáles son los mecanismos involucrados en el control del ciclo estral (ovulación, función luteal y dinámica folicular) para comprender y establecer métodos eficientes de sincronización del celo, así como también de superovulación, es decir los tratamientos que aumenten el número fisiológico de ovulaciones (Callejas, 2001).

2.5. Ciclo estral de los cobayos

Las cobayas presentan una longitud de ciclo de $16,1 \pm 0,2$ días en promedio con un rango de 13 a 22 días, presenta una fase lútea de 12 - 13 días y la ovulación es espontánea (Grégoire et al., 2010; Quesenberry et al., 2012; Shi, Watanabe, et al., 2000). La duración de las diferentes etapas del estro varía según la literatura; algunos autores mencionan que el proestro dura de 1 - 1,5 días, estro 8 - 24 horas, metaestro 1 - 1,5 días y diestro 13 - 15 días (Kuhnel & Mendoza, 1992). En otros estudios el estro duró de 6 - 11 horas y de 8 - 11 horas (Hermreck & Greenwald, 1964; Quesenberry et al., 2012); el metaestro y diestro tuvieron una duración de 3 y 11 - 12 días respectivamente (Tabla 2) (Reed & Hounslow, 1971).

Tabla 2. Fases del ciclo estral de las cobayas

	Fase	Duración	Características
Folicular	Proestro	1 - 1,5 días	Hinchazón vulvar y ruptura de la membrana vaginal. El frotis vaginal revela células epiteliales nucleadas y cornificadas. Aumento en la actividad y sonidos guturales.
	Estro	8 - 24 horas	Hinchazón vulvar, congestión, secreción de moco y membrana vaginal perforada. Pueden mostrar lordosis. El frotis vaginal contiene células epiteliales cornificadas. La ovulación es espontánea y generalmente ocurre tarde en el período estral, aproximadamente a las 10 horas después de iniciado el celo.
	Metaestro	1 - 3 días	Las secreciones vaginales se vuelven espesas y los vasos vaginales y uterinos se congestionan, el fluido vaginal es seroso.
Luteal	Diestro	11 - 15 días	No hay congestión en los vasos sanguíneos y la secreción de moco está ausente.

Fuente: Adaptado de Quesenberry *et al.*, (2004); Shi *et al.* (2000); Kühnel y Mendoza, (1992); Reed and Hounslow, (1971); Hermreck and Greenwald, (1964).

2.5.1. Dinámica folicular

A los 11 - 13 días después de la ovulación, el nivel de P₄ disminuye debido a la regresión del cuerpo lúteo, y los folículos pueden alcanzar la madurez (Bland, 1980; Hargaden & Singer, 2012). La regresión del cuerpo lúteo y la caída de la secreción de P₄ hace que el feedback negativo ejercido sobre el hipotálamo desaparezca y a su vez estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Grégoire *et al.*, 2010).

En consecuencia, la FSH aumenta y estimula a las células de la teca interna que promueven la síntesis de E_2 por parte del folículo en desarrollo (Hargaden & Singer, 2012). La producción de E_2 y los niveles basales de LH facilitan el aumento del tamaño del folículo. Entonces aumenta la secreción de LH desde la hipófisis anterior y se produce la ovulación (Figura 2). La P_4 plasmática vuelve a aumentar rápidamente después de la ovulación (Challis et al., 1971).

Los niveles de concentración más bajos de FSH y los niveles más altos de estradiol se alcanzan en el día de la ovulación (día 0). Después de la ovulación, la FSH se incrementa y el estradiol disminuye (Shi, Watanabe, et al., 2000). La concentración de P_4 es baja en los días 16 y 0, y alta entre los días 4 a 12. Asimismo, la LH es alta en el día 0, luego de la ovulación disminuye y aumenta nuevamente en el día 12 (Blatchley & Donovan, 1976).

En el ciclo natural de las cobayas cuando no hay implantación de embriones en el útero, la mucosa uterina cumple la función de secretar prostaglandinas ($PGF2\alpha$) que ocasionan la lisis del cuerpo lúteo en el ovario, Por lo tanto, los niveles basales de P_4 disminuyen permitiendo la ovulación (Grégoire et al., 2010). Esta especie tiene alrededor 2,8 a 3,6 ovulaciones en promedio por ciclo estral, pero puede llegar hasta 8 ovulaciones (Araníbar & Echevarría C, 2014; Noonan, 1994).

El crecimiento folicular en el cobayo parece ser bifásico con una población de folículos (primera onda folicular) que alcanza su mayor tamaño el día 10 - 11 y luego retrocede mientras otra población (segunda onda folicular) madura y culmina en la ovulación (Bland, 1980; Hamilton & Tam, 1990). Los folículos de mayor tamaño durante los días 8 a 9 se originan de folículos antrales entre los días 1 y 3 del ciclo. Los folículos de la segunda onda probablemente siguen un camino similar, lo que sugiere que los folículos grandes del día 15 se originan entre los días 6 y 9 (Hamilton & Tam, 1990).

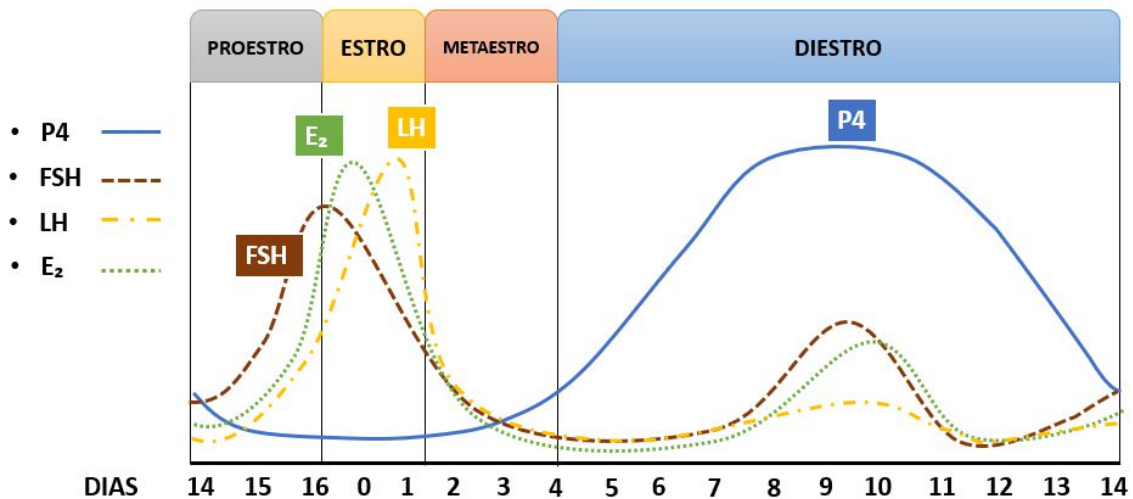


Figura 2. Representación hormonal durante el ciclo estral en las cobayas. Fuente: Adaptado de Quesenberry *et al.*, (2004); Shi *et al.* (2000); Kühnel y Mendoza, (1992); Reed and Hounslow, (1971); Hermreck and Greenwald, (1964).

2.5.2. La membrana vaginal

La membrana vaginal se encuentra en la periferia de los genitales de la hembra y se ausenta por alrededor de 3 a 7 días (4,1 días en promedio) coincidiendo con el celo (Luna *et al.*, 2003), otros autores mencionan que permanece abierta durante sólo dos días (Donnelly, 1990). Por esta razón, la observación de la apertura de la membrana vaginal se usa como indicador del celo en estos animales (Figura 5). La ovulación suele ocurrir de 1 a 1,5 días posteriores a la apertura vaginal (Sadeu *et al.*, 2007).

2.6. Sincronización del celo

Los protocolos eficaces para el control del ciclo estral del cobayo son escasos. La sincronización de celo se puede obtener usando un implante subcutáneo lleno de P₄, durante un periodo de 4 semanas. La hembra entra en celo 5-6 días luego de remover el implante (Ueda *et al.*, 1998). Este método es costoso y difícil de implementar en condiciones de campo, además de presentar problemas éticos porque requiere el uso de anestesia general para insertar los implantes que tienen dimensiones grandes.

Otras hormonas para la sincronización son los análogos sintéticos de P₄ como el altrenogest que se administran por vía oral. En un ciclo natural, la fase lútea corresponde a la presencia de un cuerpo lúteo (CL) activo en el ovario, el cual secreta P₄ y bloquea una nueva ovulación. Cuando se produce la regresión del CL, la secreción de P₄ cae y el feedback negativo que hay sobre el hipotálamo desaparece. Entonces se estimula la secreción de FSH y de la hormona luteinizante (LH) por la hipófisis, lo que provoca el

desarrollo de una nueva onda folicular y la ovulación. Al mantener alto el nivel de P₄, se bloquean las nuevas ovulaciones para obtener el inicio de un nuevo ciclo al retirar el tratamiento (Grégoire et al., 2010).

En un estudio se aplicó altrenogest por 20 días consecutivos, todas las hembras presentaron signos de celos a los 4 - 5 días después del retiro del tratamiento. La aparición de celos se puede verificar por observación de la apertura de la membrana vaginal, así como el comportamiento de las hembras. Los resultados muestran que la aplicación diaria de P₄ oral permite sincronizar los celos de las hembras, en cualquier momento del ciclo estral (Grégoire et al., 2010). Este procedimiento es fácil de aplicar en condiciones de campo y en animales adaptados a la manipulación diaria.

2.6.1. Superovulación

La superovulación es la inducción de ovulaciones múltiples mediante la disminución de la atresia folicular con el uso de hormonas. Abarca procesos endócrinos comenzando en el ciclo estral hasta la ovulación de los folículos que se han desarrollado en respuesta al tratamiento hormonal suministrado, responsables en gran medida de que los embriones recuperados sean de alta calidad (Bolívar & Maldonado, 2008).

Una respuesta óptima en términos de tasa ovulatoria está estrechamente relacionada con la dosis de hormona utilizada; no obstante, si bien un ovario estimulado hormonalmente genera un elevado número de ovulaciones, no siempre se correlaciona con la calidad de los ovocitos y/o embriones recuperados, ni con el posterior desarrollo preimplantacional (Ertzeid & Storeng, 1992).

La gonadotropina menopaúsica humana (hMG, *por sus siglas en inglés*) tiene actividad FSH además de actividad LH (relación 1:1) y, por lo tanto, puede actuar estimulando el crecimiento folicular como FSH y LH induciendo la ovulación. La eficacia del tratamiento con hMG para inducir la superovulación en cobayos es excelente y dependiente del tiempo. También es eficaz para inducir la ovulación sincronizada en cobayos, lo que sugiere que la hMG es una alternativa al uso de prostaglandina f2 α (PGF2 α) con el fin de sincronizar el celo en cobayos (Grégoire, Peredo, et al., 2012; Suzuki et al., 2003). En cobayos tratados con esta hormona se ha recolectado embriones entre los días 3,5 y 4,5 después de la ovulación encontrándose en estadios de mórula y blastocisto temprano, estos fueron de calidad buena y excelente (Grégoire, Peredo, et al., 2012). La sincronización y superovulación con hMG sugiere que los embriones transitan más rápidamente en los oviductos de las hembras tratadas (Grégoire et al., 2010).

2.7. Desarrollo embrionario y características de embriones.

Aproximadamente 3,5 días después de la fertilización, el embrión en etapa de ocho células llega al útero, pierde la zona pelúcida y se implanta a los 6 días (Chavatte-Palmer & Guillomot, 2007). En hembras a las que se le ha sometido a un protocolo de superovulación se puede obtener embriones en diferentes estadios de desarrollo en el mismo día de recuperación en comparación con hembras no tratadas: en el día 2,5 de después del apareamiento, se puede encontrar embriones de una a ocho células (Dorsch et al., 2008).

En el día 4,5 se puede observar estadios de cuatro células a mórula en cobayas de forma natural y estadios de ocho células a blastocistos en hembras superovuladas. En el día 6,5 principalmente podemos encontrar estadios tempranos de blastocisto de hembras no tratadas, y pueden estar ausentes estadios de preimplantación en los oviductos en animales superovulados. Tras el examen microscópico, todos los embriones parecían estar morfológicamente intactos (Dorsch et al., 2008).

Embriones de 14 y 18 días. A los 14 días se puede observar células no diferenciadas. A los 18 días las curvaturas cervicales y cráneo-caudales se acentúan dándoles forma de "C". La región cefálica se presenta más desarrollada que la región caudal, además la piel es fina y transparente. En la región cefálica aparecen estructuras primitivas, como vesículas encefálicas (prosencefálicas, mesencefálicas y rombencefálicas) y arcos faríngeos en desarrollo. Las somitas están delimitadas y las podemos apreciar dorsalmente en la región caudal. La cola es larga y curva. También encontramos los brotes de los miembros torácicos y pélvicos (Viana et al., 2019).

Materiales y métodos

3.1. Materiales

Físicos	Biológicos
Jeringas de 1, 5, 20 y 60 ml	Cobayos (hembras y machos)
Gautes de nitrilo	Útero
Torundas	Ovarios
Caja de bisturí 22G	Embriones
Equipo de disección	
Catéteres de 16G	
Agujas hipodérmicas 24G	
Tubos de microcentrífuga eppendorf (780xxx Series, Labomera S.A.)	
Toalla desechable	
Recipientes ámbar estéril 30ml	
Cooler	
Gel refrigerante	
Químicos	Laboratorio
Progesterona (Altrenogest, Regumate®, MSD, España)	Estereomicroscopio
Gonadotropina menopáusica humana (hMG, Merional, Laboratorios CORNE, S.A. de C.V, México)	Cajas petri de inspección cuadrículada
Solución jabonosa de yodo	Platina de calefacción
Solución salina taponada de fosfato (PBS)	Gradilla de laboratorio
Suero fetal bovino	Puntas para pipeta
Pentobarbital sódico (Penta-Hypnol®, Agrovetmarket, Perú)	Pipetas automáticas
Alcohol 70%	

3.2. Metodología

3.2.1. Ubicación

La presente investigación se realizó de manera simultánea en la granja de “Irquis” y el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Cuenca, ubicados en el km 23 de la vía Cuenca - Girón, a la altura de la Parroquia Victoria del Portete; latitud $-3^{\circ}4'48''$ y longitud $-79^{\circ}4'31''$, y se encuentra a una altitud de 2.663 m.s.n.m. La precipitación media anual es de 789 mm; y posee temperaturas que oscilan entre 10 y 15 °C.



Figura 3. Ubicación geográfica Granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de: Google Earth (2020).

3.2.1.1. Diseño y preparación de las unidades experimentales

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio; para ello, se utilizaron 21 hembras de edad media de 100 ± 5 días con un peso medio de 800 a 1150 gramos, provenientes de un núcleo de cobayos de diferentes cruces de líneas Perú, Inti y Andina, que fueron distribuidas en tres tratamientos.

Las hembras estuvieron en un periodo de adaptación de diez días en la granja de Irquis que incluyó el manejo similar en la alimentación con un concentrado formulado siguiendo las especificaciones nutricionales para cumplir con el 100% de los

requerimientos de esta especie según Guinea Pig Diet 5025 (NCR, 1995). Durante este periodo, todas las hembras fueron alojadas en una misma poza de 3,0 x 2,5m (Anexo A). Asimismo, todas las hembras de cada grupo experimental fueron sometidas a un protocolo de sincronización que consistió en la administración oral de Altrenogest (P₄) a una dosis de 0,22 mg/kg (Regumate®, MSD, España) durante 15 días (Anexo D). Después de este periodo de sincronización, las hembras fueron distribuidas de manera aleatoria en una poza dividida en tres secciones, una para cada grupo experimental, y cada sección permitió albergar a 2 animales, a continuación, se describe los tres grupos experimentales:

- A-hMG (n=7) recibió una dosis de 5 UI/kg/día de gonadotropina menopaúsica humana (hMG, Merional, Laboratorios CORNE, S.A. de C.V, México) los días 13, 14 de sincronización y 15 coincidiendo con el retiro del P₄ (Figura 4A);
- D-hMG (n=7) las hembras recibieron la misma dosis diaria de hMG, empezando el día 15 de la sincronización (coincidiendo con el retiro del P₄) y los días 16 y 17 postsincronización (Figura 4B), y;
- Control (n=7) las hembras no recibieron ninguna dosis de hMG, fue considerado grupo control (Figura 4C).

El día del retiro del P₄ se introdujo un macho a relación de 1:2 para favorecer la monta, además a todas las hembras se les revisó diariamente la apertura de la membrana vaginal desde el momento de ingreso del macho, esto fue referencia para determinar el día de inicio del celo, luego de $5,2 \pm 0,5$ días después del apareamiento (apertura de la membrana vaginal), se procedió al sacrificio de las hembras para recolectar las estructuras a través del lavado de oviductos y útero para luego ser clasificadas. Además, se valoró los diámetros de cada ovario para determinar el volumen ovárico (VO) y también se valoró el número y diámetro de cuerpos lúteos y folículos visualizados.

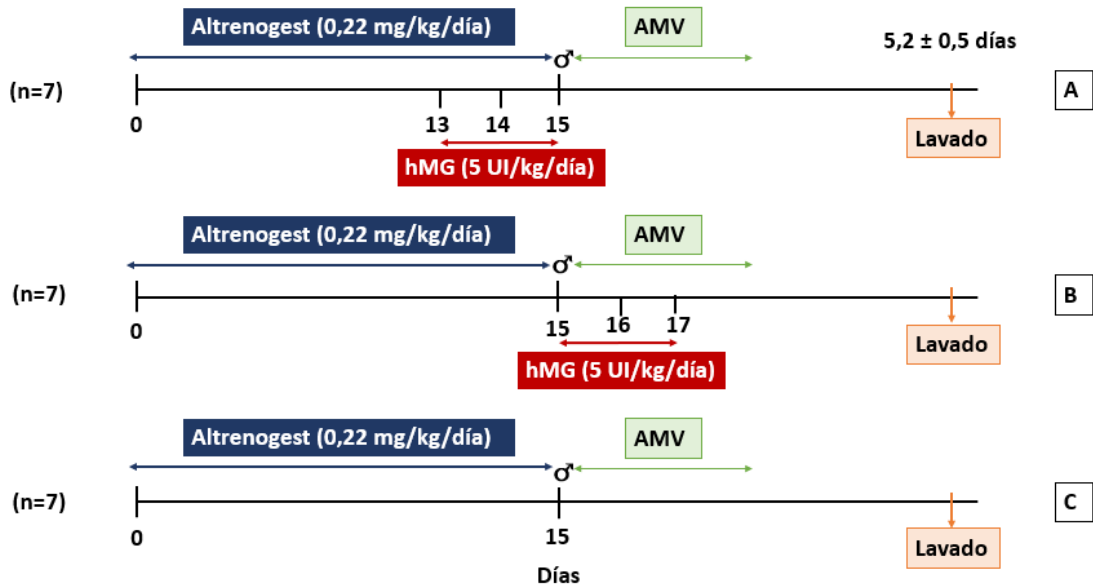


Figura 4. Protocolos de sincronización de los grupos experimentales. A-hMG, administración de hMG antes del retiro del P₄ (panel A). D-hMG, administración de hMG después del retiro de P₄ (panel B). Control, no recibe hMG (panel C).

3.2.2. Revisión de apertura vaginal

El monitoreo de la membrana vaginal se realizó dos veces al día: la primera se realizó en horas de la mañana (7am) y la segunda, en horas de la tarde (7pm), para este procedimiento se siguió la metodología propuesta por (Wilson et al., 2021), que 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 está “cerrada” o “abierta” (Anexo F; Figura 5); al visualizar la apertura de la membrana vaginal, se registró la fecha y la hora en la que se observó la apertura de la membrana vaginal (Wilson et al., 2021).

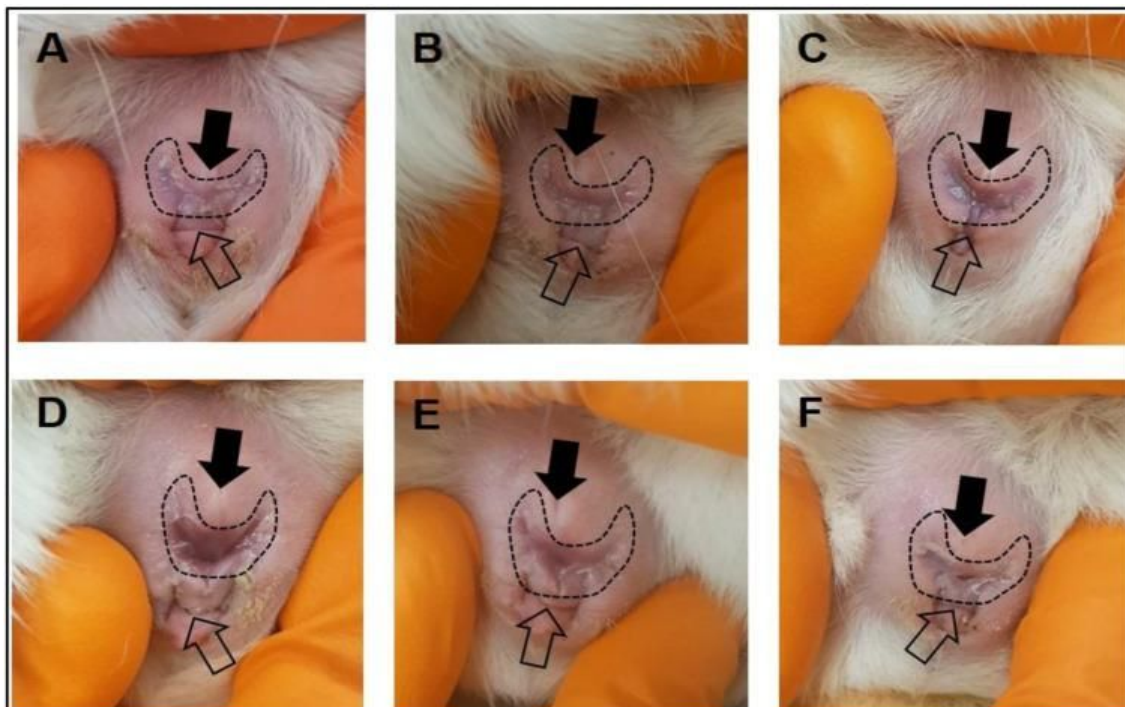


Figura 5. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal. Durante el período de latencia del ciclo estral, la membrana se ve cerrada (A, B). Cuatro a cinco días antes de la ovulación, cambia la coloración de la membrana vaginal, signo de una posible perforación de la misma (C). Al momento de la ovulación, se perfora la membrana vaginal y aumentan las secreciones vaginales (D). Tras la ovulación, la membrana vaginal comienza a cerrarse (E, F) (Wilson et al., 2021).

3.2.3. Lavado de oviductos, útero y recuperación de estructuras

Todas las hembras fueron sacrificadas en el día $5,2 \pm 0,5$ días después de la comprobación de la apertura de la membrana vaginal, siguiendo la metodología establecida en el manual S.E.A Animalario OMG (2005), que consiste en la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico de 100 - 150 mg/kg (Penta-Hypnol®, Agrovvetmarket, Perú) (Salamanca, 2005).

Para el lavado del tracto reproductor de la hembra se siguió la metodología descrita por (Shi, Mochida, et al., 2000), que brevemente, consistió en rasurar la zona del abdomen y desinfectarlo con una solución jabonosa de yodo, las hembras se colocan en decúbito dorsal y se realiza una incisión de 4 cm a lo largo de la línea alba, posteriormente se localiza todo el tracto reproductivo de la hembra incluido los ovarios y se lo extrajo. El útero y los ovarios se colocaron en una solución salina buferada de fosfato (PBS) suplementado con suero fetal bovino y mantenida a 37 °C hasta llevarlo al laboratorio para su posterior lavado (Anexo G).

Para el lavado de los oviductos y útero se utilizó la misma solución buferada de 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 30 G (0,30 mm de diámetro), fijar la aguja y adaptarla a una jeringa para lavar por tres ocasiones, este mismo procedimiento se realizó en los cuernos uterinos (Figura 6).

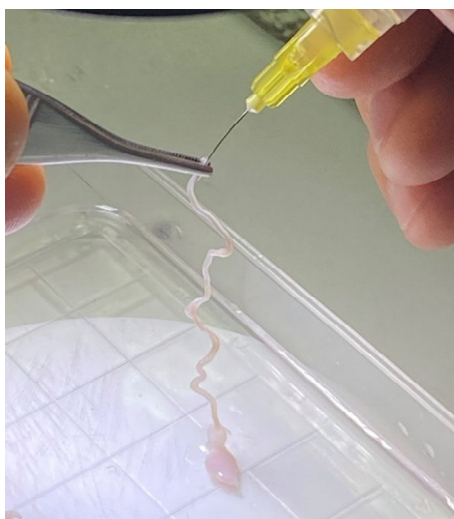


Figura 6. Proceso de lavado de los oviductos y cuernos uterinos.

3.2.4. Evaluación morfológica y calidad de estructuras colectadas

La valoración y clasificación morfológica de las estructuras se realizó siguiendo la metodología descrita por Shi *et al.* (2000) y Suzuki *et al.* (2000) que consiste en evaluar las estructuras bajo la luz de un estereomicroscopio (50 a 100x OLYMPUS SZ61). Y clasificarlas en primera instancia en ovocitos sin fecundar y embriones; luego de la primera clasificación, se visualizó la viabilidad del embrión, que se evaluó a través de su etapa de desarrollo con relación del día de inicio de celo y considerada la etapa en la que ocurre la ovulación (Shi, Mochida, et al., 2000).

Posteriormente, se evaluó la calidad de los embriones siguiendo la clasificación recomendada por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, *por sus siglas en inglés*) Stringfellow *et al.* (1998); Lonergan *et al.* (1991), y adaptándolo a nuestro estudio, según las indicaciones de Suzuki *et al.* (2000) y Suzuki *et al.* (1993) en estructuras aptas y no aptas.

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

Los ovarios recuperados fueron colocados sobre un papel milimétrico y medidos bajo el lente de un estereomicroscopio (50 a 100x OLYMPUS SZ61). Y se procedió a tomar fotografías de estos para posteriormente medir con mayor precisión en un programa informático ImageJ, Java. (Anexo J).

En la superficie ovárica se procedió a cuantificar el número de cuerpos lúteos (CLs), folículos y el diámetro de estos para valorar la respuesta al tratamiento superovulatorio (Anexo H). En este mismo, sentido se calculó el volumen ovárico en mm^3 , para esto se utilizó la metodología descrita por Penitente *et al.* (2015), que consiste en medir el ovario en tres planos (largo, ancho y profundidad) como se puede observar en la Figura 7 y posterior aplicar la siguiente formula: **Volumen ovárico (mm^3) = $0,5 \times D1 \times D2 \times D3$** (Penitente et al., 2015).

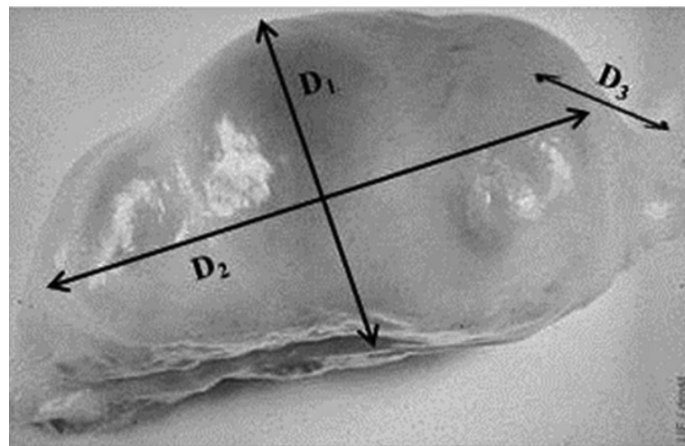


Figura 7. Esquematización de la medición del volumen ovárico. Adaptado de Penitente *et al.* (2015).

Finalmente, para calcular el diámetro del cuerpo lúteo (CL) y folículos, se midió utilizando dos planos: largo x ancho (Figura 8), y se obtuvo la media de las dos dimensiones ($D1$ y $D2$); y posteriormente, se expresó en unidades de mm, es decir, **diámetro (mm) = $(D1+D2)/2$** (Penitente et al., 2015).

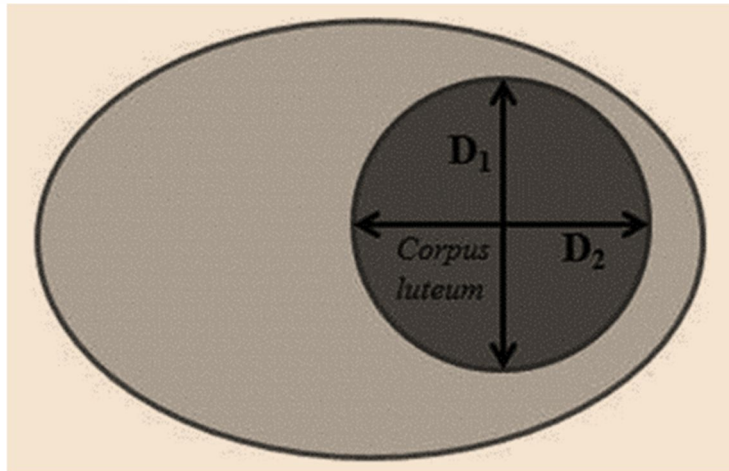


Figura 8. Representación de la medición del diámetro del CL. Adaptado de Penitente *et al.* (2015).

3.2.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente se analizaron mediante el paquete estadístico STATISTICA® 12.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, EE. UU.). Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos numéricos de todas las variables (muestra menor a 50), como en este caso los datos numéricos no siguieron la distribución normal, estos fueron transformados a base Log-10 antes del análisis estadístico paramétrico. Los efectos de la administración de hMG 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) y para determinar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba Post-Hoc de Diferencia Mínima Significativa (DMS). 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 $p < 0,05$ y los que estén entre 0,051 y 0,10 se consideraron como tendencia estadística.

Resultados

4.1. Clasificación de estructuras recuperadas

La administración de la hormona hMG incrementó significativamente ($p < 0,05$) el número de cuerpos lúteos en el grupo D-hMG $17,1 \pm 5,4$ en comparación con el grupo A-hMG $4,5 \pm 0,6$ y control $3,0 \pm 0,7$ (Figura 9A); y el número total de estructuras recuperadas (embriones y ovocitos sin fecundar) el día $5,2 \pm 0,5$; fue mayor en el grupo D-hMG: $6,2 \pm 1,8$, en comparación con el grupo A-hMG: $2 \pm 1,1$ y control: $2 \pm 1,4$ (Tabla 3; $p < 0,05$).

La media de embriones difirió entre grupos, siendo el grupo D-hMG: ($6,3 \pm 2,3$) el que tuvo un mayor número de embriones en comparación con el grupo A-hMG: ($1,6 \pm 1,1$) y control: ($3 \pm 0,1$; $p < 0,05$); sin embargo, la calidad de las estructuras divididas en aptos y no aptos no difiere entre los diferentes tratamientos (Tabla 3; $p > 0,05$). El diámetro de los cuerpos lúteos (CLs) observados en el día del sacrificio no fue afectado por la aplicación o no de hMG (A-hMG $1,07 \pm 0,26$; D-hMG $0,77 \pm 0,13$; C $0,54 \pm 0,08$. Figura 9B; $p > 0,05$).

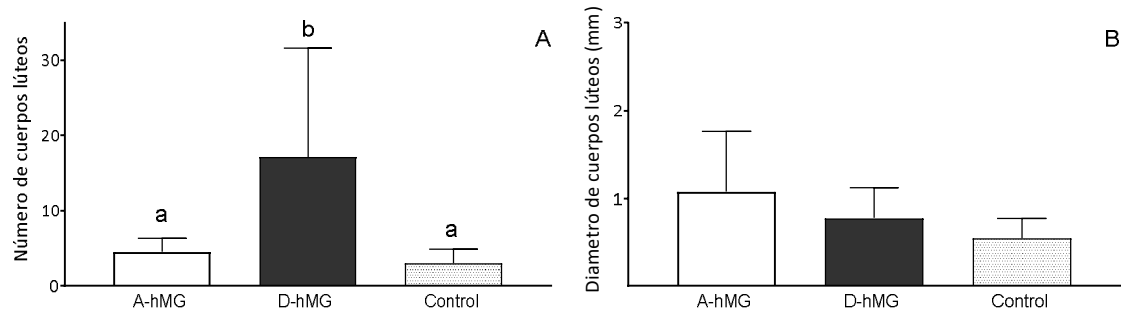


Figura 9. Número de cuerpos lúteos (panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG). Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$).

Tabla 3. Clasificación de estructuras de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopaúsica humana (hMG).

Tratamiento	n	Tipo est					c-est	
		est-t	e	ufo	mor	blast	aptos	no aptos
A-hMG	7	2±1,1 (8)a	1,6±1,1 (5)a	3	5	0	1,6±1,1 (5)	3,0±1,0 (3)
D-hMG	7	6,2±1,8 (25)b	6,3±2,3 (17)b	6	17	2	3,0±1,4(6)	4,7±2,0 (19)
C	7	2±1,4 (4)a	3±0,1 (3)a	1	3	0	2±1,0(2)	1,0±1,0 (2)

n= número de cobayas; est-t= estructuras totales; e= embriones; ufo= ovocito sin fecundar; tipo est= tipo de estructuras; mor= mórula; blast= blastocisto; c-est= calidad de estructuras. Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). Los valores entre paréntesis corresponden al número de estructuras recuperadas.

4.2. Efectos de la administración de hMG sobre el desarrollo folicular

El número total de folículos observados en cobayas en el día del sacrificio fueron significativamente diferentes entre tratamientos (p<0,05). El grupo D-hMG y control tuvieron un número menor de folículos en comparación con el grupo A-hMG (D-hMG 1,0 ± 0,0; C 1 ± 0,0 vs. A-hMG 2,5 ± 0,5, Figura 10A; p>0,05). Sin embargo, el diámetro de los folículos obtenidos no difirió significativamente entre los tres grupos (A-hMG 4,4 ± 0,31; D-hMG 7,28 ± 4,6; C 7,24 ± 3,4; Figura 10B; p>0,05).

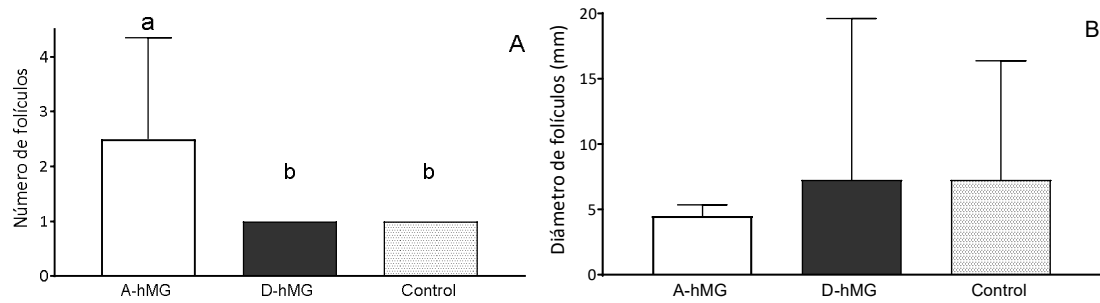


Figura 10. Número de folículos (panel A) y diámetro de folículos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG). Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05).

4.3. Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas

Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humanas (hMG).

	n	X ± DE	95% del intervalo de confianza para la media	
			Límite inferior	Límite superior
AMV-A (h)	7	145,88 ± 29,05	121,59	170,17
AMV-D (h)	21	105,59 ± 35,13	90,01	121,17
VO (mm ³)	21	115,14 ± 55,8	90,4	139,88
CLs	21	9,35 ± 11,19	3,6	15,11
DCLs (mm)	21	0,83 ± 0,47	0,58	1,07
FOLs	21	1,42 ± 0,78	0,7	2,15
DFOLs (mm)	21	45,33 ± 5,26	1,61	11,34

AMV-A = número de horas transcurridas desde la aplicación de hMG hasta la AMV. AMV-D = 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.

Las diferentes características ováricas y de conducta estral de las hembras en las que se incluye: AMV, número y diámetro de estructuras ováricas, se resumen en la tabla 4. La apertura de la membrana vaginal de todas las cobayas (21)

después del retiro de la fuente de P₄ se dio a las $105,59 \pm 35,13$ horas (Tabla 4) y este no fue diferente entre grupos (A-hMG $97,88 \pm 10,27$; D-hMG $108,75 \pm 14,08$ y C $111,67 \pm 16,46$; Figura 11A). Y en este mismo sentido, la AMV, considerada desde el momento de la aplicación de la hMG no difirieron significativamente entre grupos tratados (Figura 11B; $p > 0,05$), por lo tanto, las hembras demostraron conducta estral en un periodo de tiempo similar.

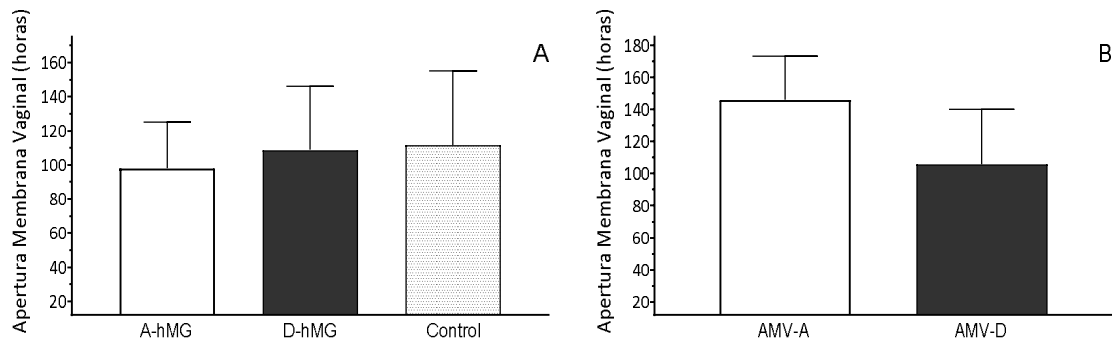


Figura 11. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal (AMV) de cobayas desde el retiro de la fuente de P₄ (Altrenogest) hasta la manifestación de celo (panel A); Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Monitoreo de la apertura de membrana vaginal de cobayas desde el inicio de la aplicación del tratamiento con hMG hasta la manifestación de celo (panel B); AMV-A = número de horas transcurridas desde la aplicación de hMG hasta la AMV, AMV-D = número de horas transcurridas desde el retiro de la fuente de progestágeno hasta AMV. Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$).

La evaluación de las características morfológicas del ovario demostró que el valor medio del volumen ovárico de todas las hembras del estudio fue de $115,14 \pm 11,89$ mm³. No obstante, la aplicación o no de hMG no mostró un efecto sobre esta variable medida entre grupos (A-hMG $113,72 \pm 13,02$; D-hMG $133,31 \pm 26,22$; C $92,8 \pm 19,75$. Figura 12; $p > 0,05$).

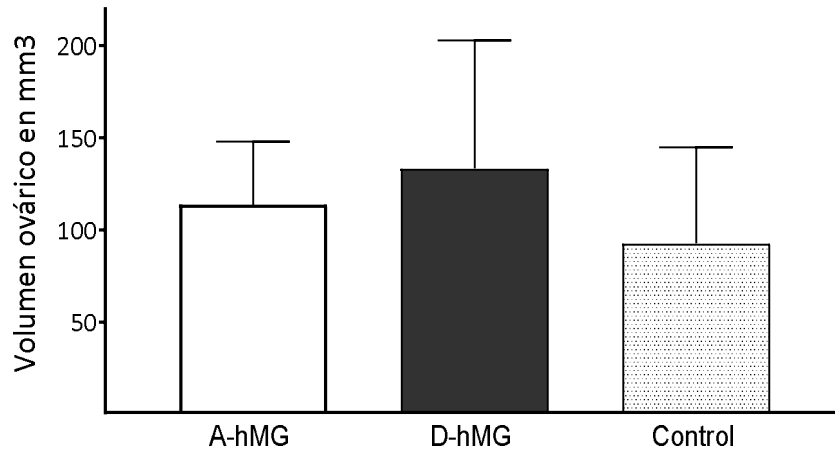


Figura 12. Volumen ovárico (VO) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG). Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG antes del retiro de progesterona (A-hMG), Cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de hMG después del retiro de progesterona (D-hMG), y Cobayas sin aplicación de hMG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la aplicación intraperitoneal de 5 UI/kg/día de gonadotropina menopaúsica humana (hMG), durante tres días consecutivos iniciando en el día del retiro de la fuente de P₄ (D-hMG), como parte de un protocolo de sincronización provocó un efecto positivo sobre la respuesta ovárica, y por consiguiente sobre el incremento del número de estructuras recuperadas (embriones y ovocitos sin fecundar); este incremento se puede explicar por la observación de un mayor número de cuerpos lúteos formados. Sin embargo, el tipo y la calidad de los embriones obtenidos después de la clasificación (embriones diferenciados de ovocitos sin fecundar) no se vieron afectados por la hMG, por lo tanto, fueron similares, así como las características morfológicas del ovario (volumen ovárico y número de folículos).

Después de la administración de hMG, en el día del retiro de la fuente de P₄ (D-hMG) se obtiene cuatro veces más embriones ($6,3 \pm 2,3$) en comparación con el grupo A-hMG ($1,6 \pm 1,1$) y control ($3 \pm 0,1$; Tabla 3), así mismo, en este grupo se observó un mayor número de cuerpos lúteos. El número de embriones obtenidos en el presente estudio son comparables a los resultados reportados por otros autores: $5,4 \pm 1,56$ embriones (Suzuki et al., 2003), y en hembras con ovulación natural se obtuvieron $3,6 \pm 0,1$ embriones (Suzuki et al., 1993). La eficacia de la inducción de la ovulación por hMG fue similar a lo reportado para el suministro de LH a través de una minibomba osmótica $5,3 \pm 0,7$ embriones (Garza et al., 1984) y para el tratamiento con antisuero contra la LH $5,6 \pm 0,6$ embriones (Terranova & Greenwald, 1981).

Además, una posible explicación de que la hormona hMG sea un mejor inductor de la superovulación se debe a la alta afinidad por el receptor de FSH en los folículos de cobaya, ya que existe una similitud entre la secuencia de aminoácidos del receptor para FSH en las células de la granulosa del folículo de la cobaya en comparación con el receptor de FSH de otras especies en la que se incluye los primates, cabe mencionar que la hMG posee acción FSH y LH (Grégoire, Peredo, et al., 2012; Suzuki et al., 2003). Igualmente, se ha demostrado que la administración de hMG durante la etapa preovulatoria (similar a la obtenida en nuestro estudio a través de la sincronización con P₄), aumenta el número de ovocitos y por ende el número de embriones, en comparación con la administración de hMG que se la realiza en etapa lútea media ($5,4 \pm 1,6$ vs. $3,6 \pm 0,1$; $p < 0,05$) (Suzuki et al., 1993).

Dos estados embrionarios fueron obtenidos en el día $5,2 \pm 0,5$ después de la administración de D-hMG (mórulas y blastocistos), sin embargo, la cantidad de mórulas fue mayor (25 vs. 2), y de estos embriones obtenidos después de evaluar la morfología solo $3,0 \pm 1,4$ embriones fueron considerados como aptos lo que podría sugerir que la administración de hMG podría tener un efecto negativo sobre la calidad del embrión de cobayos, pero para hacer esta afirmación, es necesario el desarrollo de más estudios específicos que confirmen esta hipótesis.

Asimismo, se ha demostrado que la colecta de embriones se los puede realizar los días 1, 3, 4 y 5 después de la comprobación de la apertura de membrana vaginal (indicativo de manifestación de celo y cubrición) y que las características morfológicas de estos se relacionan con estadios de 4, 8, 16 y 32 células y que estos dos últimos corresponden a los estadios de desarrollo de mórula y blastocisto (Ueda et al., 1998), estos dos últimos estados de desarrollo embrionario reportado en este estudio, lo que sugiere que el día que se realizó el lavado de oviductos y útero es el adecuado para obtener estructuras antes de su implantación.

Existen otros estudios en los que se ha podido recolectar embriones los días 2,5; 4,5 y 6,5 después de administrar una dosis de 5 UI de hMG, no obstante, según las conclusiones de este estudio se determinó que el mejor día para obtener embriones está entre el día 4 a 5, a pesar de que el día 6,5 aún se puede encontrar mórulas y blastocistos antes de su implantación, pero que la calidad de estos se ve afectada cuando se acercan a la etapa de implantación en el útero (Dorsch et al., 2008) y que la calidad embrionaria se podría ver afectada aún más si se administra un tratamiento hormonal superovulatorio, en otras palabras, los embriones podrían transitar más rápidamente en los oviductos en aquellas hembras tratadas (Dorsch et al., 2008; Grégoire et al., 2010), por alguna perturbación del estado hormonal que altere el eje hipotálamo hipófisis gonadal debido a la exposición prolongada a altos niveles de hMG y por consiguiente altere el ambiente del oviducto (Shi, Mochida, et al., 2000).

El mantenimiento del medio uterino, maduración de ovocitos y desarrollo de embriones está influenciado por los niveles de hormonas esteroideas, factores intraováricos y factores de crecimiento (Lonergan, 2011). Salehnia y Zavareh (2013) concluyen que la concentración de P_4 podría ser un factor de supervivencia embrionaria y que mejora el desarrollo e implantación embrionaria *in vivo* (Salehnia & Zavareh, 2013). Adicionalmente, la P_4 participa en la regulación de las secreciones endometriales esenciales para estimular y mediar en los cambios en el endometrio uterino además del

crecimiento y la diferenciación del embrión a lo largo del desarrollo embrionario temprano (Lonergan et al., 2016).

A pesar de haber tenido una excelente respuesta ovárica medido a través del total de cuerpos lúteos visualizados (D-hMG $17,1 \pm 5,4$ A-hMG $4,5 \pm 0,6$ y control $3,0 \pm 0,7$; Figura 9A), la recuperación de embriones en el día $5,2 \pm 0,5$ no fue la esperada en el grupo D-hMG. Se ha reportado que en ocasiones el número de ovulaciones medido a través del total de cuerpos lúteos no siempre corresponde con el total de embriones implantados en el día 7 a 8 después de la ovulación (Araníbar & Echevarría C, 2014), lo que permite sugerir que podría existir un alto porcentaje de óvulos que no lleguen a ser fecundados o que se pierdan después de la ovulación en esta especie (Araníbar & Echevarría C, 2014) por incapacidad del infundíbulo de capturar todos los ovocitos. Se ha reportado infertilidad en ratones debido a una falla en la recolección de ovocitos; los ovocitos luego de ser liberados por el ovario se acumulaban en la cavidad bursal y no entraban en el oviducto (Yuan et al., 2021). Cabe mencionar que la motilidad que generan los cilios es esencial para el transporte de ovocitos, en ratones cada COC posee un diámetro de $400 \mu\text{m}$ para un solo ovocito (Chen et al., 2016), es 80 veces más grande que la longitud promedio de $5,1 \mu\text{m}$ de los cilios (Yuan et al., 2021). Por lo tanto, debe necesitarse muchos cilios, trabajando en conjunto, para transportar COC's en mayor cantidad y/o tamaño. Investigadores han observado la existencia de una interrupción del transporte de ovocitos al oviducto que podría estar involucrada en las menores tasas de recuperación de embriones por ovulación observadas en yeguas superovuladas (Carmo et al., 2006). Esto podría explicar en una pequeña parte el por qué en nuestro estudio a pesar de haber tenido una cantidad elevada de cuerpos lúteos no se obtuvo un similar número de embriones, adicionalmente el oviducto de los mamíferos sufre cambios fisiológicos y bioquímicos encaminados a la optimización del microambiente para el transporte y fertilización de ovocitos (Buhi et al., 2000).

La administración de hMG se ha utilizado en humanos como tratamiento para la infertilidad (Lehert et al., 2010) con excelentes resultados, mientras que en ratas (Dostal et al., 1996) y ratones (Edirisinghe et al., 1986) se ha utilizado para provocar superovulación y obtener un mayor número de embriones, para ser utilizados en estudios de desarrollo embriológico en diferentes momentos de tiempo antes de la implantación de estos en el lumen uterino; la actividad endocrinológica de la hMG es FSH y LH, por lo tanto se espera que funcione como LH y tenga la capacidad de inducir la ovulación de folículos preovulatorios, la eficacia del tratamiento con hMG para inducir superovulación en las hembras de nuestro estudio fue excelente cuando se administró

la hormona en el momento de la supresión del progestágeno (grupo D-hMG), sin embargo, la administración de hMG días antes de la supresión de P₄, no provocó una respuesta superovulatoria esperada, una posible explicación a esta variación se puede deber a que durante la aplicación de las diferentes dosis de hMG estas hembras aun tenían niveles plasmáticos altos de P₄, lo que ocasionó que exista un pobre desarrollo folicular y por ende una respuesta superovulatoria baja medido a través del número de cuerpos lúteos (A-hMG 4,5 ± 0,6) y embriones colectados (1,6 ± 1,1), incluso esta repuesta fue menor a la encontrada en el grupo control: cuerpos lúteos (3,0 ± 0,7) y embriones (3 ± 0,1), o quizás se deba a otros mecanismo inhibitorios externos (nutrición, manejo, , periodo), fisiológicos (especie, edad, fertilidad, dinámica folicular) y genéticos (raza) que ocasionen esta baja respuesta (Jiménez, 2009); sin embargo, es necesario el desarrollo de otros estudios que confirmen esta hipótesis.

Se ha reportado que la administración de hMG en la etapa lútea media (sin previa sincronización del ciclo estral), no ocasiona la ovulación, a pesar de que existe un número considerable de folículos presentes en el ovario, esta respuesta puede deberse a la alta concentración plasmática de P₄ que secreta el/los cuerpos lúteos activos (Suzuki et al., 2003), en nuestro estudio se observó que las hembras A-hMG tenían un desarrollo folicular pero una pobre respuesta de cuerpos lúteos. Con esto se puede afirmar que la hembra cobaya pudiera ser un excelente modelo animal para el estudio de los efectos del cuerpo lúteo activo sobre la inducción de la ovulación en otras especies (Suzuki et al., 2003).

En vacas se conoce que los tratamientos superovulatorios con FSH-p y FSH-o se basa en la aplicación de esta hormona en dosis crecientes-decrecientes, con niveles altos de P₄ durante los días de aplicación, esto ocasiona un adecuado desarrollo folicular y una respuesta ovárica satisfactoria, esto quizás se deba a el tipo de hormona usada (Fonseca et al., 2001; Takedomi et al., 1995), diferente a la usada en nuestro estudio (hMG) o al hecho de que en estos animales el crecimiento folicular es dinámico (oleadas de crecimiento folicular) (Borges ÁM, Torres CA, Ruas JR, Rocha Júnior VR, 2001), diferente al crecimiento folicular bifásico que tienen las cobayas (Bland, 1980; Hamilton & Tam, 1990).

El tiempo de apertura de la membrana vaginal (AMV) no difirió entre tratamientos después de la supresión de P₄, este periodo de tiempo concuerda con lo descrito en el estudio realizado por (Grégoire et al., 2010); en el cual se aplicó el progestágeno durante 20 días y todas las hembras presentaron signos de celo luego de 4-5 días del retiro de la fuente de P₄, se comprobó mediante la AMV y comportamiento receptivo hacia el

macho. Por lo tanto, aunque no existen diferencias significativas por la aplicación de hMG, podemos demostrar que la administración diaria de P₄ por vía oral permite la sincronización de celo en los cobayos. Cabe resaltar que en nuestro estudio este procedimiento se realizó durante sólo 15 días (Grégoire, Allard, et al., 2012). En otro estudio se administró dos inyecciones intramusculares de luprostiol (análogo sintético de prostaglandinas) con un intervalo de 10 días para la sincronización de celo, el mismo que se manifestó 2 a 3 días después (Grégoire et al., 2010). Desde este punto de vista, la AMV puede variar dependiendo del método de sincronización que apliquemos, sin considerar la administración de hMG para ocasionar superovulación.

Conclusión

La administración intraperitoneal de hMG a una dosis de 5 UI durante tres días consecutivos iniciando el día de la supresión de P₄ provoca un efecto superovulatorio en cobayas y por lo tanto sobre el número de cuerpos lúteos observados y de embriones recuperados.

La administración intraperitoneal de hMG a una dosis de 5 UI durante tres días consecutivos iniciando el día de la supresión de P₄ no ocasiona variaciones significativas en el tiempo de aparición del celo, lo cual se evidenció por medio de la observación de la apertura de la membrana vaginal y el comportamiento receptivo de la hembra.

La administración intraperitoneal de hMG a una dosis de 5 UI durante tres días consecutivos iniciando el día de la supresión de P₄ no ocasiona variaciones de las características morfológicas del ovario (volumen ovárico).

Referencias

- Araníbar, E., & Echevarría C, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 25(1), 29–36. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172014000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Armstrong, D. T., & Opavsky, M. A. (1988). Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 39(3), 511–518. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.3.511>
- Benavides, F., & Jean, G. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio : principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá.
- Bland, K. P. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 73–76. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600073>
- Blatchley, F., & Donovan, B. (1976). Effect of intra-uterine foreign bodies and of prostaglandin administration on progesterone secretion during the oestrous cycle of the guinea-pig. *Journal of Endocrinology*, 70(1), 39–45. <https://doi.org/doi:10.1677/joe.0.0700039>
- Bolivar, P., & Maldonado, J. (2008). Superovulación Y Sincronización En La Transferencia De Embriones En Bovinos : ¿ Terapéutica Basada En La Evidencia O Ausencia De Ética ? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 436–450. http://www.cundinamarca.gov.co/Cundinamarca/Archivos/FILE_ENTIDADES/FILE_ENTIDADES56133.pdf
- Borges ÁM, Torres CA, Ruas JR, Rocha Júnior VR, C. G. (2001). Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 53, 595–604. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000500015>.
- Breazile, J., & Brown, E. (1976). Anatomý. In *The Biology of the Guinea Pig* (pp. 53–62). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-730050-4.50011-9>
- Broom, D. (2000). Welfare assessment and problem areas during handling and transport. In *Livestock handling and transport*. T. Grandin, 43–61.
- Buhi, W. C., Alvarez, I. M., & Kouba, A. J. (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs*, 166(2), 165–179. <https://doi.org/10.1159/000016731>
- Callejas, S. (2001). Fisiología del ciclo estral. In *Biología de la Reproducción*. (pp. 37–53). INTA.
- Carmo, M. T., Losinno, L., Aquilar, J. J., & Araujo, G. H. M. (2006). Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. *Animal Reproduction Science*, 94(1–4), 337–339. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.080>

- Challis, J. R., Heap, R. B., & Illingworth, D. V. (1971). Concentrations of oestrogen and progesterone in the plasma of non-pregnant, pregnant and lactating guinea-pigs. *The Journal of Endocrinology*, 51(2), 333–345. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0510333>
- Chavatte-Palmer, P., & Guillomot, M. (2007). Comparative implantation and placentation. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 64(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000101742>
- Chen, X., Bonfiglio, R., Banerji, S., Jackson, D. G., Salustri, A., & Richter, R. P. (2016). Micromechanical Analysis of the Hyaluronan-Rich Matrix Surrounding the Oocyte Reveals a Uniquely Soft and Elastic Composition. *Biophysical Journal*, 110(12), 2779–2789. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.03.023>
- Cooper, G., & Schiller, A. (1975). *Anatomy of the Guinea Pig* (Harvard Un). Commonwealth Fund Publications.
- Dávila, A. P., Mora, C. F., & Córdoba, C. A. (2018). Caracterización etológica del cuy (*Cavia porcellus*) en sistemas de producción tradicional y tecnificado. *Revista Investigación Pecuaria*, 5(1), 5–15. <https://doi.org/10.22267/revip.1851.1>
- Donnelly, T. (1990). Behaviour and reproduction. In *Rabbits and rodents: laboratory animal science* (pp. 81–388). Post-Graduate Committee in Veterinary Science.
- 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>
- Dostal, L. A., Whitfield, L. R., & Anderson, J. A. (1996). Fertility and General Reproduction Studies in Rats with the HMG-CoA Reductase Inhibitor, Atorvastatin. *Toxicological Sciences*, 32(2), 285–292. <https://doi.org/10.1093/toxsci/32.2.285>
- Edirisinghe, W. R., Law, H. Y., Ng, S. C., Chia, C. M., & Ratnam, S. S. (1986). Superovulation of mice with human menopausal gonadotropin or pure follicle-stimulating hormone in combination with human chorionic gonadotropin and the effects of oocyte aging on in vitro fertilization. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3(5), 314–318. <https://doi.org/10.1007/BF01133392>
- 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. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, 845–851. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00398.2004.-We>
- Ertzeid, G., & Storeng, R. (1992). Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd*, 96, 649–655. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960649>
- Fonseca, J. F., Silva Filho, J. M., Pinto Neto, A., & Palhares, M. S. (2001). Estádios de

- desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(6), 671–676. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352001000600010>
- Franz, R., Kreuzer, M., Hummel, J., Hatt, J. M., & Clauss, M. (2011). Intake, selection, digesta retention, digestion and gut fill of two coprophageous species, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*), on a hay-only diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(5), 564–570. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01084.x>
- 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>
- Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M., & Joly, T. (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Grégoire, A., 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>
- Grégoire, A., Peredo, F., León, S., Huamán, E., Allard, A., & Joly, T. (2012). 115 First Successful Pregnancy After Embryo Transfer Into Synchronized Females in Guinea Pig (*Cavia Porcellus*). *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 170. <https://doi.org/10.1071/rdv24n1ab115>
- Hamilton, G. S., & Tam, W. H. (1990). The bimodular development of ovarian follicles in cyclic guinea pigs and differences between antral follicles developed at different phases of the cycle. *Canadian Journal of Zoology*, 68(5), 1031–1036. <https://doi.org/10.1139/z90-150>
- Hargaden, M., & Singer, L. (2012). Anatomy, Physiology, and Behavior. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 575–602). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1>
- Harkness, J. E., Turner, P. V, VandeWoude, S., & Wheler, C. L. (2010). Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents, 5th Edition. In *Wiley-Blackwell*.
- Hermreck, A., & Greenwald, G. (1964). The effects of unilateral ovariectomy on follicular maturation in the hamster. *Endocrinology*, 148(2), 171–176. <https://doi.org/10.1002/ar.1091480207>
- Jiménez, C. (2009). Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la

- respuesta superovulatoria en bovinos. *Rev. Med. Vet. Zoot*, *56*, 195–214.
- Kuhnel, 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
- Lehert, P., Schertz, J. C., & Ezcurra, D. (2010). Recombinant human follicle-stimulating hormone produces more oocytes with a lower total dose per cycle in assisted reproductive technologies compared with highly purified human menopausal gonadotrophin: A meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *8*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-112>
- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, *76*(9), 1594–1601. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012>
- Lonergan, P., Forde, N., & Spencer, T. (2016). Role of progesterone in embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(1–2), 66–74. <https://doi.org/10.1071/RD15326>
- Luna, F., Cortés, M., Flores, M., Hernández, B., Trujillo, A., & Domínguez, R. (2003). The effects of superior ovarian nerve sectioning on ovulation in the guinea pig. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *1*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-61>
- Manning, P., Wagner, J., & Harkness, J. (1984). Biology and diseases of guinea pigs. In J. Fox, B. Cohen, & F. Loew (Eds.), *Laboratory animal medicine* (pp. 149–177). Academic Press.
- NCR. (1995). Guinea Pig Diet 5025. In *LabDiet*.
- Noonan, D. (1994). The Guinea Pig, *Cavia porcellus*. *Handbook of Genetics, September 1994*, 275–307. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4470-4_13
- Penitente, J., Jimenez, C., Zolini, A., Carrascal, E., Azevedo, J., Silveira, C., Oliveira, F. A., & Torres, C. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaihō*, *86*(2), 148–152. <https://doi.org/10.1111/asj.12261>
- Portelli, C. (2013). *Superovulation and Embryo Recovery in the Guinea Pig* [Szent Istvan University]. <http://www.huveta.hu/handle/10832/973>
- Quesenberry, K. E., Donnelly, T. M., & Mans, C. (2012). Biology, Husbandry, and Clinical Techniques of Guinea Pigs and Chinchillas. In *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery* (Third Edit, Issue February 2020). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6621-7.00022-1>
- Reed, M., & Hounslow, W. (1971). Induction of ovulation in the guinea-pig. *J. Endocrinol*, *49*(2), 203–211. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0490203>

- Richardson, V. C. G. (2000). Diseases of Domestic Guinea Pigs. In *Diseases of Domestic Guinea Pigs*. <https://doi.org/10.1002/9780470693773>
- Robinson, R. (1975). The Guinea Pig, *Cavia porcellus*. In R. King (Ed.), *Handbook of Genetics* (pp. 275–307). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4470-4_13
- Sadeu, J. C., Adriaens, I., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, *68*(9), 1228–1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.028>
- Salamanca, U. de. (2005). Eutanasia (rata, ratón, hámster, cobayo). *Animalario OMG*, *2*, 4. <https://nucleus.usal.es/sites/default/files/servicios/sea/formularios/EutanasiaPNSE A4.pdf>
- Salehnia, M., & Zavareh, S. (2013). The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *International Journal of Fertility and Sterility*, *7*(2), 74–81.
- Shi, F., Mochida, K., Suzuki, O., Matsuda, J., Ogura, A., Tsonis, C. G., Gen, W., Suzuki, A. K., & Taya, K. (2000). Development of embryos in superovulated guinea pigs following active immunization against the inhibin α -subunit. *Endocrine Journal*, *47*(4), 451–459. <https://doi.org/10.1507/endocrj.47.451>
- 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>
- 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>
- 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>
- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., & Sasamoto, S. (1995). Superovulation of holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, *43*(7), 1259–1268. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00097-R](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00097-R)
- Taylor, D. K., & Lee, V. K. (2012). Guinea Pigs as Experimental Models. In *The*

Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0>

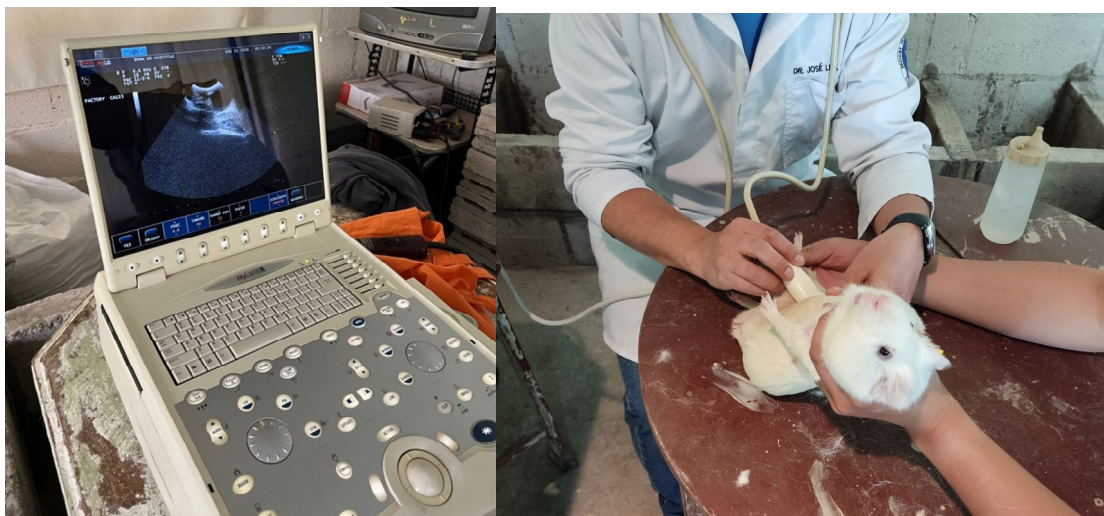
- Terranova, P. F., & Greenwald, G. S. (1981). Increased ovulation rate in the cyclic guinea-pig after a single injection of an antiserum to LH. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61(1), 37–42. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0610037>
- Ueda, H., Kosaka, T., & Takahashi, K. (1998). Intraperitoneal insemination of the guinea pig with synchronized estrus induced by progesterone implant. *Experimental Animals*, 47(4), 271–275. <https://doi.org/doi:10.1538/expanim.47.271>
- Viana, D. C., dos Santos, A. C., Silva, F. M. O. e., Favaron, P. O., Alcântara, D., Assis-Neto, A. C. de, & Miglino, M. A. (2019). Skin development in 14 to 60-day-old guinea pig fetus. *International Journal of Morphology*, 37(2), 416–422. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000200416>
- Vivas, J., & Carballo, D. (2013). Especies alternativas manual de crianza de cobayos. In *Repositorio UNA* (Vol. 1, Issue 1). <https://cenida.una.edu.ni/textos/nl01v856e.pdf>
- Voss, R. (1979). Rodents, Male Accessory Glands and the Evolution of Copulatory Plugs in. *Occasional Papers in Zoology, University of Michigan*, 689, 1–27. <https://hdl.handle.net/2027.42/57125>
- Weir, B. (1974). Reproductive characteristics of hystricomorph rodents The Biology of Hystricomorph Rodents. In I. Rowlands & B. Weir (Eds.), *The Biology of Hystricomorph Rodents* (pp. 265–301). London: Zoological Society of London-Academic Press.
- 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>
- Yuan, S., Wang, Z., Peng, H., Ward, S. M., Hennig, G. W., Zheng, H., & Yan, W. (2021). Oviductal motile cilia are essential for oocyte pickup but dispensable for sperm and embryo transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102940118>

Anexos

Anexo A. Periodo de adaptación de las cobayas (15 días)



Anexo B. Ecografía para descartar hembras preñadas



Anexo C. División de los grupos experimentales



Anexo D. Sincronización de los cobayos



Anexo E. Administración de hMG intraperitoneal



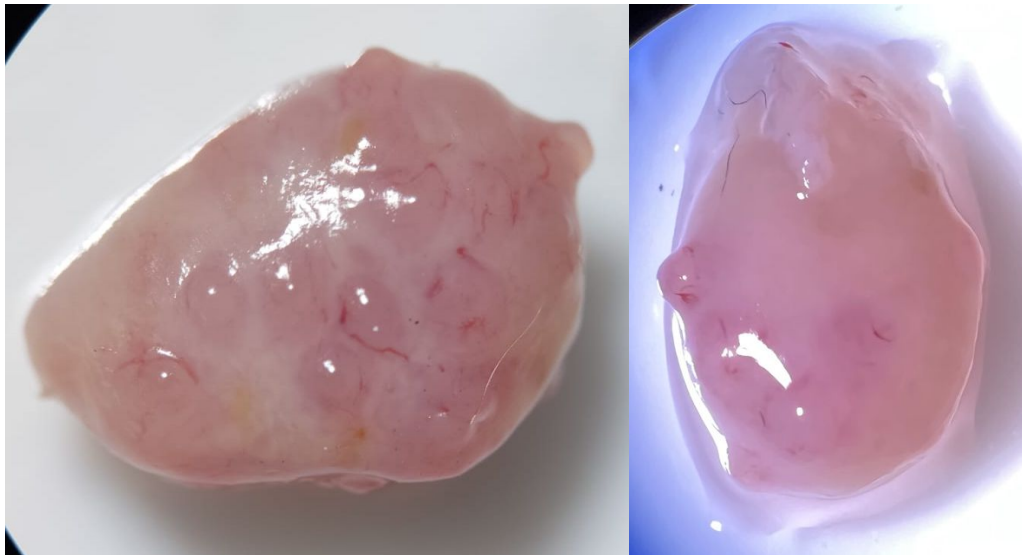
Anexo F. Verificación de la apertura de la membrana vaginal



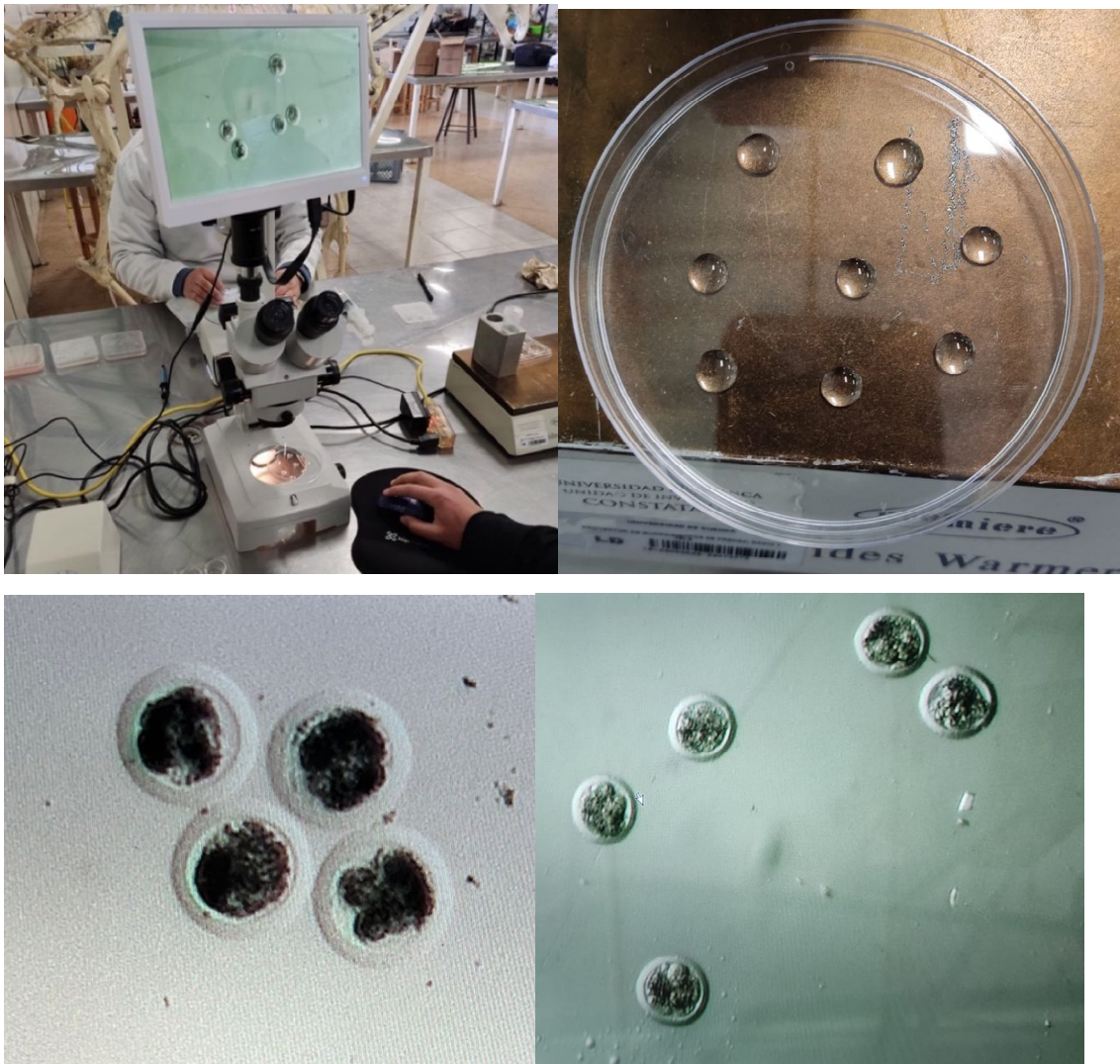
Anexo G. Extracción y lavado de aparato reproductor



Anexo H. Cuantificación de cuerpos lúteos y folículos



Anexo I. Recuperación de estructuras



Anexo J. Obtención del diámetro de ovarios mediante software ImageJ

