

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Caracterización morfológica y funcional de ovocitos de cobaya en dos estadios del ciclo estral

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


Autor:

Edisson Fernando Bravo Vega

Katherine Marisol Castro Calle

Director:

Fernando Pedro Perea Ganchou

ORCID:  0000-0001-8301-6339

Cuenca, Ecuador

2023-07-03

Resumen

Se estudiaron las características morfológicas y funcionales de ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC y estadio del ciclo estral. Se utilizaron 40 cobayas, sincronizadas con progesterona oral (Regumate®) durante 15 días. Los ovarios se colectaron en estadio periovulatorio (día 2) y diestro (día 9) post-sincronización, y el 100% de los COC's se categorizaron por su morfología en A, B y C. Se determinó la distribución mitocondrial (DM), estatus nuclear, diámetro ovocitario y grosor de la zona pelúcida (ZP), y en un 50% de estos, se aplicó la tinción Azul Brillante de Cresilo (BCB). Se obtuvieron 1053 COCs (49,9% periovulatorio y 50,1% diestro). De estos, el 23% fueron A, el 47,5% B y el 29,5% C. se determinó que en el estadio periovulatorio existió un mayor porcentaje de BCB+, mientras que en el estadio de diestro se obtuvo un mayor porcentaje de BCB-. Tanto en el estadio periovulatorio y diestro, la DM difusa tuvo un mayor porcentaje con significancia estadística. Hubo mayor proporción de ovocitos inmaduros seguidos de los degenerados y los maduros en los dos estadios del ciclo estral. Los ovocitos en el diestro fueron más grandes en diámetro que los ovocitos en el periovulatorio ($p=0,0126$), mientras que la zona pelúcida fue más gruesa en el periovulatorio que en el diestro ($p<0,0001$). En conclusión, la aplicación de métodos no invasivos en ovocitos de cobaya para identificar características de calidad, desarrollo, maduración y morfometría fueron efectivos.

Palabras clave: Cobaya, ciclo estral, ovocito, morfología, competencia ovocitaria



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

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

Abstract

The morphological and functional characteristics of guinea pig oocytes were studied according to the type of COC and stage of the estrous cycle. Forty guinea pigs, synchronized with oral progesterone (Regumate®) for 15 days, were used. Ovaries were collected at periovulatory (day 2) and diestrous (day 9) post-synchronization stage, and 100% of COCs were categorized by morphology into A, B and C. Mitochondrial distribution (MD), nuclear status, oocyte diameter and zona pellucida (ZP) thickness were determined, and in 50% of these, Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining was applied. A total of 1053 COCs were obtained (49.9% periovulatory and 50.1% diestrous). From these, 23% were A, 47.5% B and 29.5% C. It was determined that in the periovulatory stage there was a greater percentage of BCB+, while in the diestrous stage a greater percentage of BCB- was obtained. In both the periovulatory and diestrous stage, diffuse DM had a greater percentage with statistical significance. There was a greater proportion of immature oocytes followed by degenerate and the mature oocytes in both stages of the estrous cycle. Oocytes in diestrous were larger in diameter than oocytes in periovulatory ($p=0.0126$), while the zona pellucida was thicker in periovulatory than in diestrous ($p<0.0001$). In conclusion, the application of non-invasive methods in guinea pig oocytes to identify characteristics of quality, development, maturation and morphometry were effective.

Keywords: Guinea pig, estrous cycle, oocyte, morphology, oocyte competence



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

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

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Índice de anexos.....	9
Abreviaturas utilizadas.....	12
Introducción.....	14
Objetivos.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	16
1. Revisión de literatura.....	17
1.1. Generalidades.....	17
1.2. Clasificación taxonómica.....	17
1.3. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya.....	17
1.3.1. Ovarios.....	18
1.3.2. Oviductos.....	18
1.3.3. Útero, cuerpo y cuello uterino.....	18
1.3.4. Vagina.....	18
1.3.5. Vulva.....	19
1.4. Fisiología reproductiva de la cobaya.....	19
1.4.1. Ciclo estral.....	20
1.4.1.1. Proestro.....	20
1.4.1.2. Estro o Celo.....	20
1.4.1.3. Metaestro.....	20
1.4.1.4. Diestro.....	21
1.4.1.5. Ovulación.....	21
1.4.2. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....	21

1.5.	Ovogénesis.....	22
1.6.	Foliculogénesis.....	22
1.6.1.	Folículo ovárico.....	22
1.6.1.1.	Folículos primordiales.....	22
1.6.1.2.	Folículo secundario o preantral.....	23
1.6.1.3.	Folículo terciario o Antral.....	23
1.6.1.4.	Folículo preovulatorio o de Graff.....	23
1.6.1.5.	Cuerpo lúteo.....	23
1.7.	Ovocito.....	24
1.8.	Sincronización del celo.....	25
1.9.	Recuperación y transporte de ovarios.....	25
1.10.	Métodos de obtención de los ovocitos.....	25
1.10.1.	Diseción folicular.....	26
1.10.2.	Aspiración folicular:.....	26
1.10.3.	Slicing.....	26
1.11.	Clasificación de los ovocitos y su importancia.....	26
1.12.	Marcadores no invasivos asociados con la calidad del ovocito.....	27
1.12.1.	Tinción Azul brillante de cresilo.....	27
1.12.2.	BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye (SCT136-Sigma-Aldrich).....	27
1.12.3.	Hoechst 33342 (Sigma B-2261).....	28
2.	Materiales y métodos.....	29
2.1.	Materiales.....	29
2.1.1.	Materiales de campo.....	29
2.1.2.	Materiales de laboratorio.....	29
2.2.	Métodos.....	30
2.2.1.	El Área de estudio.....	30
2.2.2.	Unidades experimentales.....	30
2.2.3.	Diseño experimental.....	31
2.3.	Metodología.....	31

2.3.1.	Protocolo de sincronización del celo	31
2.3.2.	Índice gonadosomático	31
2.3.3.	Obtención de los COCs	31
2.3.4.	Clasificación de los COCs	32
2.3.5.	Tinción Azul Brillante de Cresilo	32
2.3.6.	Distribución de las mitocondrias	33
2.3.7.	Estatus nuclear	33
2.3.8.	Determinación del diámetro del ovocito y el grosor de la zona pelúcida	34
3.	Resultados	36
3.1.	Peso de las cobayas y ovarios	36
3.2.	Clasificación morfológica de los COCs	36
3.3.	Prueba Azul Brillante de Cresilo	37
3.4.	Distribución de las mitocondrias	39
3.5.	Estatus nuclear	42
3.6.	Distribución mitocondrial y su relación con el estatus nuclear	44
3.7.	Determinación del diámetro del ovocito y el grosor de la zona pelúcida	46
4.	Discusión	49
	Conclusiones	53
	Recomendaciones	54
	Referencias	55
	Anexos	65

Índice de figuras

Figura 1: Aparato reproductor de la cobaya.....	19
Figura 2: Esquema Folicular.....	24
Figura 3: Estructura del ovocito.....	24
Figura 4. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis.....	30
Figura 5. Complejos células del cúmulo-ovocito teñidos BCB+ (A) y BCB- (B).....	37
Figura 6. Distribución (panel izquierdo) y patrón de agregación mitocondrial (panel derecho) en los diferentes tipos de COC.....	40
Figura 7. Distribución mitocondrial en ovocitos de cobayas sometidos a la tinción Biotracker 488 Green Mitochondria Dye.....	40
Figura 8. Agregación mitocondrial en ovocitos de cobayas sometidos a la tinción Biotracker 488 Green Mitochondria Dye;.....	41
Figura 9. Estatus nuclear en ovocitos de cobayas sometidos a la tinción Hoechst 33342...	43
Figura 10. Porcentajes de ovocitos con agregación mitocondrial ausente, ligera y alta relacionada al estatus nuclear (maduro, inmaduro y degenerado).	45
Figura 11. Estatus nuclear de acuerdo al tipo de COC y al patrón de agregación mitocondrial (ausente, ligera y alta)	46

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica.....	17
Tabla 2. Materiales de campo.....	29
Tabla 3: Materiales de laboratorio	29
Tabla 4. Evaluación de la calidad de los ovocitos (COCs).....	32
Tabla 5. Morfología nuclear de los ovocitos bovinos propuesta.	34
Tabla 6. Peso de las cobayas y de los ovarios, e índice gonadosomático de acuerdo al estadio del ciclo estral (media \pm error estándar).....	36
Tabla 7. Número y porcentaje de COCs en diferentes categorías de COCs y estadio del ciclo estral.....	37
Tabla 8A. Número y porcentaje de COCs positivos y negativos a la enzima G6PD de acuerdo al estadio del ciclo estral.....	38
Tabla 8B. Número y porcentaje de COCs positivo y negativo a la enzima G6PD de acuerdo al tipo de COCs.....	38
Tabla 9. Número y porcentaje de COCs positivos y negativos a la enzima G6PD de acuerdo al estadio del ciclo estral y al tipo COC.....	39
Tabla 10. Distribución mitocondrial de acuerdo al estadio del ciclo estral y tipo de COC. ...	41
Tabla 11. Patrón de agregación mitocondrial en los ovocitos con distribución mitocondrial difusa de acuerdo al estadio del ciclo estral y tipo de COC.	42
Tabla 12. Estatus nuclear de acuerdo al tipo de COC	43
Tabla 13. Efecto del tipo de COC y del estadio del ciclo estral sobre la tasa de maduración.	44
Tabla 14A. Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida de acuerdo al estadio del ciclo estral (media \pm error estándar).	46
Tabla 14B. Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida de acuerdo al tipo de COC (media \pm error estándar).....	47
Tabla 15. Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida de acuerdo al tipo del ovocito y el estadio del ciclo estral (media \pm error estándar).	48

Índice de anexos

Anexo A. Pesaje de las cobayas	65
Anexo B. Dosificación de la hormona	65
Anexo C. Extracción de ovarios.....	65
Anexo D. Pesaje de ovarios	65
Anexo E. Ovarios de cobaya visto bajo estereomicroscopio	66
Anexo F. Técnica de slicing	66
Anexo G. Tipos de COCs	66
Anexo H. COCs en tinción BCB	66
Anexo I. Denudación de ovocitos por Vórtex	67
Anexo J. Ovocitos en tinción BioTracker.....	67
Anexo K. Medición del diámetro ovocitario en el programa Image J.	67
Anexo L. Medición del grosor de la zona pelúcida en el programa ImageJ.....	67

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a nuestro tutor, Dr. Fernando Perea por estar al pendiente y guiarnos en cada paso de nuestro trabajo experimental e investigativo.

Al Dr. Jhonny Narváez y Dr. Carlos Ortuño por brindarnos las instalaciones y recursos para mantener las cobayas en la granja de Irquis.

Al Dr. Mauricio Duma y Dr. Xavier Samaniego que nos brindaron su ayuda y conocimiento en cada una de las técnicas realizadas en el laboratorio de biotecnología y reproducción animal de la Universidad de Cuenca.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios, por prestarme la vida y estar siempre conmigo, guiando mí camino. A mis padres por ser el pilar más importante y demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. Asimismo, a mi familia, profesores y amigos quienes, con su apoyo, enseñanzas y consejos, permitieron que logre culminar mi formación profesional.

Edisson Bravo Vega

A Dios, el ser que siempre está presente en todo momento y ser quien guía mi camino hacia cosas positivas y personas que suman en mi vida.

A mi madre, mi pilar fundamental quien me impulsa a seguir adelante dando lo mejor con su apoyo, dedicación y amor incondicional. A mis hermanos que siempre estuvieron ahí para apoyarme.

A mis tías, tíos y primas que a lo largo de carrera me han dado su apoyo y palabras de perseverancia para seguir adelante.

A mis amigos y compañeros de carrera que han sido indispensables en mi formación académica ya que con su apoyo incondicional en los peores momentos me han animado a concluir mi carrera universitaria.

Katherine Castro Calle

Abreviaturas utilizadas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AM: Agregación mitocondrial

ATP: Adenosín trifosfato

BCB: Azul brillante de cresilo

COCs: Complejos cúmulo ovocito

CP: Corpúsculo polar

DM: Distribución mitocondrial

ECE: Estadio del ciclo estral

EE: Error estándar

EPV: Espacio perivitelino

FITC: Isotiocianato de fluoresceína conjugada

FSH: Hormona folículo estimulante

GFP: Proteína fluorescente verde

GLM: Modelo lineal general

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

LH: Hormona luteinizante

MOET: Multiovulación y transferencia de embriones

MI: Metafase I

MII: Metafase II

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PBS: Solución fosfato-tamponada salina

PC: Posterior al coito

PGF2 α : Prostaglandina F2 α

PIVE: Producción *in vitro* de embriones

SOV: Superovulación

TRA: Técnicas de reproducción asistida

VG: Vesícula germinal

ZP: Zona pelúcida

μm : Micras

Introducción

El cuy (*Cavia porcellus*) es un mamífero herbívoro originario de la zona andina, que se caracteriza por ser una especie precoz, prolífica, dócil y de fácil manejo (Araníbar & Echevarría, 2013). Las cobayas se han utilizado como un modelo animal para la investigación desde finales del siglo XVIII y sigue siendo una especie predilecta para el estudio de la reproducción en humanos y animales domésticos debido a tener ciclos estrales cortos, ovulación espontánea, cuerpos lúteos activos, un corto periodo de gestación y un tipo de placenta discoidal (Cañón, 2018). Además de ser un buen modelo animal para estudios de procesos celulares y endocrinos en los mamíferos, pueden ser muy útiles en técnicas de reproducción asistida (TRA) (Alatríste et al., 2009).

Los trabajos de investigación en cobayas datan desde los años 1850 y han servido como referencias importantes para el estudio y aplicación diferentes TRA en esta especie. Entre estos estudios, la maduración del ovocito (Moore & Tozer, 1908), los cambios histológicos y fisiológicos en el ciclo estral (Stockard & Papanicolaou, 1917), el comportamiento del ciclo estral (Ueda et al., 1998), la inseminación artificial (Ueda et al., 1998), el control del ciclo estral (A. Grégoire et al., 2012), entre otros, han generado información muy valiosa. Todo esto con el objetivo de implementar biotécnicas reproductivas en esta especie, como la superovulación (SOV), la multiovulación y transferencia de embriones y la producción in vitro de embriones (*PIVE*) (Grégoire et al., 2012).

Por otra parte, el limitado conocimiento de la fisiología reproductiva y de las características ovocitarias en las distintas etapas del ciclo estral de la cobaya, ha limitado el uso de biotecnologías en esta especie por lo que la aplicación de protocolos de sincronización en un grupo de animales ha permitido inducir el celo en un tiempo reducido convirtiéndose en una pieza clave para investigar las características reproductivas en un determinado momento del ciclo estral en varios animales simultáneamente (Dominguez, 2023).

La evaluación y clasificación de los COCs es una de las técnicas más utilizadas para determinar la calidad del ovocito (Hurtado de Mendoza & Fernández, 2015), y puede estar influenciada por múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Los factores intrínsecos incluyen la raza, la edad, el estado reproductivo, el estado metabólico y nutricional, los niveles hormonales y la etapa del ciclo estral (Moussa et al., 2014), mientras que los factores extrínsecos claves incluyen el momento entre el sacrificio y la extracción de ovocitos del ovario, los métodos de recolección de los COCs, la temperatura de almacenamiento y los medios de recolección (Tello et al., 2020). La evidencia actual indica que la calidad de los ovocitos influye directamente en su capacidad para ser fecundados, y en el subsiguiente

desarrollo embrionario; lo que ha impulsado la búsqueda continua de predictores confiables de competencia ovocitaria (Q. Wang & Sun, 2007), particularmente en esta especie donde la documentación existente es limitada.

En cuanto a la selección de ovocitos aptos para la producción embrionaria, es necesario contar con indicadores para predecir su capacidad de reanudar la meiosis, completar su maduración y formar un embrión viable luego de la fecundación, es decir, para determinar su competencia de desarrollo. Por ello, se ha empleado el colorante azul brillante de cresilo para determinar la actividad de la enzima G6PD, constituyendo un indicador de la calidad de los ovocitos, que se ha validado como un método rápido, eficiente y no invasivo para identificar los ovocitos con excelente competencia de desarrollo en varias especies (Vargas, 2021).

De acuerdo a Cecchino et al. (2018), las mitocondrias son los orgánulos más abundantes en los ovocitos de mamíferos, que cumplen un papel vital, al proporcionar energía para la fertilización y el desarrollo del embrión (Wilding et al., 2001). Además, el patrón de distribución mitocondrial juega un papel importante en la maduración de los ovocitos, ya que las mitocondrias distribuidas inadecuadamente pueden causar un uso inapropiado de ATP en el citoplasma, lo que posteriormente puede conducir a un retraso o detención del desarrollo de los ovocitos, así como también, problemas posteriores en la embriogénesis (Nagai et al., 2006). Durante la maduración del ovocito, se producen una compleja serie de modificaciones en el citoplasma, junto con la maduración meiótica del núcleo y ciertos cambios en la membrana, por lo que el uso de marcadores no invasivos nos permite conocer su estado de maduración y poder seleccionar los ovocitos más competentes con el fin de ser fecundado con éxito y poder mantener la primera fase de desarrollo embrionario (Chong et al., 2018).

Como resultado, se ha demostrado que el éxito de las TRAs se sustenta, en gran medida, en la calidad de los COCs (Gordon, 2003). Recientemente, no se han realizado estudios relevantes en esta área, situación que condujo a que se planteara esta investigación, que servirá de base para estudios posteriores, una vez se investiguen las características morfométricas de los COCs, así como sus características funcionales. Esto permitirá comprender de mejor manera diversos aspectos morfológicos y fisiológicos de la reproducción de esta especie, y generará información valiosa para la implementación de TRAs en cobayas, así como se aplica rutinariamente en otras especies.

Objetivos

Objetivo General

Determinar las características morfológicas y funcionales de los ovocitos de la cobaya (*Cavia porcellus*) de acuerdo a la categoría de los COCs y el estadio del ciclo estral.

Objetivos Específicos

- Evaluar la funcionalidad del ovocito mediante la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa según la categoría y estadio del ciclo estral.
- Determinar el estatus nuclear y la distribución mitocondrial del ovocito según la categoría y estadio del ciclo estral.
- Valorar las dimensiones morfométricas de ovocitos de cobaya según la categoría y el estadio del ciclo estral.

1. Revisión de literatura

1.1. Generalidades

El cuy (*Cavia porcellus*) mamífero roedor, originario de la región andina (Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú) de crianza milenaria, conocido también como curí, cobayo o conejillo de india (Chauca, 1995). Domesticado hace aproximadamente 2.500 a 3.600 años a partir de un cuy salvaje *Cavia tschudii* (Quenta, 2020). Son animales de gran importancia económica y científica, por su prolificidad, crecimiento rápido y su adaptabilidad a una amplia gama de climas y dietas (Chauca, 1995), además de ser considerados como una fuente importante de proteína, debido a su bajo contenido graso (7,8%), alto contenido proteico (20,3 %) y excelentes propiedades organolépticas en comparación con otras proteínas de origen animal (Bazán et al., 2014).

1.2. Clasificación taxonómica

En la **Tabla 1.** se indica la clasificación taxonómica de la especie *Cavia porcellus*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica.

Reino	<i>Animal</i>
Clase	<i>Mammalia</i> (mamífero)
Orden	<i>Rodentia</i> (roedores)
Suborden	<i>Hystricomorpha</i>
Familia	<i>Caviidae</i>
Genero	<i>Cavia</i>
Especie	<i>C. porcellus</i>

Fuente: (Vivas & Carballo, 2013).

1.3. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya

El aparato reproductor de la cobaya está conformado por ovarios, oviductos, el útero, el cuello uterino y la vagina. Los órganos genitales internos (primero de cuatro componentes) están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del mesoovario, que sostiene al ovario: el mesosálpinx, que sostiene al oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero (Hafez, 2002).

1.3.1. Ovarios

Los ovarios son los órganos principales de la reproducción de la hembra, tiene forma ovoide ligeramente aplanada, de color blanco amarillenta, están ubicados de forma caudal al polo ventral del riñón, poseen un tamaño aproximado de 3-6 x 2-4 x 2-3 mm y su peso varía entre 50 a 150 mg (Bitzinger, 2008). El tamaño y estructura del ovario varía de acuerdo a la edad y el estado reproductivo, cada ovario esta irrigado por vasos sanguíneos provenientes de la arteria ovárica y la arteria uterina, redes de vasos linfáticos y nervios simpáticos y parasimpáticos (Barahona & Quishpe, 2012). Tiene como función producir ovocitos (exocrina), y las hormonas (endócrina) estrógenos y progesterona (López, 2010).

1.3.2. Oviductos

También conocidos como trompas uterinas, son órganos pares de forma tubular que establecen comunicación entre los ovarios y el útero (Barahona & Quishpe, 2012), tienen aproximadamente unos 6 mm de largo y 1mm de diámetro (Bitzinger, 2008). El oviducto se divide en tres porciones: el infundíbulo, ampolla e istmo, en los que se llevan a cabo funciones esenciales para la reproducción como son: el transporte de los gametos, la capacitación espermática, la fecundación, la segmentación embrionaria y el transporte sincronizado del embrión hacia el útero para su posterior anidación (Anzaldúa et al., 2003).

1.3.3. Útero, cuerpo y cuello uterino

Presenta útero bicorneo en forma de V. Los cuernos uterinos miden en su parte media 6 mm y tienen una longitud de 37 mm. El cuerpo uterino es corto y aplanado dorso ventralmente, aproximadamente mide 13 mm de largo y 7 mm de ancho, cumpliendo la función de retener y darle soporte nutricional al embrión y al feto durante todo el período de gestación. Mientras que el cuello uterino es una porción del útero que se comunica con la vagina, en cuyo centro se halla el orificio comunicante, su consistencia es dura, formada por una estructura muscular gruesa (esfínter o anillo), cuya función es regular el acceso del semen y de las secreciones uterinas, y de prevenir la contaminación microbiana del concepto durante la gestación (Oñate, 2008).

1.3.4. Vagina

Es un tubo muscular fibro-elástico, su longitud es de 3 cm de largo por 1 cm de ancho. Se encuentra ubicada en la cavidad pelviana, que se distingue de otros roedores por la presencia de una membrana epitelial que envuelve el orificio vaginal excepto en la fase de estro y parto

(Grégoire et al., 2012). Su función es la recepción del pene del macho durante la cópula y el pasaje del feto durante el parto.

1.3.5. Vulva

Abertura en forma de V o Y invertida que se ve en la parte externa de la hembra. En su porción ventral presenta una escotadura que forma dos pequeños labios en cuyo fondo se halla el meato urinario, en la posición dorsal presenta el clítoris (Barahona & Quishpe, 2012).

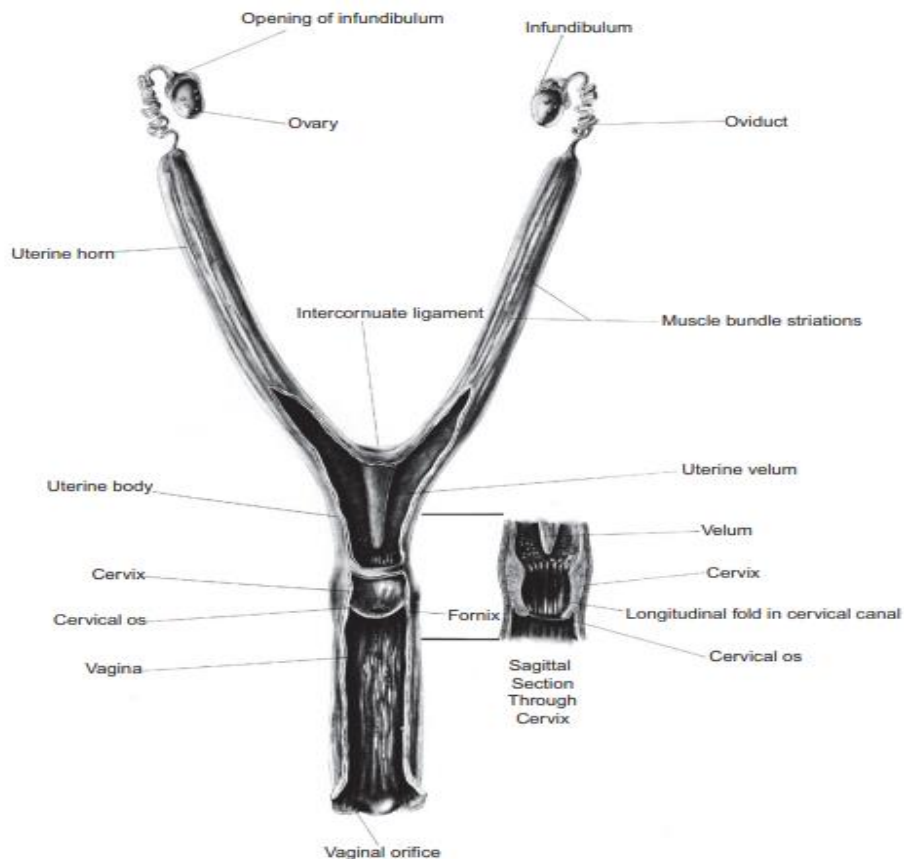


Figura 1: Aparato reproductor de la cobaya.

Fuente: (Hargaden & Singer, 2012).

1.4. Fisiología reproductiva de la cobaya

La cobaya se caracteriza por ser una especie poliéstrica, no estacionaria. Su etapa reproductiva inicia con la pubertad (30 días), la edad adecuada para iniciar el apareamiento es de 3 – 4 meses, cuando han madurado sexualmente y han alcanzado un peso mínimo de 600 g; esto depende en gran parte de la calidad de la alimentación, el tipo de manejo de los animales y el grupo genético (Villamarín, 2016).

1.4.1. Ciclo estral

El primer estro en la hembra se da entre los 55-70 días, con una duración estimada de 14 a 18 días, en donde se presenta cuatro fases bien específicas: proestro, estro o celo, metaestro y diestro (Gullace, 1996).

1.4.1.1. Proestro

Esta fase dura alrededor de 1 a 1,5 días, en la cual los órganos reproductores de la hembra se preparan para aceptar al macho; diferenciada por hinchazón vaginal, ruptura de la membrana vaginal y aumento de la actividad. En la citología vaginal se observa células epiteliales nucleadas y cornificadas (Shomer et al., 2015).

1.4.1.2. Estro o Celos

Se determina por los cambios comportamentales del animal como, por ejemplo, la adopción de una posición de lordosis ante la presencia del macho, además existe descargas de mucosidad vaginal. En general este período ocurre durante la noche y tiene una duración de entre 6 y 10 horas en las cuales la hembra es totalmente receptiva al macho (Roy et al., 1993). Además, esta especie se caracteriza por presentar un celo posparto que se produce 30 minutos a 2 horas después del parto, con una duración promedio de 3,5 horas, y las hembras que se aparean durante el mismo obtendrán mayor número de partos al año, existiendo en consecuencia madres lactantes y gestantes a la vez (Barahona & Quishpe, 2012). En la citología vaginal existe gran cantidad de células superficiales, de forma poliédrica y de núcleo picnótico que en ocasiones no se llega a ver, pudiéndose además encontrarse células superficiales anucleares (Kuhnel & Mendoza, 1992).

1.4.1.3. Metaestro

Período posterior al celo, se lo considera como el período de recuperación de los cambios ocurridos durante el mismo. La duración de esta etapa depende casi por completo de la condición del animal. En un animal normal con una dieta adecuada dura 1 - 2 días hasta que se restablece la condición normal. Si el macho intenta montar a la hembra existe un rechazo de la misma (Almeida, 2016). Una característica importante es cuando se realiza una citología vaginal se puede observar células cornificadas, numerosos leucocitos, escasas células epiteliales nucleadas (Galassi & Gullace, 2011).

1.4.1.4. Diestro

Este período es el más largo del ciclo y dura alrededor de 13-15 días. En la citología vaginal se puede observar una mayor cantidad de leucocitos, pero escasa cantidad de células intermedias en proporción a los leucocitos (Kuhnel & Mendoza, 1992).

1.4.1.5. Ovulación

La ovulación en la cobaya es espontánea y ocurre aproximadamente a las 10 horas después de iniciado el celo, los óvulos se caracterizan por tener cerca de 15 horas de vida, a diferencia de los espermatozoides que viven 30 horas. El número de óvulos viables, varía entre 1 y 5 siendo la mayor frecuencia de 2 a 3 óvulos fecundados viables (Quenta, 2020).

1.4.2. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal

Regula los cambios reproductivos que tienen lugar durante el ciclo estral y es fundamental para el éxito reproductivo (Henry & Box, 1996). En cobayos, las hormonas específicas impulsan los cambios que ocurren durante cada fase del ciclo e inducen transformaciones anatómicas (King et al., 1995). El eje hipotálamo-hipófisis-gónada se origina en el hipotálamo, que sirve como centro de integración a través de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina; esta hormona actúa sobre la hipófisis anterior y estimula la síntesis y secreción de gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) (Caraty & Skinner, 1999).

Cada ciclo suele estar dividido en dos fases, una luteal y una folicular. En la fase lútea hay ausencia de manifestaciones típicas del comportamiento sexual, y corresponde a la presencia de un cuerpo lúteo activo en el ovario, el cual secreta progesterona y bloquea una nueva ovulación inhibiendo la secreción de LH (Grégoire et al., 2010). Luego de iniciada la luteólisis que disminuye la progesterona a niveles basales y de desaparecer el bloqueo que esta ejerce sobre el hipotálamo y la hipófisis comienza el proestro que da inicio a la fase folicular. Durante esta fase ocurre un aumento en la secreción de estrógenos por los folículos dominantes estimulados por la secreción creciente de LH, que inducen a la hembra al estro y posteriormente a la ovulación (Echeverría, 2006).

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

1.5. Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de formación, crecimiento y maduración del ovocito, y sucede de forma asociada con la foliculogénesis (desarrolla un folículo ovárico) (Burrola & González, 2015). Inicia en la vida embrionaria, en donde las células germinales primordiales se diferencian del epitelio del saco vitelino durante el desarrollo embrionario, migran a través del mesenterio y colonizan las gónadas primitivas. Se conectan unas a otras por puentes intercelulares y finalmente, luego de sucesivas divisiones mitóticas, se diferencian en ovogonias, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios que inician la primera división meiótica (Gigli et al., 2006). La primera división meiótica avanza hasta que el ovocito alcanza el estadio de diploteno (profase I), y se produce la primera detención de la meiosis, hasta el inicio de la pubertad o madurez sexual (Quijano Saavedra, 2019).

Según Ioannou, (1964) quien evaluó el número de células germinales en el ovario de *Cavia porcellus* desde las etapas embrionarias hasta la madurez sexual. Determinó que el número de células germinales en los ovarios aumenta de alrededor de 27.000 a los 30 días posteriores al coito (pc) hasta el máximo de casi 105.000 en el día 41 pc. El proceso de ovogénesis termina a los 50 días luego del apareamiento. Y hay un gran número de ovocitos en leptoteno a los 35 días pc, en zigoteno a los 40 días pc y paquiteno a los 50 días pc. Unos pocos días después del nacimiento, todos los ovocitos están en etapa de diploteno.

1.6. Foliculogénesis

La foliculogénesis se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular (Gigli et al., 2006). Los folículos del ovario se dividen en cuatro grupos en función de su tamaño y etapas de desarrollo (Cañón & Córdova, 2012).

1.6.1. Folículo ovárico

Son estructuras redondeadas u ovals de diversos tamaños, constituidos por un ovocito rodeado por una o más capas de células epiteliales, llamadas células foliculares (Dellman, 1994). El folículo tiene 2 funciones fundamentales, la producción de hormonas y de ovocitos aptos para ser fecundados (Filipiak et al., 2016)

1.6.1.1. Folículos primordiales

Son estructuras ovaladas constituidos por un ovocito cuyo crecimiento se encuentra detenido en la fase de diploteno de la profase I de la primera meiosis (etapa exclusiva de la meiosis denominada dictioteno), el cual está rodeado por una sola capa de células planas de aspecto fusiforme (Nilsson & Skinner, 2001). Mientras en el folículo primario el ovocito se caracteriza

por estar rodeado de una capa de células de la granulosa esféricas, que a medida que el folículo crece sintetiza una de glucoproteínas denominada zona pelúcida (ZP), que se forma entre el ovocito y las células de la granulosa (Zerón, 2020).

1.6.1.2. Folículo secundario o preantral

Tienen varias capas de células granulosas, que rodean a su vez a las células de la teca externa e interna y conlleva al aumento de tamaño del folículo. Las células granulosas comienzan a segregar un líquido (licor folicular) que va formando espacios entre ellas, estos espacios confluyen posteriormente en una cavidad conocida como antro folicular (Filipiak et al., 2016).

1.6.1.3. Folículo terciario o Antral

Se caracterizan histológicamente por la presencia de la cavidad antral y por estar rodeados de varias capas cúbicas de células de la granulosa que comienzan a secretar un trasudado que se denomina líquido folicular, que al acumularse produce un reordenamiento de las mismas en células del cúmulo y murales (Gigli et al., 2006).

1.6.1.4. Folículo preovulatorio o de Graff

También denominado folículo terciario antral maduro o preovulatorio, es un folículo de mayor tamaño que contiene líquido folicular y está listo para romperse y liberar al ovocito en la ovulación (Zerón, 2020).

1.6.1.5. Cuerpo lúteo

Denominado también cuerpo amarillo, se forma después de la ovulación a partir de las células de la granulosa y de la teca interna remanentes del folículo de Graaf colapsado. Produce progesterona, estrógenos, relaxina e inhibina (Zerón, 2020). Finalmente, al final de diestro, el cuerpo lúteo se degenera mediante el mecanismo de luteólisis desencadenado por la secreción endometrial de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), y se convierte en un tejido de cicatrización llamado cuerpo albicans (McGee & Hsueh, 2000).

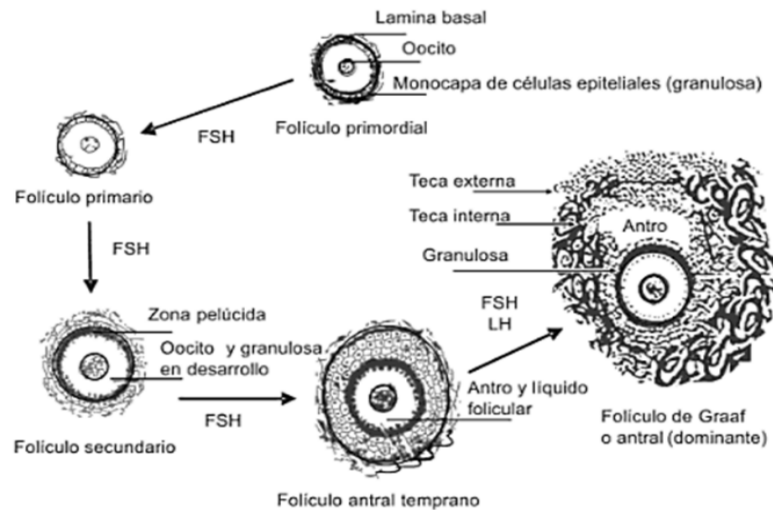


Figura 2: Esquema Folicular.

Fuente: (Alvarez et al., 2009)

1.7. Ovocito

El ovocito, considerado la célula más grande del organismo, está rodeado por una capa extracelular transparente compuesta por una matriz de glicoproteínas denominada zona pelúcida (ZP). Entre el ovocito y la ZP existe un espacio virtual denominado espacio perivitelino (EPV) en el que se localiza el primer corpúsculo polar (CP) del ovocito una vez culminada la meiosis I. Cada una de estas estructuras del ovocito tienen un papel fundamental durante la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Saavedra, 2009). Según Fernández et al. (2018), la zona pelúcida de los ovocitos de cobaya mide $12,1 \pm 2,5 \mu\text{m}$, mientras que su diámetro (sin zona pelúcida) y volumen son de $75,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$ y $234003,8 \pm 76547,1 \mu\text{m}^3$ respectivamente.

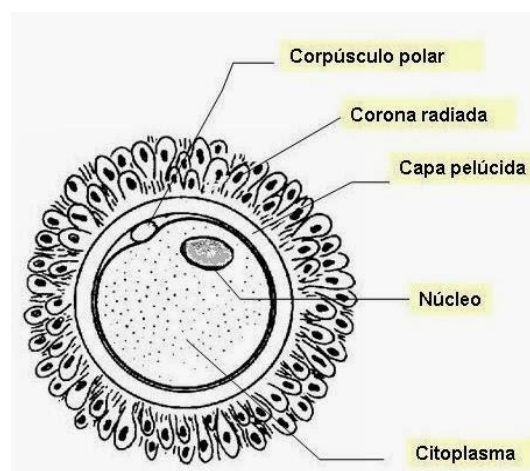


Figura 3: Estructura del ovocito.

Fuente: (Tapia, 2014)

1.8. Sincronización del celo

Es una técnica que modifica los ciclos estrales de un grupo de hembras, permitiéndoles entrar en celo fértil en un momento preprogramado. Para que la sincronización sea exitosa, se debe determinar el método apropiado que se adapte a las condiciones de cada animal (López, 2013).

La sincronización de celo se realiza con diferentes hormonas y en diferentes combinaciones y se puede administrar a través de un implante subcutáneo, un dispositivo intravaginal, por vía oral o por inyección. Estas hormonas actúan sobre la fisiología ovárica para acelerar, retrasar o inducir el celo (sincronización), y en algunos casos, para inducir la ovulación. La respuesta exitosa a un programa de sincronización depende de la fertilidad de la hembra, su condición física, respuesta al tratamiento y uso del programa de sincronización apropiado para la categoría de hembra a sincronizada (Quenta, 2020).

Los protocolos de sincronización se basan en el efecto luteolítico de la $PGF2\alpha$, el efecto de los progestágenos de suprimir del comportamiento estral, y el control folicular y lúteo con la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en combinación con $PGF2\alpha$ (López, 2013).

1.9. Recuperación y transporte de ovarios

La recuperación de los ovarios se realiza al inicio de la cadena de sacrificio mediante la intervención del recolector. Los ovarios se obtienen de diversas especies hembras en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales (Madison et al., 1992). Los ovarios recolectados son transportados en un termo con solución salina 0.9% o solución fosfato-tamponada salina (PBS) a una temperatura de 30-35 °C con o sin antibióticos (Fry et al., 1997).

Los ovarios no deben exceder las 5 horas hasta su llegada al laboratorio, ya que disminuye la capacidad de desarrollo y viabilidad de los ovocitos. Los métodos de recuperación de ovocitos buscan maximizar el número de ovocitos colectados y su rendimiento, ya que pueden utilizarse para tecnologías *in vitro*. Sin embargo, no se han publicado suficientes informes que evalúen la eficacia relativa de los métodos usados en otras especies, en el cobayo (Shirazi et al., 2005).

1.10. Métodos de obtención de los ovocitos

Las diversas técnicas utilizadas para la recuperación de ovocitos afectan a su calidad, siendo uno de los factores que determinan el éxito de diversas prácticas biotecnológicas. Entre los

más utilizados se encuentran la punción folicular, la disección folicular y el slicing (cortar la superficie del ovario) (Lorenzo et al., 2015).

1.10.1. Disección folicular

El folículo se separa del ovario con un bisturí y luego se extrae el COC. Esta técnica requiere algo de tiempo, pero permite recoger un gran número de ovocitos manteniendo su integridad y permite conocer las características del folículo del que se obtuvieron los COCs (Shirazi et al., 2005).

1.10.2. Aspiración folicular:

Con esta técnica, el contenido de los folículos que contienen los COCs se aspira con una aguja acoplada a una jeringa. Esta técnica es muy utilizada ya que permite la recuperación de ovocitos en poco tiempo (Anguita, 2003). Sin embargo, la punción folicular solo permite la punción de folículos antrales mayores de 3 mm y claramente visibles en la superficie del ovario en hembras adultas; Las células del cúmulo se pierden y la cantidad de COCs recuperada es menor que con otras técnicas (Lorenzo et al., 2015).

1.10.3. Slicing

Los COCs se obtienen realizando varias incisiones longitudinales y transversales con un bisturí en la superficie de un ovario colocado en una placa de Petri, liberándolos en un medio (Brier & Jayanti, 2020). Con esta técnica se obtienen grandes cantidades de ovocitos del ovario, pero la población resultante es muy heterogénea, por lo que se requiere la selección de ovocitos (Anguita, 2003).

1.11. Clasificación de los ovocitos y su importancia

La evaluación morfológica de los COCs es una herramienta útil y necesaria para identificar y seleccionar los ovocitos más competentes para PIVE. Actualmente, la selección de ovocitos se basa en criterios morfológicos, los cuales han proporcionado información valiosa para la selección inicial de ovocitos con mayor competencia de desarrollo (Alvarez et al., 2009) (Krisher et al., 2007).

Los criterios morfológicos incluyen el número y la apariencia de las capas de células del cúmulo y las características citoplasmáticas del ovocito, como la consistencia o el brillo del citoplasma. En general, la categoría óptima de COCs (Clase I) tiene una cobertura total de múltiples capas de células del cúmulo compactas; el grado intermedio (clase II) tiene una cobertura total o parcial de células del cúmulo con menos de cinco capas de células;

finalmente, los de menor calidad (clase III) tiene un citoplasma más oscuro y la presencia de manchas oscuras con montículos agrandados, todo indicativo de atresia folicular (Aguila et al., 2020). Esta información ha sido reportada extensamente en bovinos, lo que sirve como base para este estudio.

1.12. Marcadores no invasivos asociados con la calidad del ovocito

La identificación precisa de marcadores no invasivos que predicen la competencia ovocitaria son de gran interés, y para lo cual existen diversas técnicas utilizadas a nivel de laboratorio (Spikings et al., 2007).

1.12.1. Tinción Azul brillante de cresilo

La tinción con azul brillante de cresilo (BCB) nos ayuda a determinar la actividad intracelular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), una enzima sintetizada durante la primera fase del ciclo de crecimiento celular, en la fase S (Rodríguez-González et al., 2002). La actividad de G6PD juega un papel clave en el crecimiento celular al proporcionar NADPH para la regulación redox (Tian et al., 1998).

El BCB es un compuesto azul que la actividad G6PD disminuye a un estado incoloro debido a su degradación, de modo que los ovocitos en fase de crecimiento presentan un citoplasma incoloro, mientras que los ovocitos que han completado la fase de crecimiento tienen una actividad de G6PD reducida exhibiendo un citoplasma con coloración azul (Rodríguez-González et al., 2002).

1.12.2. BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye (SCT136-Sigma-Aldrich)

Las mitocondrias son organelas contenidas en grandes cantidades en el citoplasma de la mayoría de las células, donde ocurren procesos bioquímicos como la respiración y la producción de energía. En las células metabólicamente activas, las mitocondrias generan un potencial de membrana al mantener un gradiente de protones a través de la membrana interna y externa. La pérdida del potencial de la membrana mitocondrial es un sello distintivo de la apoptosis y de la mala salud celular (Sigma Aldrich, 2023).

Las tinciones mitocondriales BioTracker son tinciones fluorogénicas para teñir mitocondrias en células vivas. Estos tintes son permeables a la membrana y se vuelven muy fluorescentes cuando se acumulan en la membrana mitocondrial. La tinción se pierde cuando las mitocondrias se despolarizan durante la muerte celular, lo que permite controlar la viabilidad celular. Este tinte se puede detectar con el canal verde FITC/GFP. Además, el colorante verde es independiente del potencial de membrana y se puede usar para teñir células vivas y fijadas

y se excita a 490 nm y emite fluorescencia a 523 nm. Este colorante se utiliza para detectar la viabilidad celular, la actividad metabólica y la salud celular en general (Sigma Aldrich, 2023).

1.12.3. Hoechst 33342 (Sigma B-2261)

La capacidad de visualizar la cromatina de diferentes células vivas nos permite conocer el destino de los cromosomas durante la división celular, por lo que el uso de colorantes fluorescentes permeables al ADN es una buena solución, ya que no es necesario introducir proteínas fluorescentes exógenas mediante transfección (Sen et al., 2018).

Hoechst es un colorante fluorescente derivado de bis-benzimida que se une a secuencias ricas en adenina y timina en la cadena menor de ADN de doble cadena (Ramos et al., 2003). Lo que permite identificar el estado de maduración nuclear de los ovocitos tras su exposición al microscopio de fluorescencia (Conover & Gwatkin, 1988). El primer signo de reanudación de la meiosis es la disolución de la membrana nuclear.

El ovocito que tenga citoplasma homogéneo y primer corpúsculo polar extruido indica que se encuentra en metafase II. La extrusión del corpúsculo polar en cobayos se da desde las 17 a 24 horas y como no es visible se necesita de un medio de tinción con fluorocromo específico para ADN como es el Hoechst 33342. (Duma, 2019). El colorante es excitado por la luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a 350 nm y emiten fluorescencia azul/cian de 461 nm (Long et al., 1994). Pudiéndose clasificar en ovocitos inmaduros cuando la vesícula germinal se encuentra intacta, y como ovocito maduro cuando el núcleo se encuentra en metafase I (MI), anafase-telofase I (An-Tel I), metafase II (MII; primer corpúsculo polar) (Ayala et al., 2019).

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de campo

El listado de materiales de campo utilizados para la obtención de los ovarios, se observa en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Materiales de campo.

Biológicas	Físicos	Químicos
<ul style="list-style-type: none"> Cobayas (mestizas) 	<ul style="list-style-type: none"> Balanza (Camry, EK5055, China) Equipo de disección Envases para toma de muestras (termo) Guantes Nitrilo 	<ul style="list-style-type: none"> Progesterona (REGUMATE®, MSD animal health, Igoville, Francia)

2.1.2. Materiales de laboratorio

Listado de materiales utilizados en el laboratorio de biotecnología de reproducción animal para el procesamiento de los ovarios de cobaya, **Tabla 3**.

Tabla 3: Materiales de laboratorio

Biológicas	Físicos	Químicos
<ul style="list-style-type: none"> Ovarios COCs 	<ul style="list-style-type: none"> Balanza gramera Balanza analítica (BAS 31 plus, BOECO, Alemania) Portaobjetos y Cubreobjetos Estereoscopio (SMZ745, Nikon, Japón) Micropipetas de volumen variable (1 a 20 µl, 20 a 200 µl y 100 a 1000 µl) Microscopio de epifluorescencia (Eclipse Ci-E epi-fluorescence set, Nikon, Japón) Placas Petri 35 mm Placa de búsqueda 100mm Puntas de pipeta variables Papel secante Tubos cónicos de 15 ml 	<ul style="list-style-type: none"> Esmalte de uñas Glutaraldehído al 2% (Sigma B-5882) Hoechst 33342 (Sigma B-2261) Lactato de Ringer BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye (SCT136-Sigma-Aldrich) Suero fetal bovino al 10% Tinción Azul Brillante de Cresilo (B5388) Piruvato de sodio PBS (tampón fosfato salino) Tritón 1% (Sigma-Aldrich)

2.2. Métodos

2.2.1. El Área de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca que se encuentra ubicado en la Parroquia Victoria del Portete (Irquis), cantón Cuenca, provincia del Azuay en el kilómetro 23 vía Girón, a 2714 msnm. En el área predomina una temperatura promedio de 14°C, una humedad relativa de 90.3% y una pluviosidad entre 800 y 2000 mm anuales.

Las cobayas se obtuvieron de un criadero comercial de la comunidad Ayancay, perteneciente a la parroquia Javier Loyola, cantón Azogues, provincia del Cañar y se mantuvieron en las instalaciones de la granja de Irquis perteneciente a la Universidad de Cuenca durante la investigación. Las cobayas se trasladaron a la granja 30 días antes al inicio de la investigación para su acondicionamiento, alimentadas a voluntad con una mezcla forrajera a base de raigrás; trébol blanco y kikuyo; además se suplementó con alimento balanceado (pasta de soya, maíz molido y afrecho), durante toda la investigación.



Figura 4. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis

Fuente: Google Maps, (2023)

2.2.2. Unidades experimentales

Se utilizaron 40 cobayas mestizas, con un peso de $1403,4 \pm 42,5$ g, reproductivamente activas, no gestante, y con al menos un parto.

2.2.3. Diseño experimental

Esta investigación evaluó la morfología y funcionalidad de los ovocitos de cobaya en dos estadios del ciclo estral, durante la etapa periovulatorio (n=20) y el diestro (n=20). Las cobayas se sincronizaron con un progestágeno sintético vía oral (REGUMATE®, MSD animal Health, Igoville, Francia). Se obtuvieron los ovarios al día 2 (periovulatorio) y al día 9 (diestro) postsincronización, el 100% de los COCs colectados se categorizaron de acuerdo a sus características morfológicas (tipo A, B y C). Se determinó la distribución mitocondrial (DM) con la tinción de BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye (SCT136, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), el estatus nuclear mediante la tinción con Hoechst 33342 (B226, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), el diámetro ovocitario y grosor de la zona pelúcida (ZP). Del porcentaje de COCs indicado anteriormente, en el 50% se determinó la actividad de la enzima G6PD mediante la tinción BCB.

2.3. Metodología

2.3.1. Protocolo de sincronización del celo

El protocolo de sincronización de celo en cobayas se realizó mediante la administración oral de un progestágeno sintético, cuyo principio activo es progesterona (altrenogest). Se aplicó una dosis de 0,22 mg/kg de peso vivo durante 15 días por vía oral, según la metodología descrita por (Gregoire, 2012).

2.3.2. Índice gonadosomático

Para el cálculo de este parámetro las cobayas fueron pesadas previo al sacrificio y los ovarios pesados en el laboratorio con una balanza analítica (BAS 31 plus, BOECO, Alemania) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice gonadosomático} = \frac{\text{peso de ovarios (g)}}{\text{peso corporal (g)}} \times 100$$

2.3.3. Obtención de los COCs

La obtención de los ovarios se realizó en las instalaciones de la granja de Iruquis, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical siguiendo las normas de bioética y bienestar animal consideradas por la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE, 2022). Luego

se extrajeron los ovarios y se colocaron en lactato de Ringer previamente atemperado a 37°C para ser transportados al laboratorio. Los COCs se obtuvieron mediante la técnica de cortes “slicing” en una placa de búsqueda con PBS suplementado con suero fetal bovino al 10%, piruvato de sodio y amikacina, previamente atemperada.

2.3.4. Clasificación de los COCs

La búsqueda y la clasificación de los COCs se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (Nikon SMZ745) siguiendo los criterios de clasificación propuestos por (Hawk & Wall, 1994) tal como se describen a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Evaluación de la calidad de los ovocitos (COCs)

Tipo de ovocito	Características del cúmulo	Características del ovocito
Calidad buena (A)	Compacto, con varias capas de células con granulosas adherida; el citoplasma se ve claramente.	Homogéneo denso y finamente granulado.
Calidad intermedia (B)	Cúmulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida.	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.
Rechazados (C)	Células del cúmulo parcial o completamente expandido. O con falta de células del cúmulo (ovocito desnudado).	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.

Fuente: (Hawk & Wall, 1994).

2.3.5. Tinción Azul Brillante de Cresilo

Luego de la clasificación, los COCs fueron sometidos a la tinción del BCB para evaluar la actividad de la enzima G6PD, siguiendo la metodología propuesta por Catalá et al. (2009) y modificada por Ayala et al. (2018). Los ovocitos fueron teñidos con BCB a una concentración 52 µM diluido en PBS, suplementado con 6mg/ml de BSA y piruvato 2 µl/ml e incubado por 90 minutos a 38,5 °C en una atmósfera humidificada. Posterior a ello, se lavó cada grupo en PBS atemperado y fueron evaluados con un estereomicroscopio de luz clara con el siguiente criterio: BCB+ cuando el citoplasma presenta una coloración azulada por la baja actividad de

la enzima G6PD, lo que indica que el ovocito ha terminado su etapa de crecimiento; y BCB- cuando el citoplasma es incoloro por la alta actividad enzimática indicando que el ovocito se encuentra aún en etapa de crecimiento.

2.3.6. Distribución de las mitocondrias

Para evaluar la distribución de las mitocondrias en el citoplasma se utilizó la sonda fluorescente BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye (SCT136, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se preparó una solución madre de 200uM, para la cual se disolvió un vial de 50ug de colorante liofilizado en 400µL de dimetilformamida, se elaboró alícuotas a una concentración de 800nM y se almacenó a -20°C para su posterior uso. Los ovocitos se denudaron por 2 minutos en vórtex y se permeabilizaron previamente en tritón al 1% durante 15 minutos, posteriormente se lavaron con una solución de PBS, y se incubaron en el colorante durante 30 minutos a 38,5 °C en una atmósfera humidificada.

Tras la incubación, los ovocitos se lavaron dos veces en PBS, se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2% durante 30 minutos a 38,5 °C, y se lavaron dos veces más en PBS. Los ovocitos fueron clasificados según la distribución de las mitocondrias en el citoplasma, tal y como describieron previamente Bezzaouia et al. (2013) en distribución difusa (DM homogénea) y no difusa (AM), y de acuerdo a la presencia o ausencia de agregación mitocondrial descrita por Soares et al. (2020) con ciertas modificaciones, clasificándolas en agregación mitocondrial ausente, ligera y alta.

2.3.7. Estatus nuclear

Para determinar el estatus nuclear, los ovocitos fueron previamente fijados en una solución de glutaraldehído al 2%, y teñidos a una concentración de 1 mg/ml del fluorocromo Hoechst 33342. Los criterios a seguir fueron los propuestos para la evaluación de ovocitos bovinos descritos por Ayala et al. (2019) con ciertas modificaciones que se describen en la **Tabla 5**. Brevemente, debido a la frecuencia de ovocitos con núcleo disgregado nosotros consideramos incluir a estos en una tercera categoría denominada “degenerados”.

Tabla 5. Morfología nuclear de los ovocitos bovinos propuesta.

Inmaduro	Maduro	Degenerado
Vesícula germinal (VG) intacta.	<p>Metafase I (MI): Cromosomas se ubican en la placa metafásica, pero sin la presencia del corpúsculo polar. La cromatina muy compacta, refractante y punteada.</p> <hr/> <p>Anafase I: Cromosomas casi en los polos del uso mitótico (en migración), ausencia de corpúsculo polar.</p> <hr/> <p>Telofase I: Cromosomas ubicados en los polos del uso mitótico, ausencia de corpúsculo polar</p> <hr/> <p>Metafase II (MII): Cromosomas ubicados en la placa metafásica más la presencia del corpúsculo polar ubicado cerca de los cromosomas.</p>	Núcleo disgregado

Fuente: (Ayala et al., 2019).

La observación fluorescente (Hoechst 33342 y BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye) fue simultánea y se realizó mediante un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse Ci-E Epifluorescence) a una excitación de 405 nm para Hoechst 33342 y 490 nm para BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye.

2.3.8. Determinación del diámetro del ovocito y el grosor de la zona pelúcida

Para su medición, los COCs se desnudaron y montaron sobre un portaobjeto, y con la ayuda de una cámara (MSHOT MS60) acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon, Eclipse Ci, Japón) se realizó la medición del diámetro del ovocito y del grosor de la zona

pelúcida (ZP) con la ayuda de un software ImageJ (Java V 1.8.0.) a un aumento preestablecido de 40X. En ambos casos las medidas se expresaron en micras (μm).

2.4. Análisis Estadístico

Las proporciones de ovocitos BCB+, en diferentes estadios nucleares, con diferente distribución mitocondrial se analizaron mediante la regresión logística y chi-cuadrado del SAS (V 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Para analizar el diámetro ovocitario y el grosor de la zona pelúcida se utilizó un diseño factorial 2x3 (dos estadios del ciclo estral x tres categorías de COCs). El diámetro del ovocito y el grosor de la zona pelúcida, que no cumplieron los supuestos de normalidad, según la prueba de Shapiro-Wilks, se transformaron al *logaritmo 10*, y se analizaron mediante el análisis de varianza del SAS, utilizando el modelo lineal general (GLM). Para analizar el peso de las cobayas, los ovarios y el índice gonadosomático se utilizó el ANOVA de una vía. Las diferencias entre medias fueron comparadas con el método de los mínimos cuadrados. En ambos modelos, el de regresión logística y el de GLM, se consideraron como variables independientes la categoría de COCs (categoría A, B y C) y el estadio del ciclo estral (periovulatorio y diestro). Las proporciones se muestran en porcentajes, y las variables continuas en media \pm EE. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Peso de las cobayas y ovarios

El peso de las cobayas y de los ovarios (izquierdo y derecho) en los dos estadios del ciclo estral (periovulatorio y diestro) no fueron estadísticamente significativos, pero se observó una diferencia numérica en el ovario izquierdo que fue ligeramente más pesado que el derecho. Además, el índice gonadosomático tampoco reflejó diferencia significativa entre estadios del ciclo estral (**Tabla 6**).

Tabla 6. Peso de las cobayas y de los ovarios, e índice gonadosomático de acuerdo al estadio del ciclo estral (media \pm error estándar).

Peso	Estadio del ciclo estral	
	Periovulatorio	Diestro
Cobayas (g)	1440,2 \pm 42,5	1366,6 \pm 42,5
Ovarios (mg)		
<i>Izquierdo</i>	60,7 \pm 3,9	55,5 \pm 3,9
<i>Derecho</i>	58,2 \pm 3,5	49,7 \pm 3,5
Índice gonadosomático (%)	0,0042 \pm 0,02	0,0038 \pm 0,02

Índice gonadosomático: (peso ovarios/peso corporal) x 100. Sin diferencia estadística entre estadios del ciclo estral ($P > 0,05$)

3.2. Clasificación morfológica de los COCs

Se colectaron un total de 1053 COCs de 80 ovarios de 40 cobayas, 526 (49,95%) en estadio periovulatorio, y 527 (50,05%) en estadio de diestro. Los COCs recuperados fueron clasificados de acuerdo a sus características morfológicas en tipo A, B y C; independientemente del estadio del ciclo estral existió diferencia estadística significativa entre los diferentes tipos de COCs, con un mayor porcentaje de tipo B, seguido de tipo C y tipo A. En el estadio periovulatorio se encontró un mayor porcentaje tipo A seguido del tipo B y C; mientras que en diestro se observó un mayor número de COCs tipo C seguido del tipo B y A observando diferencia estadística entre los tipos de COCs (**Tabla 7**).

Tabla 7. Número y porcentaje de COCs en diferentes categorías de COCs y estadio del ciclo estral.

Estadio del ciclo estral	Tipo de COCs, n (%)			Total
	A	B	C	
Periovulatorio	156 ^a (64,5)	245 ^b (49,0)	125 ^c (40,2)	526 (49,95)
Diestro	86 ^a (35,5)	255 ^b (51,0)	186 ^c (59,8)	527 (50,05)
Total	242 (22,98)	500 (47,49)	311 (29,53)	1053 (100)

Letras diferentes en la misma línea difieren ^{a-b, a-c} $p < 0,0001$; ^{b-c} $p = 0,0143$.

3.3. Prueba Azul Brillante de Cresilo

La tinción BCB en los últimos años se ha venido investigando como un marcador del cese del crecimiento de ovocitos o un predictor no invasivo de las características subyacentes de su calidad y competencia (Catalá et al., 2011) (**Figura 5**). Por lo que se ha visto conveniente aplicarla en ovocitos de cobaya para lo cual se utilizaron 620 ovocitos; de estos, 39,4% resultaron positivos y 60,6% negativos. Se determinó que en el estadio periovulatorio existió un mayor porcentaje de BCB+, mientras que en el estadio de diestro se observó un mayor porcentaje de BCB-, independientemente del tipo de COC (**Tabla 8A**). Además, existió significancia estadística entre los tipos de COCs independientemente del estadio del ciclo estral, encontrándose un mayor porcentaje de BCB+ en los COCs tipo A (**Tabla 8B**).

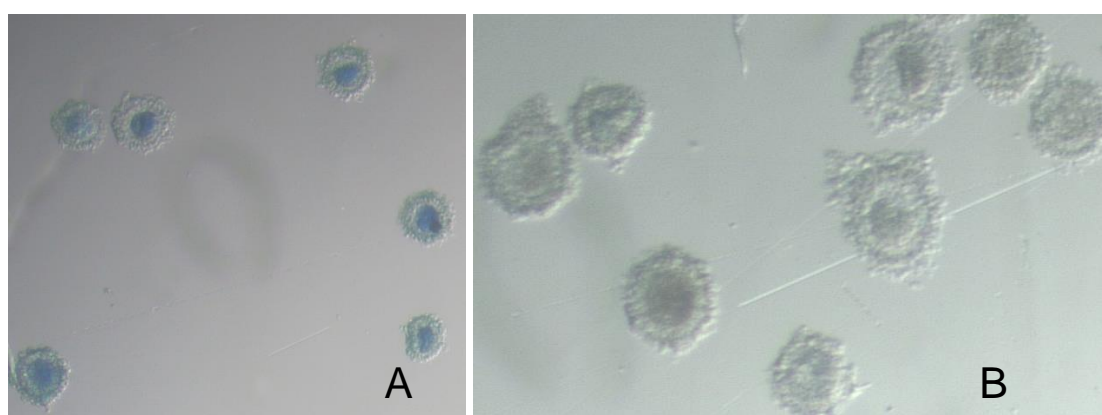


Figura 5. Complejos células del cúmulo-ovocito teñidos BCB+ (A) y BCB- (B)

Tabla 8A. Número y porcentaje de COCs positivos y negativos a la enzima G6PD de acuerdo al estadio del ciclo estral.

	Estadio del ciclo, n (%)		Total (%)
	Periovulatorio	Diestro	
Positivo	160 ^a (51,3)	84 ^b (27,3)	244 (39,4)
Negativo	152 ^a (48,7)	224 ^b (72,7)	376 (60,6)
Total	312 (50,3)	308 (49,7)	620 (100)

Letras diferentes en la misma línea difieren ^{a-b} p<0,0001

Tabla 8B. Número y porcentaje de COCs positivo y negativo a la enzima G6PD de acuerdo al tipo de COCs.

	Tipos de COCs, n (%)			Total (%)
	A	B	C	
Positivo	89 ^a (65,0)	142 ^b (46,9)	13 ^c (7,2)	244 (39,4)
Negativo	48 ^a (35,0)	161 ^b (53,1)	167 ^c (92,8)	376 (60,6)
Total	137 (22,1)	303 (48,9)	180 (29,0)	620 (100)

Letras diferentes en la misma línea difieren ^{a-c, b-c} p<0,0001; ^{a-b} p<0,0004

De acuerdo al estadio del ciclo estral, en el periovulatorio se observó que el porcentaje de BCB+ fue significativo mayor en el tipo A y B difiriendo del tipo C. En el estadio de diestro, el porcentaje de BCB+ tendió a disminuir de acuerdo a una menor calidad de COCs con diferencia estadística entre grupos. Además, al comparar los tipos de COCs entre estadios del ciclo estral se observó que los valores difirieron entre sí con significancia estadística (**Tabla 9**).

Tabla 9. Número y porcentaje de COCs positivos y negativos a la enzima G6PD de acuerdo al estadio del ciclo estral y al tipo COC.

	Estadio del ciclo estral							Total (%)
	Periovulatorio, n (%)			Total (%)	Diestro, n (%)			
	A	B	C		A	B	C	
Positivo	65 ^{a,1} (73,0)	84 ^{a,1} (59,2)	11 ^{b,1} (13,6)	160 (51,3)	24 ^{b,2} (50,0)	58 ^{c,2} (36,0)	2 ^{d,2} (2,0)	84 (27,3)
Negativo	24 ^{a,1} (27,0)	58 ^{a,1} (40,8)	70 ^{b,1} (86,4)	152 (48,7)	24 ^{b,2} (50,0)	103 ^{c,2} (64,0)	97 ^{d,2} (98,0)	224 (72,7)
Total	89 (28,5)	142 (45,5)	81 (26,0)	312 (100)	48 (15,6)	161 (52,3)	99 (32,1)	308 (100)

Para cada estadio del ciclo estral letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b, b-d, c-d} $p < 0,0001$; ^{b-c} $p < 0,05$.
Números diferentes entre estadios del ciclo estral para cada tipo de COC difieren: ¹⁻² $p < 0,01$.

3.4. Distribución de las mitocondrias

Para evaluar la distribución mitocondrial (DM) se utilizaron 942 ovocitos; de estos, 854 (90,6%) tuvieron una DM difusa y 88 (9,4%) no difusa. De acuerdo al tipo de COC, se observó que el 99,1% del tipo A, el 90,5% del B y el 83,3% del C tuvieron una DM difusa; mientras que en el 0,9% del tipo A, 9,5% del B y 16,7% del C la DM fue no difusa (**Figura 6**). Se detectó un efecto altamente significativo ($p < 0,0001$) del tipo de COC en la distribución mitocondrial (**Figura 7**).

En relación al patrón de agregación mitocondrial (AM) se observó que, de acuerdo al tipo de COC, los A (48,9%) presentaron mayor porcentaje de estructuras sin AM seguido de los B (43,8%) y C (25,2%) (**Figura 6**). Una mayor proporción de ovocitos con ligera AM se observaron en los COCs tipo C (12,6%), seguido de los B (10,7%) y de los A (4,4%). Así mismo, los COCs tipo A y B tuvieron un porcentaje casi igual de ovocitos con alta AM (A: 46,7% y B: 45,5%), que fue menor a los C (62,2%) (**Figura 8**). Se detectó un efecto altamente significativo ($p < 0,0001$) del tipo de COC en el patrón de agregación mitocondrial.

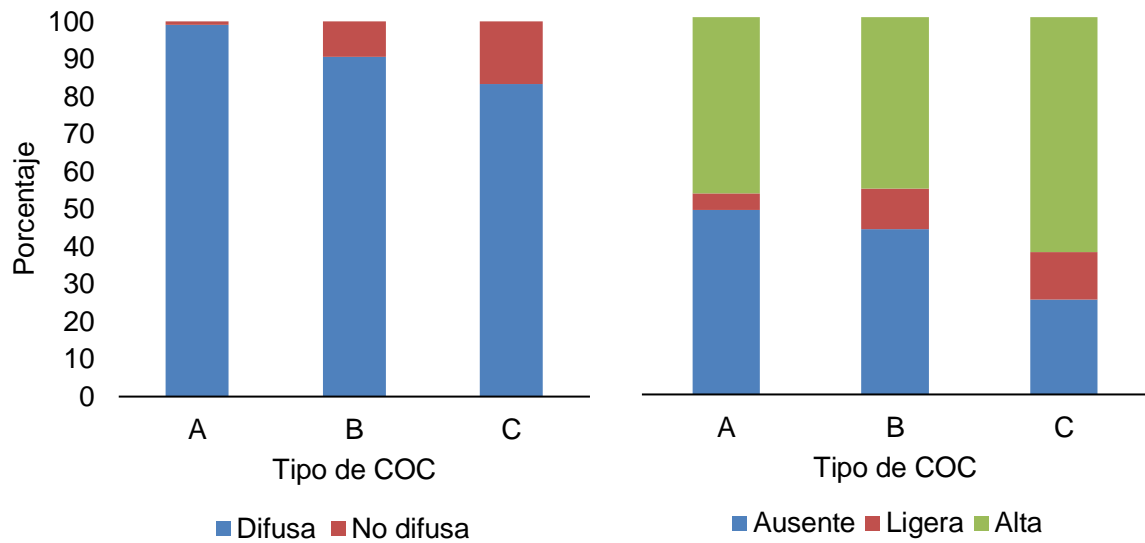


Figura 6. Distribución (panel izquierdo) y patrón de agregación mitocondrial (panel derecho) en los diferentes tipos de COC. La distribución y agregación mitocondrial en las tres categorías de COC difirieron: A-B-C $p < 0,0001$.

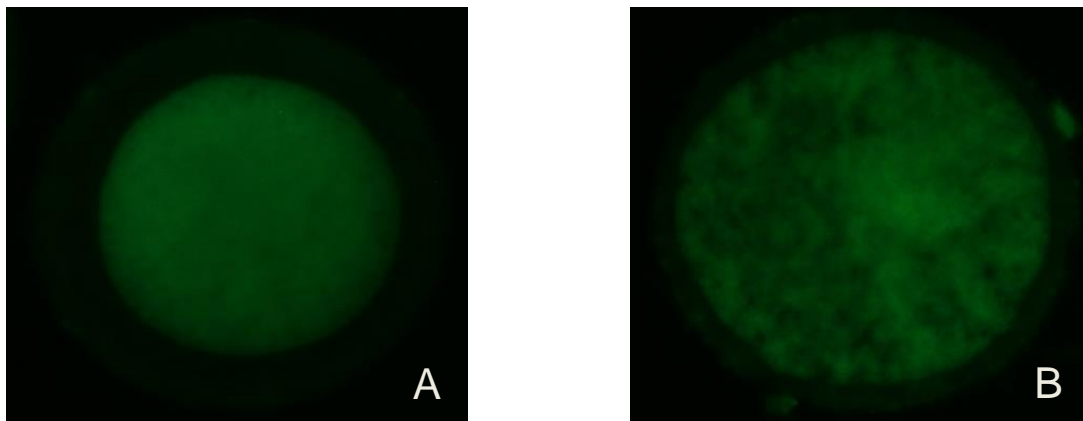


Figura 7. Distribución mitocondrial en ovocitos de cobayas sometidos a la tinción Biotracker 488 Green Mitochondria Dye; (A) ovocito con distribución difusa, (B) ovocito con distribución no difusa.

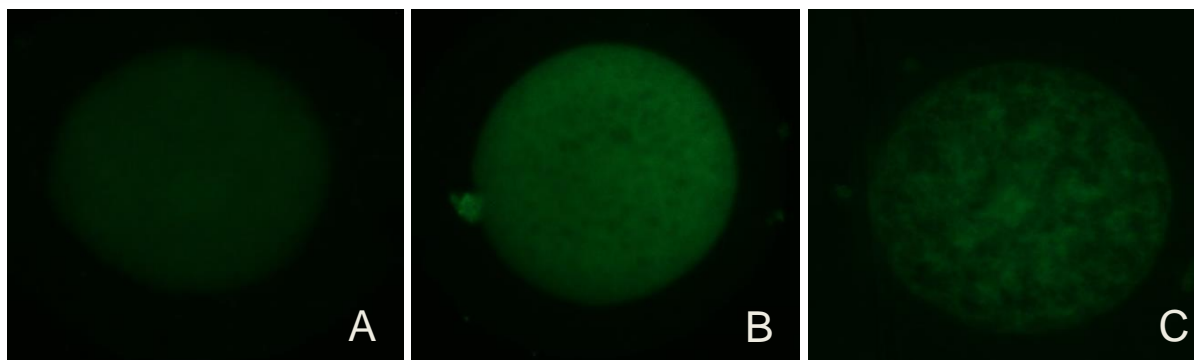


Figura 8. Agregación mitocondrial en ovocitos de cobayas sometidos a la tinción Biotracker 488 Green Mitochondria Dye; (A) ovocito con agregación ausente, (B) ovocito con agregación ligera y (C) ovocito con agregación alta.

La distribución mitocondrial de acuerdo al estadio del ciclo estral se presenta en la **Tabla 10**. En el estadio periovulatorio los COCs tipo A y C presentaron un porcentaje significativamente mayor que el tipo B. Por otro lado, en el estadio de diestro, la distribución difusa se presentó mayormente en el tipo A, seguido del tipo B y tipo C con significancia estadística. Al evaluar los tipos de COCs en los dos estadios del ciclo estral se estableció que los tipos A y B no presentaron significancias estadísticas no siendo así en los tipos C presentando valores diferentes.

Tabla 10. Distribución mitocondrial de acuerdo al estadio del ciclo estral y tipo de COC.

	Estadio del ciclo estral (%)							Total
	Periovulatorio, n (%)			Total	Diestro, n (%)			
	A	B	C		A	B	C	
Difusa	154 ^{a, c,1} (99,3)	219 ^{b, c,1} (92,4)	95 ^{c,1} (96,9)	468 (95,5)	75 ^{a,1} (98,7)	192 ^{b,1} (88,5)	119 ^{c,2} (74,8)	386 (85,4)
No difusa	1 ^{a, c,1} (0,7)	18 ^{b, c,1} (7,6)	3 ^{c,1} (3,1)	22 (4,5)	1 ^{a,1} (1,3)	25 ^{b,1} (11,5)	40 ^{c,2} (25,2)	66 (14,6)
Total	155 (31,6)	237 (48,4)	98 (20,0)	490 (100)	76 (16,8)	217 (48,0)	159 (35,2)	452 (100)

Para cada estadio del ciclo estral letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b-c} p<0,01. Números diferentes entre estadios del ciclo estral para cada tipo de COC difieren: ¹⁻² p<0,0001.

Al valorar la agregación mitocondrial en el estadio periovulatorio se observó que los COCs tipo A presentaron una AM ausente significativa comparada con los tipos B y C que mostraron

valores similares. Aunque en el estadio de diestro los COCs tipo A también presentaron una AM ausente, seguido del tipo B y C con diferencia estadística entre grupos. Los tipos de COCs en los dos estadios del ciclo estral referente a la agregación mitocondrial presentaron resultados similares excepto el tipo C que difirieron entre estadios (**Tabla 11**).

Tabla 11. Patrón de agregación mitocondrial en los ovocitos con distribución mitocondrial difusa de acuerdo al estadio del ciclo estral y tipo de COC.

	Estadio del ciclo estral							Total (%)
	Periovulatorio, n (%)			Total (%)	Diestro, n (%)			
	A	B	C		A	B	C	
Ausente	76 ^{a,1} (49,4)	97 ^{b, c,1} (44,3)	32 ^{c,1} (33,7)	205 (43,8)	36 ^{a,1} (48,0)	83 ^{b,1} (43,2)	22 ^{c,2} (18,5)	141 (36,5)
Ligera	72 ^{a,1} (46,7)	102 ^{b, c,1} (46,6)	47 ^{c,1} (49,5)	221 (47,3)	35 ^{a,1} (46,7)	85 ^{b,1} (44,3)	86 ^{c,2} (72,3)	206 (53,4)
Alta	6 ^{a,1} (3,9)	20 ^{b, c,1} (9,1)	16 ^{c,1} (16,8)	42 (9,0)	4 ^{a,1} (5,3)	24 ^{b,1} (12,5)	11 ^{c,2} (9,2)	39 (10,1)
Total	154 (32,9)	219 (46,8)	95 (20,3)	468 (100)	75 (19,4)	192 (49,8)	119 (30,8)	386 (100)

Para cada estadio del ciclo estral letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b-c} $p < 0,01$. Números diferentes entre estadios del ciclo estral para cada tipo de COC difieren: ¹⁻² $p < 0,01$.

Únicamente se observaron 88 ovocitos con distribución mitocondrial no difusa. De estos, 66 se encontraron en el diestro y 22 en el período periovulatorio. En el primer caso, el 98,5% tenían una AM alta y un 1,5% ligera (y correspondió a un COC tipo B); los resultados de los ovocitos con alta AM de acuerdo a la categoría de COCs fueron los siguientes: A: 1,5%, B: 36,9% y C: 61,6%. En el segundo caso (periovulatorio) la distribución de ovocitos con alta AM fue como sigue: A: 5%, B: 80%, C: 15%, mientras que los únicos dos ovocitos que tenían AM ligera se identificaron en los COC tipo B.

3.5. Estatus nuclear

Al evaluar el estatus nuclear (**Figura 9**) de acuerdo al tipo de COCs se observó que los ovocitos maduros se encontraron significativamente en el tipo A, seguido del tipo B y C; en cuantos a la categoría inmaduro difirieron estadísticamente entre sí de acuerdo a los tipos de COCs. La comparación entre la categoría degenerados mostro que su porcentaje va incrementando conforme la calidad va disminuyendo y fue estadísticamente significativo en los tres tipos de COCs (**Tabla 12**).

Tabla 12. Estatus nuclear de acuerdo al tipo de COC

	Tipo COCs, n (%)			Total (%)
	A	B	C	
Maduro	17 ^a (7,7)	23 ^b (5,5)	11 ^c (4,4)	51 (5,7)
Inmaduro	193 ^a (86,9)	335 ^b (79,9)	57 ^c (22,5)	585 (65,4)
Degenerado	12 ^a (5,4)	61 ^b (14,6)	185 ^c (73,1)	258 (28,9)
Total	222 (24,8)	419 (46,9)	253 (28,3)	894 (100)

Letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b-c} $p < 0,01$.



Figura 9. Estatus nuclear en ovocitos de cobayas sometidos a la tinción Hoechst 33342; (A) ovocito maduro en MII con presencia de cuerpo polar, (B) ovocito inmaduro con presencia de VG y (C) ovocito degenerado con núcleo fragmentado.

Los resultados de la evaluación del estatus nuclear de acuerdo al tipo de COC y al estadio del ciclo estral se muestran en la **Tabla 13**. En el estadio periovulatorio se observó que los COCs tipo B tuvieron un mayor porcentaje de maduración, seguido del tipo A y C, respectivamente existiendo diferencia estadística significativa entre tipos; en cambio en el estadio de diestro se observó que los COCs tipo A tuvieron un mayor porcentaje de maduración nuclear comparado con el tipo B y C con significancia estadística entre grupos. En la categoría inmaduros, tanto en el estadio periovulatorio y diestro los porcentajes tienden a disminuir de acuerdo a una menor calidad del tipo de COCs, también se observó que el porcentaje de ovocitos con núcleo degenerado incrementó significativamente en el tipo C seguido del tipo B y A con significancia estadística. Al comparar los tipos de COCs de acuerdo

a cada estadio del ciclo estral se observó que los valores obtenidos en los tipos de COCs A y C fueron estadísticamente similares tanto en el estadio periovulatorio como en el de diestro, no siendo así en el tipo B el cual difiere en las dos etapas.

Tabla 13. Efecto del tipo de COC y del estadio del ciclo estral sobre la tasa de maduración.

	Estadio del ciclo estral							Total (%)
	Periovulatorio, n (%)			Total (%)	Diestro, n (%)			
	A	B	C		A	B	C	
Maduro	10 ^{a,1} (6,7)	16 ^{b,1} (7,2)	4 ^{c,1} (4,2)	30 (6,4)	7 ^{a,1} (9,6)	7 ^{b,2} (3,5)	7 ^{c,1} (4,4)	21 (4,9)
Inmaduro	133 ^{a,1} (89,3)	181 ^{b,1} (81,5)	21 ^{c,1} (22,1)	335 (71,9)	60 ^{a,1} (82,2)	154 ^{b,2} (78,2)	36 ^{c,1} (22,8)	250 (58,4)
Degenerado	6 ^{a,1} (4,0)	25 ^{b,1} (11,3)	70 ^{c,1} (73,7)	101 (21,7)	6 ^{a,1} (8,2)	36 ^{b,2} (18,3)	115 ^{c,1} (72,8)	157 (36,7)
Total	149 (32,0)	222 (47,6)	95 (20,4)	466 (100)	73 (17,1)	197 (46,0)	158 (36,9)	428 (100)

Para cada estadio del ciclo estral letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b} $p < 0,05$; ^{a-c, b-c} $p < 0,0001$
 Números diferentes entre estadios del ciclo estral para cada tipo de COC difieren: ¹⁻² $p < 0,05$.

3.6. Distribución mitocondrial y su relación con el estatus nuclear

La proporción de ovocitos maduros, inmaduros y degenerados varió en función del patrón de agregación mitocondrial (**Figura 10**). En los ovocitos sin AM el 33,3% estaban maduros, el 48,8% inmaduros y el 13,2% degenerados. En la AM ligera los ovocitos se distribuyeron en la forma siguiente: 58,8% maduros, 42,1% inmaduros y 53,5% degenerados. Mientras que en los ovocitos que tuvieron una AM alta el 7,9% estaban maduros, el 9,1% inmaduros y el 33,3% degenerados. El efecto de la agregación mitocondrial frente al estatus nuclear fue altamente significativo ($p < 0,0001$) (**Figura 10**).

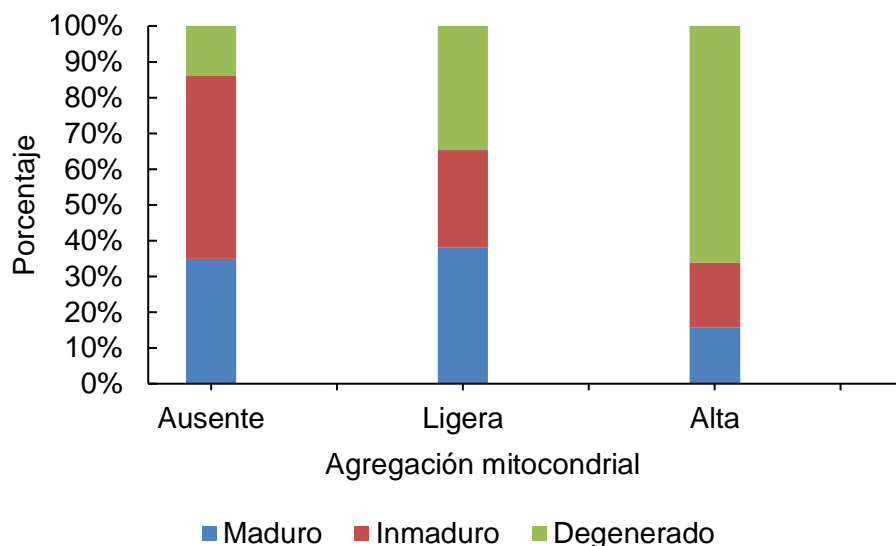


Figura 10. Porcentajes de ovocitos con agregación mitocondrial ausente, ligera y alta relacionada al estatus nuclear (maduro, inmaduro y degenerado). El estatus nuclear entre los tres patrones de agregación mitocondrial difiere: $p < 0,0001$.

Las proporciones de ovocitos maduros, inmaduros y degenerados de acuerdo al tipo de COC y patrón de agregación mitocondrial se presentan en la **Figura 11**. En los COCs tipo A y B con ausencia de AM se observó que el 96,2% y 90,9% respectivamente, estaban inmaduros, y solo el 42,6% de los C tenían este estadio de progresión nuclear. El porcentaje de maduros se incrementó en similar proporción en los COCs A (1,9%); B (5,1%) y C (11,1%). Casi la mitad de los COCs tipo C (46,3%) estaban degenerados, y ese porcentaje se redujo a una fracción en los A (1,9%) y B (4%).

Una mayor proporción de COCs A (80,6%) y B (78,1%) con ligera AM estaban inmaduros y solo el 17,4% de los C lo estaba. La proporción de maduros se redujeron equitativamente en los COCs A (13,6%), B (6,2%) y C (3,8%). La mayoría de los COCs tipo C estaban degenerados (78,8%), mientras que un porcentaje considerablemente menor lo estaban en los grupos B (15,7%) y A (5,8%).

En el caso de los ovocitos con alta AM, la mayor proporción de los COCs A (58,4%) y B (54,7%) estaban inmaduros, mientras que un considerable menor porcentaje de los C (16,4%) tenían ese estadio nuclear. Asimismo, el 8,3% de los COCs A, 4,7% de los B y 0% de los C habían madurado. En los degenerados los porcentajes fueron los siguientes: A: 33,3%; B: 40,6% y C: 83,6%. La agregación mitocondrial y el tipo de COC afectaron significativamente ($p < 0,0001$) el estatus nuclear.

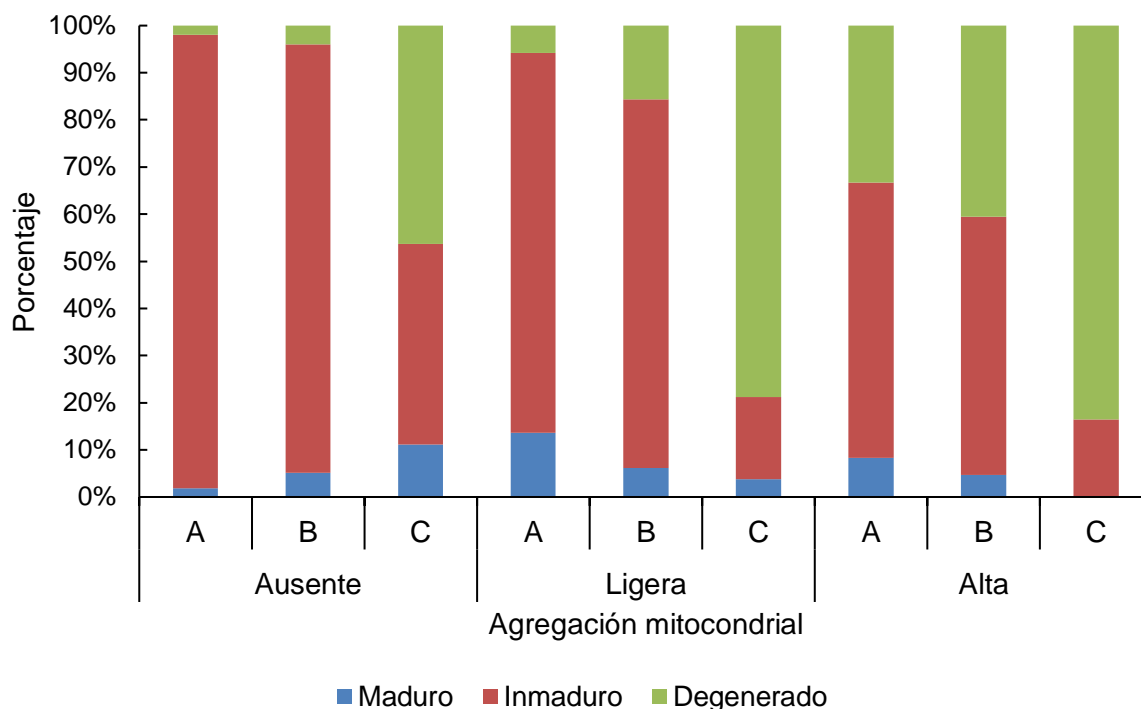


Figura 11. Estatus nuclear de acuerdo al tipo de COC y al patrón de agregación mitocondrial (ausente, ligera y alta). El estatus nuclear para cada patrón de agregación mitocondrial difiere: Ausente A-C, B-C $p < 0,0001$; Ligera A-B, A-C, B-C $p < 0,01$; Alta A-C, B-C $p < 0,0001$.

3.7. Determinación del diámetro del ovocito y el grosor de la zona pelúcida

Los ovocitos en estadio de diestro fueron significativamente más grandes en diámetro ($p = 0,0126$) que los ovocitos en estadio periovulatorio. Por otro lado, la zona pelúcida fue más gruesa en el estadio periovulatorio que en el estadio de diestro existiendo diferencia estadística significativa ($p < 0,0001$) (**Tabla 14A**).

Tabla 14A. Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida de acuerdo al estadio del ciclo estral (media \pm error estándar).

	Estadio del ciclo estral	
	Periovulatorio	Diestro
Diámetro ovocitario (μm)	86,1 \pm 0,6 ^a (n=491)	88,3 \pm 0,6 ^b (n=455)
Grosor de la ZP (μm)	6,7 \pm 0,06 ^b (n=435)	5,5 \pm 0,05 ^c (n=429)

Letras diferentes entre estadios del ciclo estral difieren: ^{a-b} $p = 0,0126$; ^{b-c} $p < 0,0001$.

Al evaluar el diámetro ovocitario de acuerdo al tipo de COCs, los tipos A fueron los más grandes, seguido de los tipos B y los tipos C con diferencia estadística entre grupos. El grosor de la zona pelúcida en los COCs tipo A fue mayor difiriendo de los tipos B y C en donde no se observó significancia.

Tabla 14B. Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida de acuerdo al tipo de COC (media ± error estándar).

	Tipo de COC		
	A	B	C
Diámetro ovocitario (µm)	90,9 ± 0,8 ^a (n=233)	87,6 ± 0,6 ^b (n=456)	83,2 ± 0,8 ^c (n=257)
Grosor de la ZP (µm)	6,3 ± 0,07 ^c (n=203)	6,1 ± 0,05 ^d (n=415)	6 ± 0,07 ^d (n=246)

Letras diferentes entre tipos de COCs difieren: ^{a-b} p=0,0014; ^{a-c, b-c} p<0,0001; ^{c-d} p<0,02.

Al evaluar el diámetro ovocitario en el estadio periovulatorio, los COCs tipo A fueron significativamente más grandes que los tipos B y C, mientras que el grosor de la zona pelúcida fue estadísticamente mayor en el tipo A que en el tipo B y C. Con respecto al estadio de diestro, se observó que el diámetro ovocitario de los COCs tipo A y B fue mayor difiriendo del tipo C; además el grosor de su zona pelúcida fue similar en los tres tipos de COCs (**Tabla 15**).

El diámetro ovocitario en los tipos de COCs A y B reflejaron valores similares en los dos estadios del ciclo estral, mientras que el tipo B difirieron encontrando un mayor diámetro en el estadio de diestro, en cuanto a la zona pelúcida se observó que fue significativamente más gruesa en el estadio periovulatorio que en el estadio de diestro en los tres tipos de COCs (**Tabla15**).

Tabla 15. Diámetro del ovocito y grosor de la zona pelúcida de acuerdo al tipo del ovocito y el estadio del ciclo estral (media \pm error estándar).

	Estadio del ciclo estral					
	Periovulatorio			Diestro		
	A	B	C	A	B	C
Diámetro	90,6 \pm 1,0 ^{a,1}	85,2 \pm 0,8 ^{b,1}	82,6 \pm 1,2 ^{b,1}	91,2 \pm 1,4 ^{a,1}	89,9 \pm 0,8 ^{a,2}	83,8 \pm 1,0 ^{b,1}
(μm)	(n=155)	(n=238)	(n=98)	(n=78)	(n=218)	(n=159)
Z. pelúcida	7,0 \pm 0,1 ^{b,1}	6,5 \pm 0,1 ^{c,d,1}	6,7 \pm 0,1 ^{d,1}	5,6 \pm 0,1 ^{a,2}	5,6 \pm 0,1 ^{a,2}	5,4 \pm 0,1 ^{a,2}
(μm)	(n=125)	(n=214)	(n=96)	(n=78)	(n=201)	(n=150)

Letras diferentes dentro de cada estadio del ciclo estral difieren: ^{a-b-c} $p < 0,0001$; ^{b-d} $p < 0,05$. El grosor de la zona pelúcida de cada tipo de COCs entre estadios del ciclo estral difieren: ¹⁻² $p < 0,0001$. **Diámetro:** diámetro ovocitario. **Z. pelúcida:** grosor de la zona pelúcida.

4. Discusión

El peso de los ovarios de las cobayas en los dos estadios fue similar a los resultados reportados por Fernández et al., (2018) quienes obtuvieron un mayor peso en la etapa de proestro ($68,4 \pm 11,4$ mg) que en la de diestro ($56,8 \pm 11,4$ mg). Por otro lado, en un estudio realizado por Dominguez, (2023) en cobayas obtuvo un peso de 50 ± 20 mg; mientras que en otra investigación, Felipe et al., (2015) obtuvieron una medida de 120 ± 40 mg en un tipo de roedor como el coipo teniendo en cuenta que el peso de este animal es de 4795 mg.

La relación porcentual entre el peso de los ovarios y el peso animal fue de $0,0042 \pm 0,02\%$ en el estadio periovulatorio y $0,0038 \pm 0,02\%$ en el diestro, en otras especies como las ratas y ratones el índice gonadosomático fue de 0.0032 Ajala et al. (2013) y 0.0044% Wu et al., (2015), respectivamente.

De acuerdo al número de COCs se recuperó una media 13,2 dichos resultados obtenidos son aparentemente similares a los conseguidos por Wang et al. (2019), quienes reportaron una media de 13,6 COCs, pero mediante la utilización de la técnica de punción folicular la misma que pudo influir en el número y calidad de COCs obtenidos. Sin embargo, Zhinin & Buñay, (2022) mediante la misma técnica de slicing obtuvieron una media 14,6 COCs ligeramente superior a los resultados obtenidos de esta investigación. Además, reportaron que de acuerdo al tipo de COCs obtuvieron 31,05% tipo A; 34,61% tipo B y 34,34% tipo C, resultados muy variables a los obtenidos, los mismo que fueron 22,98% tipo A; 47,49% tipo B y 29,53% tipo C, estas diferencias se pudieran explicar ya que Zhinin & Buñay, (2022) utilizaron ovarios de camal (matadero) mismos que pudieron encontrarse en distintos estadios del ciclo estral.

Para la obtención de COCs en estadio periovulatorio y diestro se procedió a realizar un protocolo de sincronización de celo en la cobaya en mismo que consistió en la administración de progesterona vía oral en una dosis de 0,22 mg/kg durante 15 días. Para el estadio periovulatorio los ovarios se colectaron en el día 2 postsincronización aprovechado la segunda onda folicular; mientras que para diestro se colectaron el día 9 postsincronización. De acuerdo al estadio periovulatorio y tipo de COCs recuperados fueron 29,66% tipo A; 46,58% tipo B y 23,76% tipo C, siendo resultados muy variables a los reportados por Wang et al. (2019), 53,20% tipo A; 36,80% tipo B y el 10,0% tipo C, dicha variabilidad se puede explicar por la técnica utilizada para la colecta de los COCs ya que Wang et al., (2019), realizaron punción folicular lo que le permite seleccionar de mejor manera los folículos periovulatorio. Los resultados en el estadio de diestro fueron obtenidos por primera vez y no se encontró información adecuada para poder contrastarlos los mismos que fueron un 16,31% de tipo A, un 48,39% de tipo B y un 35,30% de tipo C. Además, hay que considerar que en

los estudios citados trabajaron con variedades de cobayas de laboratorio o de matadero cuyo manejo probablemente fue muy diferente al utilizado en las cobayas de este estudio, que recibieron un manejo general y alimenticio uniforme desde al menos 30 días antes de la colecta de ovocitos.

Al valorar la tinción de BCB, se determinó que existió un mayor número de ovocitos BCB+ en el estadio periovulatorio (51,3%) comparado con el diestro (27,3%), coincidiendo con los resultados obtenidos por Espinosa & Crespo, (2022), en su estudio realizado en gatas, donde obtuvieron el 52,2% en la etapa de proestro; lo cual sugiere que durante esta etapa, una mayor proporción de ovocitos culminaron su crecimiento y alcanzaron una mayor competencia, por lo cual la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa disminuye, haciendo que el BCB no sea degradado y el citoplasma tome una coloración azulada Rodríguez-González et al., (2002).

Al aplicar la tinción BCB en ovocitos de cobayas como marcador del estatus metabólico se obtuvo resultados similares a los reportados por Zhinin & Buñay, (2022) en ovocitos tipo A, pero difirieron en los tipos B y C, ya que en su investigación obtuvieron un mayor porcentaje de ovocitos BCB+ (60% y 63.5% respectivamente). En las dos investigaciones se utilizaron una tinción de diferentes casas comerciales y concentraciones diferentes ya que nuestro experimento preliminar había demostrado que a una concentración de 26 μm los ovocitos no podían teñirse lo cual podría explicar la diferencia entre resultados. Adams et al., (1992) mencionaron que los ovocitos de mayor calidad morfológica tienen una mejor actividad de crecimiento frente a los ovocitos de menor calidad coincidiendo con nuestros resultados.

De acuerdo con Santos et al. (2006), los ovocitos de buena calidad deben contener un grupo mitocondrial óptimo que produzca niveles suficientes de ATP para asegurar su maduración, desarrollo y la generación de blastocistos de la mejor calidad después de la fertilización. Además, Dumollard et al. (2003), menciona que, durante la maduración, la creciente población de mitocondrias se reubica en diferentes regiones del ovocito. Parece que las fases tempranas de reubicación son similares entre especies mientras que las fases finales son más diferentes, generando los patrones variables de distribución de mitocondrias observados en ovocitos. Basados en los principios anteriormente mencionados, y luego de aplicar la prueba del BioTrackerTM 488Green Mitochondria Dye por primera vez a COCs de cobayas, la distribución de mitocondrias se clasificó en difusa (DM homogénea en todo el citoplasma) y no difusa (DM con AM en el citoplasma), que fue semejante a la obtenida por Torner et al. (2004) y Bezzaouia et al. (2013), quienes mediante una sonda fluorescente diferente MitoTracker Orange CMTM Ros y Tinción de mitocondrias con DIOC₆ respectivamente,

describieron una distribución mitocondrial homogénea (mitocondrias distribuidas homogéneamente por todo el citoplasma) y heterogénea (presenta AM). Además, los resultados reportados por Liu et al., (2010) en humanos, coincidieron con nuestros resultados, ya que los COC's presentaron un patrón de distribución difuso, que se identificó cuando las mitocondrias se extendían por todo el citoplasma. Los hallazgos de este estudio son consistentes con las observaciones mencionadas previamente sobre el rol funcional de las mitocondrias. Nosotros observamos una mayor proporción de ovocitos tipo A con las mitocondrias distribuidas homogéneamente en el citoplasma, seguido de los B y C. Contrariamente, la distribución mitocondrial no difusa fue 10,9 y 19,2 veces menor en los ovocitos A que en los B y C respectivamente.

También se pudo observar que algunos COCs presentaron patrones de AM que se clasificaron en ausente (sin AM), ligera (pocos AM) y alta (muchos AM), siendo parecido a los agregados estudiados por Soares et al., (2020), quienes observaron patrones de AM (grandes y pequeños agregados y falta de ellos) en COCs de origen bovino. Nuestros resultados también coinciden con los obtenidos por Nishi et al., (2003), en la evaluación de COCs de ratones.

Varios estudios mencionan el uso del fluorocromo Hoechst 33342 para evaluar el estado de maduración nuclear después de un proceso de *maduración in vitro*, sin embargo, en nuestra investigación la valoración del estatus nuclear se llevó a cabo en ovocitos recién colectados de los ovarios, no existiendo investigaciones que hayan hecho un estudio similar en cobayas. No obstante, Zhinin & Buñay, (2022) en su estudio de valoración de ovocitos después de someterles a maduración *in vitro* mencionan que hubo una reanudación meiótica del 40,4% en ovocitos tipo A, un 31,7% en los B y un 18,2% en los C. Como era de esperarse, los resultados obtenidos en nuestro estudio en ovocitos con maduración espontánea mostraron que apenas el 7,7% del tipo A, el 5.5% de los B y el 4.4% de los C habían reiniciado la meiosis y experimentada maduración nuclear.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el mayor porcentaje de ovocitos inmaduros (VG) tenían una distribución mitocondrial difusa sin AM. Lo que concuerda con hallazgos previos en ovocitos caninos Saffie, (2009), en los que obtuvo una DM homogénea cuando el ovocito se encontraba en VG. Además, Stojkovic et al., (2001), encontraron que los ovocitos bovinos no maduros presentaron la tinción más intensa y homogénea. De la misma manera, Leoni et al., (2015) al evaluar ovocitos de oveja observaron una mayor DM homogénea en los que tenían estatus de VG. Estos resultados también fueron parecidos a los reportados por Torner et al., (2004), quienes encontraron una distribución de

mitocondrias homogénea en los ovocitos que estaban en las primeras etapas de la maduración preovulatoria. Además, en relación a la agregación mitocondrial ligera, se encontró que la mayor proporción de ovocitos se encontraban maduros, los que concuerda con los hallazgos de Nishi et al., (2003), quienes observaron en ovocitos de ratones que conforme avanzó el proceso de maduración el ovocito presentó mayor AM, lo que también concuerda con la evaluación de ovocitos caninos realizada por Saffie, (2009), que reportó resultados similares.

Una de las maneras de clasificar a los ovocitos de acuerdo a su calidad se basa en la evaluación de su diámetro. Se sabe que la capacidad del ovocito para reanudar y completar la meiosis *in vitro* está relacionada con su tamaño Duma, (2019); por lo que en nuestro estudio se midió el citoplasma de ovocitos de cobaya obteniéndose una media de $86,1 \pm 0,6 \mu\text{m}$ en el periovulatorio y $88,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$ en el diestro, mientras que el grosor de la zona pelúcida fue de $6,7 \pm 0,06 \mu\text{m}$ en la etapa periovulatoria y $5,5 \pm 0,05 \mu\text{m}$ en el diestro. Valores algo menores en el diámetro ovocitario fueron reportados por Fernández et al., (2018) quienes obtuvieron una media de $75,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$ en cobayas, aunque difirió en el grosor de la zona pelúcida que tuvo una media de $12,1 \pm 0,37 \mu\text{m}$, resultado similar a lo observado por Zhinin & Buñay, (2022) que obtuvieron una media de $13,5 \pm 2,95 \mu\text{m}$. Por otro lado, se reportó Zhinin & Buñay, (2022) un diámetro ovocitario promedio superior al obtenido en esta investigación, con una media de $106,5 \pm 10,96 \mu\text{m}$.

En este estudio se obtuvo un diámetro mayor en los ovocitos tipo A, seguidos de los B y C. Similarmente, Zhinin & Buñay, (2022) observaron un diámetro citoplasmático mayor en ovocitos A que disminuyeron progresivamente en los ovocitos de menor calidad. Así mismo, Loutradis et al., (1999) mencionaron que los ovocitos con mayor diámetro y una zona pelúcida más delgada se relacionan con ovocitos de mayor calidad y tasa más altas de fecundación. No siendo así en el caso de la zona pelúcida, ya que su grosor fue disminuyendo conforme la calidad de los ovocitos fue menor.

En especies similares, en un estudio realizado en ratones Cortvrindt et al., (1996) indica un promedio de $55 \pm 4 \mu\text{m}$ en ovocitos obtenidos de folículos preantrales, mientras que Ueno & Niimura, (2008) reportaron una media $75,9 \mu\text{m}$ en ratones, por otro lado Sadeu et al., (2007) obtuvieron $78 \mu\text{m}$ de diámetro en ovocitos de cobayas, medidas más cercanas a las obtenidas en nuestro estudio.

Conclusiones

En general, la aplicación de métodos no invasivos en ovocitos de cobaya para identificar características de calidad, desarrollo, maduración y morfometría fueron efectivos para determinar ovocitos potencialmente más competentes.

- Los COCs colectados en el estadio periovulatorio presentaron un mayor porcentaje de ovocitos que reaccionaron positivamente a la prueba de BCB, mientras que en el estadio de diestro el mayor porcentaje de COCs fue BCB-. En cuanto al tipo de COC, el mayor porcentaje de BCB+ se encontró en el tipo A, mientras que en los B y C hubo un mayor porcentaje de BCB-.
- Un mayor porcentaje de ovocitos tipo A presentaron una DM difusa y agregación mitocondrial ausente, en cambio, una mayor proporción de ovocitos tipos B tuvieron una DM difusa y una alta agregación mitocondrial. Los ovocitos tipo C en su mayoría presentaron una DM no difusa y altos agregados mitocondriales; además, el mayor porcentaje de ovocitos recuperados eran inmaduros independientemente del estadio del ciclo estral y del tipo de COC.
- El diámetro citoplasmático y el grosor de la zona pelúcida tendieron a disminuir de tamaño en los COCs tipo B y C con respecto al tipo A.

Recomendaciones

- Para la obtención de COCs se recomienda el uso de la técnica de punción folicular, ya que sería posible una mejor selección de los folículos antrales y de ovocitos con características representativas de las fases estudiadas del ciclo estral.
- La tinción BCB es un método efectivo para identificar COCs de calidad, pero debido al número elevado de COCs BCB negativos, sería interesante realizar investigaciones para evaluar la maduración y fecundación *in vitro* con el fin de determinar la competencia de los ovocitos de cada tipo en cada fase del ciclo estral.
- La evaluación de las placas con ovocitos sometidos a la sonda fluorescente BioTracker™ 488 Green Mitochondria Dye se debe realizar en un corto tiempo ya que la tinción se degrada con rapidez.

Referencias

- Adams, G. P., Matteri, R. L., Kastelic, J. P., Ko, J. C. H., & Ginther, O. J. (1992). Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, *94*(1), 177–188. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940177>
- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, *10*(12), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Ajala, O. O., Oyeyemi, M. O., Fayomi, A. P., & Olaniyan, D. (2013). Gonadosomatic index of female Wister rats treated with graded concentration of Aloe Vera gel. *Journal of Medicinal Plants Research*, *7*(7), 339–342. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.333>
- Alatraste, V., Paiz, B., Jimenez, M., Barrientos, E., Martínez, O., Torres-Soto, M., Martínez, M., Limón, I., Escamilla-Weinmann, C., & Luna, F. (2009). *Parámetros reproductivos en las cobayas Cavia porcellus del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. January*, 1–13.
- Almeida, A. (2016). *Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho*.
- Alvarez, G. M., Dalvit, G. C., Achi, M. V., Miguez, M. S., & Cetica, P. D. (2009b). Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell*, *33*(3), 167–177. <http://www.scielo.org.ar/pdf/biocell/v33n3/v33n3a05.pdf%0A>
- Anguita, B. (2003). Estudio molecular y de apoptosis en ovocitos de cabras prepúberes y su relación con el desarrollo embrionario. In *Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Anzaldúa, S., Perez, M., Cerbon, M., & Camacho, I. (2003). Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionariotemprano. *Ciencia Veterinaria*, *9*(212101), 229–268.
- Araníbar, E., & Echevarría, L. (2013). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (Cavia porcellus) Andina y Perú. *Rev Inv Vet Perú*, *25*(1), 29–36.
- Ayala, L., Palacios, T., Nieto, P., Calle, G., Rodas, R., Dutan, J., Murrillo, Y., & Samaniego, J. (2019). Competence to restart meiosis of oocytes from different follicle sizes obtained

- from slaughterhouse ovaries. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(3), 1164–1174. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15437>
- Ayala, L., Samaniego, J., Nieto, P., Rodas, R., Dután, J., Calle, G., Murillo, Y., Vázquez, J., Argudo, D., & Perea, F. (2018). Competence of the oocyte obtained by ovum pick-up as evaluated by the bright cresyl blue test. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(2), 552–558.
- Barahona, M., & Quishpe, O. (2012). *Inducción de superovulación en cobayas primerizas, usando gonadotropina sérica con tres dosis diferentes*. Universidad Central del Ecuador.
- Bazán, F., León, R., Ling, A., Zuiko, A., Alarcón, P., & Linares, G. (2014). Crianza de cuyes. In *Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social* (Vol. 4). Tarea Asociación Gráfica Educativa.
- Bezzaouia, A., Gallo, A., Silvestre, F., Tekaya, S., & Tosti, E. (2013). Distribution pattern and activity of mitochondria during oocyte growth and maturation in the ascidian *Styela plicata*. *Zygote*, 22(4), 462–469. <https://doi.org/10.1017/S0967199412000640>
- Bitzinger, N. H. (2008). *Abdominale Sonographie beim Meerschweinchen (Cavia aperea f. porcellus, L. 1758)* (Issue I).
- 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>
- Brier, J., & Jayanti, L. (2020). *Protocolo general*. 21(1), 1–9. <http://journal.um-surabaya.ac.id/index.php/JKM/article/view/2203>
- Burrola, E., & González, E. (2015). Efectos de los RNAm maternos sobre la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos Effects of the maternal mRNA on the maturation of the oocyte and early embryonic development in mammals. Review. *EMBRIONARIO Rev Mex Cienc Pecu*, 6(1), 39–68.
- Cañón, K. (2018). *Caracterización del sistema EGF e IGF-1 en el ovario y su papel en la maduración in vitro de oocitos de cobaya*. 216.
- Cañón, K., & Córdova, X. (2012). Evaluación de la maduración in vitro de oocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) en Ecuador: resultados preliminares. *Reduca*, 4(15), 5003.
- Caraty, A., & Skinner, D. C. (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-

- releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, 140(1), 165–170. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6444>
- Catalá, M. G., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaguera, R., Papillier, P., & Paramio, M. T. (2011). Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, 142(4), 517–527. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0528>
- Catalá, M., Morato, R., Romaguera, R., Izquierdo, D., & Paramio, T. (2009). Estudio De La Actividad Mitocondrial De Ovocitos De Cordera Seleccionados Mediante El Test Del Bcb (Azul De Cresol Brillante). *AIDA*, II, 684–686.
- Cecchino, G. N., Seli, E., Alves da Motta, E. L., & García-Velasco, J. A. (2018). The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(6), 686–697. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.02.007>
- Chauca, L. (1995). La produccion de cuyes (*Cavia porcellus*) en los paises andinos. *World Anim. Rev*, 83(2), 9–19.
- Chong, F., Bahena, I., Casas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González, C., Cuapio, P., & Bonilla, E. (2018). *La ATPasa6 participa en la maduracion de ovocitos de cerdo in vitro*. 21(2), 85–90. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.1>
- Conover, J. C., & Gwatkin, R. B. L. (1988). Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(2), 681–690. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820681>
- Cortvrindt, R., Smits, J., & Van Steirteghem, A. C. (1996). In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Human Reproduction*, 11(12), 2656–2666. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019188>
- Dellman, H. (1994). *Histologia Veterinaria* (2nd ed.). ACRIBIA.
- Dominguez, L. (2023). Universidad Nacional De Loja Autor [Universidad Nacional de Loja]. In *Universidad Nacional De Loja*. http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/17025/1/TESIS_FERNANDO.pdf WILSON

- Duma, J. M. (2019). Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. [Universidad de Cuenca]. In *Universidad de Cuenca*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32159/1/TRABAJO-DE-TITULACIÓN.pdf>
- Dumollard, R., Hammar, K., Porterfield, M., Smith, P. J., Cibert, C., Rouvière, C., & Sardet, C. (2003). Mitochondrial respiration and Ca²⁺ waves are linked during fertilization and meiosis completion. *Development*, 130(4), 683–692. <https://doi.org/10.1242/dev.00296>
- Echeverría, J. (2006). Endocrinología Reproductiva: Prostaglandina F2a en vacas. Revisión bibliográfica (Reproductive Endocrinology: F2a Prostaglandin in cows. A Review). *Redvet*, VII(1), (12 pg, 215 KB).
- Espinosa, M., & Crespo, Y. (2022). *Caracterización morfológica y evaluación de la calidad de COC´s de acuerdo con el ciclo estral en la especie Felis catus*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/37820/1/Trabajo de Titulacion.pdf>
- Felipe, A. E., Fumuso, E., & Lombardo, D. (2015). Observaciones sobre parámetros anatómicos de los ovarios del coipo (*Myocastor coypus bonariensis*) en la madurez sexual. *In Vet*, 17(2), 179–186.
- Fernández, A., Encalada, T., Garzón, H., Guaman, A., Ayala, L., Rosales, C., Argudo, D., & Perea, F. (2018). Caracterización morfológica de útero, ovarios y ovocitos de cobayas criollas (*Cavia porcellus*) de la sierra sur de Ecuador. *XXVI Reunión de La Asociación Latinoamericana de Producción Animal V Simposio Internacional de Producción Animal*, 149.
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 14–22.
- Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., & Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 47(5), 977–987. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00054-X)
- Galassi, P., & Gullace, F. (2011). Reproducción en Animales de Laboratorio. In *Técnicas para Bioterio IV* (pp. 1–22). Universidad de Buenos Aires.
- Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino,

bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1), 183–204.

Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (2nd ed.). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851996660.0000>

Gregoire, A. (2012). Cryoconservation des ressources génétiques etiques chez le cochon d ' Inde (*Cavia porcellus*) : production et congélation des embryons. In *Sciences agricoles* (Vol. 168). Université de Lyon.

Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R., Buff, S., Berard, M., & Joly, T. (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>

Grégoire, Anne, Joly, T., Huamán, E., Silva, R. M., & León, S. (2010). Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones. *Bulletin de l'Institut Français d'études Andines*, 39(39 (1)), 185–188. <https://doi.org/10.4000/bifea.2164>

Gullace, F. (1996). Reproducción de los animales de laboratorio. *Fisiología Veterinaria*, 997.

Hafez, E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-Hill.

Hargaden, M., & Singer, L. (2012). Anatomy, Physiology, and Behavior. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 575–602. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1>

Hawk, H. W., & Wall, R. J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41(8), 1571–1583. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90822-Z](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90822-Z)

Henry, P., & Box, P. O. (1996). *health and disease*. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0247>

Hurtado de Mendoza, M. V., & Fernández, J. (2015). *Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*. (3rd ed.). ASEBIR.

Ioannou, J. (1964). *oogenesis in the chifon.pdf*. 12(December), 673–691.

King, J., Tai, D. W., Hannaa, I. K., Pfeiffer, A., Haas, P., Ronsheim, P. M., Mitchell, S. C., Turcotte, J. C., & Blausteitt, J. D. (1995). A subgroup of LHRH neurons in guinea pigs with progesterin receptors is centrally positioned within the total population of LHRH neurons. *Neuroendocrinology*, 61(3), 265–275. <https://doi.org/10.1159/000126848>

- Krisher, R. L., Brad, A. M., Herrick, J. R., Sparman, M. L., & Swain, J. E. (2007). A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 98(1–2), 72–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.006>
- Kuhnel, W., & Mendoza, A. (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
- Leoni, G. G., Palmerini, M. G., Satta, V., Succu, S., Pasciu, V., Zinellu, A., Carru, C., Macchiarelli, G., Nottola, S. A., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2015). Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. *PLoS ONE*, 10(4), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124911>
- Liu, S., Li, Y., Gao, X., Yan, J. H., & Chen, Z. J. (2010). Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1550–1555. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.050>
- Long, C., Damiani, P., Pinto, C., MacLean, R. A., Duby, R. T., & Robl, J. M. (1994). Matured in vitro under various conditions of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 169, 361–369.
- López, C. (2010). Aparato reproductor de la hembra. In *Aparato reproductor de la hembra*.
- López, O. (2013). *Sincronización de celo en vacas* (p. 21).
- Lorenzo, M. S., Tello, M., Fischman, M., Claver, J., & Lombardo, D. M. (2015). Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. *InVet*, 17(1), 25–34.
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinou, S., & Michalakis, S. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 72(2), 240–244. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00233-2)
- Madison, V., Avery, B., & Greve, T. (1992). Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Animal Reproduction Science*, 27(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90065-L](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90065-L)

- McGee, E., & Hsueh, A. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/er.21.2.200>
- Moore, S., & Tozer, F. (1908). On the maturation of the ovum in the guinea-pig. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 80(540), 285–287. <https://doi.org/10.1098/rspb.1908.0027>
- Moussa, M., Shu, J., Zhang, X., & Zeng, F. (2014). Maternal control of oocyte quality in cattle “a review.” *Animal Reproduction Science*, 155, 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.011>
- Nagai, S., Mabuchi, T., Hirata, S., Shoda, T., Kasai, T., Yokota, S., Shitara, H., Yonekawa, H., & Hoshi, K. (2006). Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 210(2), 137–144. <https://doi.org/10.1620/tjem.210.137>
- Nilsson, E., & Skinner, M. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8, 17–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177%2F1071557601008001S06>
- Nishi, Y., Takeshita, T., Sato, K., & Araki, T. (2003). Change of the Mitochondrial Distribution in Mouse Ooplasm During In Vitro Maturation. *Journal of Nippon Medical School*, 70(5), 408–415. <https://doi.org/10.1272/jnms.70.408>
- OIE. (2022). *Utilización de animales en la investigación y educación*. OIE. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/es_chapitre_aw_research_education.htm
- Oñate, C. (2008). Evaluación de Dos Métodos de Sincronización del Estro en Cuyes. <Http://Dspace.Espoch.Edu.Ec/Handle/123456789/1612>.
- Quenta, E. (2020). *Evaluación de los parámetros productivos bajo cinco protocolos de sincronización de celo en cuyes (cavia aparea Porcellus) en la estación experimental de Patacamaya*. Universidad Mayor de San Andres.
- Quijano Saavedra, P. (2019). *Descripción De La Distribución Y Actividad Mitocondrialen Ovocitos Inmaduros De Alpaca*.
- Ramos, C. A., Venezia, T. A., Camargo, F. A., & Goodell, M. A. (2003). Techniques for the study of adult stem cells: Be fruitful and multiply. *BioTechniques*, 34(3), 572–591. <https://doi.org/10.2144/03343rv01>

- Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Velilla, E., & Paramio, M. T. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, *57*(5), 1397–1409. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00645-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00645-3)
- Roy, M., Goldstein, K., & Williams, C. (1993). Estrus termination following copulation in female guinea pigs. *Hormones and Behavior*, *27*, 397–402. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1993.1029>
- Saavedra, M. (2009). *Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados in vitro*. Universidad de Murcia.
- 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>
- Saffie, C. (2009). *Evaluación de la distribución mitocondrial en ovocitos de perra: inmaduros, madurados in vitro y madurados in vivo*.
- Santos, T. A., El Shourbagy, S., & St. John, J. C. (2006). Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and Sterility*, *85*(3), 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.017>
- Sen, O., Saurin, A. T., & Higgins, J. M. G. (2018). The live cell DNA stain SiR-Hoechst induces DNA damage responses and impairs cell cycle progression. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26307-6>
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., & Hosseini, S. M. (2005). A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Ruminant Research*, *58*(3), 283–286. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.11.002>
- Shomer, N. H., Holcombe, H., & Harkness, J. E. (2015). *Biology and Diseases of Guinea Pigs. In Laboratory Animal Medicine: Third Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00006-7>
- Sigma Aldrich. (2023). *BioTracker 488 Green Mitochondria Dye*. https://www.merckmillipore.com/INTL/es/product/BioTracker-488-Green-Mitochondria-Dye,MM_NF-SCT136
- Soares, M., Sousa, A. P., Fernandes, R., Ferreira, A. F., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2020). Aging-related mitochondrial alterations in bovine oocytes. *Theriogenology*, *157*, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.07.036>

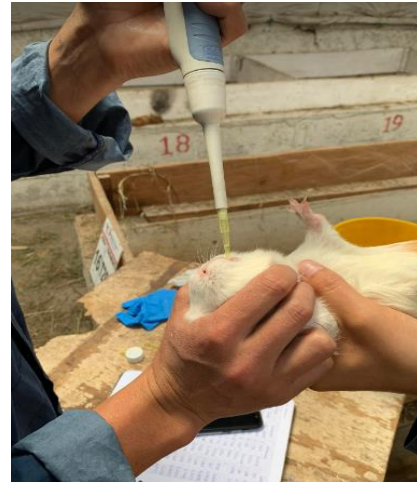
- Spikings, E. C., Alderson, J., & St. John, J. C. (2007). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction*, *76*(2), 327–335. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054536>
- Stockard, C., & Papanicolaou, G. (1917). The existence of a typical oestrous cycle in the guinea-pig with a study of its histological and physiological changes 1. *Biology of Reproduction*, *22*(2), 225–283. <https://doi.org/10.1002/aja.1000220204>
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P. B., & Wolf, E. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, *64*(3), 904–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>
- Tapia, C. (2014). *Aparato reproductor femenino*. Biología.
- Tello, M. F., Lorenzo, M. S., Luchetti, C. G., Maruri, A., Cruzans, P. R., Alvarez, G. M., Gambarotta, M. C., Salamone, D. F., Cetica, P. D., & Lombardo, D. M. (2020). Apoptosis in porcine cumulus-oocyte complexes: Relationship with their morphology and the developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, *87*(2), 274–283. <https://doi.org/10.1002/mrd.23319>
- Tian, W. N., Braunstein, L. D., Pang, J., Stuhlmeier, K. M., Xi, Q. C., Tian, X., & Stanton, R. C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(17), 10609–10617. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10609>
- Torner, H., Brüssow, K. P., Alm, H., Ratky, J., Pöhland, R., Tuchscherer, A., & Kanitz, W. (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*, *61*(9), 1675–1689. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.013>
- Ueda, H., Kosaka, T., & Takahashi, K. (1998). Intra-peritoneal insemination of the guinea pig with synchronized estrus induced by progesterone implant. *Experimental Animals*, *47*(4), 271–275. <https://doi.org/10.1538/expanim.47.271>
- Ueno, S., & Niimura, S. (2008). Size of Perivitelline Space and Incidence of Polyspermy in Mouse Oocytes Matured In Vivo and In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research*, *25*(1), 44–49. <https://doi.org/10.1274/jmor.25.44>

- Vargas, D. (2021). *Determinación de la competencia de desarrollo de ovocitos de alpaca luego de una premaduración por el colorante azul de cresilo brillante*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Villamarín, K. (2016). Evaluación de dos crioprotectores (Etilenglicol y Propilenglicol) en la conservación lenta de ovocitos en cobayos (*cavia porcellus*) en el Laboratorio de la Carrera de Medicina Veterinaria". In *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad* (Vol. 1).
- Vivas, J., & Carballo, D. (2013). Especies alternativas manual de crianza de cobayos. In *Repositorio UNA* (Vol. 1, Issue 1).
- 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.
- Wang, Q., & Sun, Q. Y. (2007). Evaluation of oocyte quality: Morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1071/RD06103>
- Wilding, M., Dale, B., Marino, M., Di Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M. L., Lombardi, L., & De Placido, G. (2001). Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 16(5), 909–917. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.909>
- Wu, J., Yuan, M., Song, Y., Sun, F., & Han, X. (2015). MC-LR exposure leads to subfertility of female mice and induces oxidative stress in granulosa cells. *Toxins*, 7(12), 5212–5223. <https://doi.org/10.3390/toxins7124872>
- Zerón, C. (2020). *Efecto de la administración de Capsaicina 1nM sobre el útero de cobayas Hartley en un modelo de síndrome de ovario poliquístico inducido con Letrozole*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Zhinin, A., & Buñay, P. (2022). *Implementación de un protocolo de maduración in vitro de ovocitos de cobaya (Cavia porcellus) Trabajo*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/39214/1/Trabajo de Titulacion.pdf>

Anexos



Anexo A. Pesaje de las cobayas



Anexo B. Dosificación de la hormona



Anexo C. Extracción de ovarios



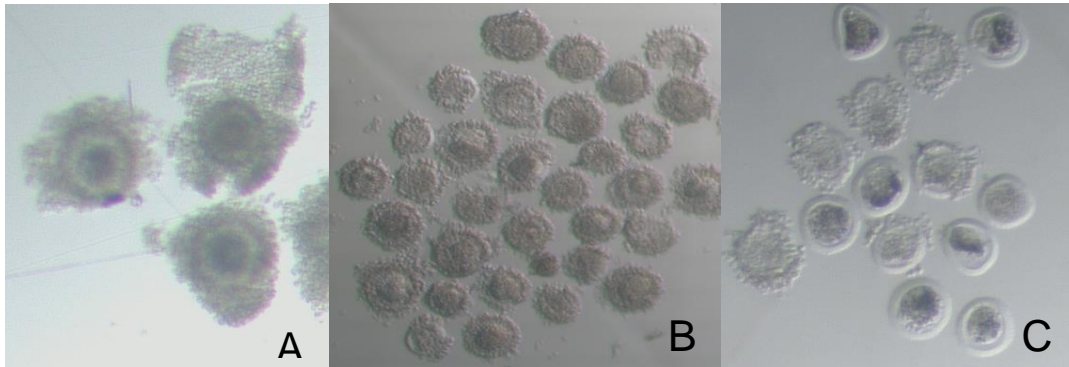
Anexo D. Pesaje de ovarios



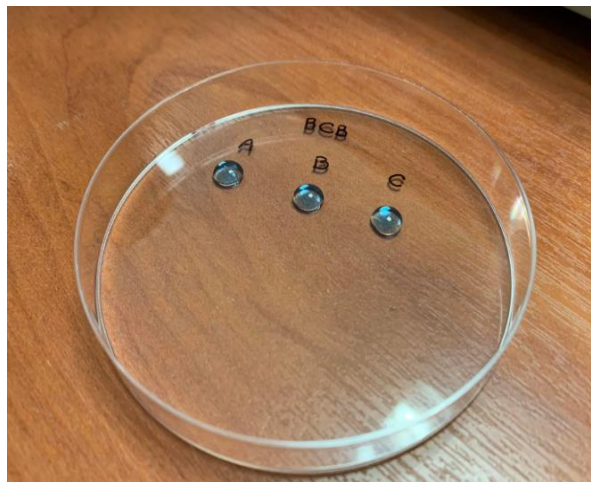
Anexo E. Ovarios de cobaya visto bajo estereomicroscopio



Anexo F. Técnica de slicing



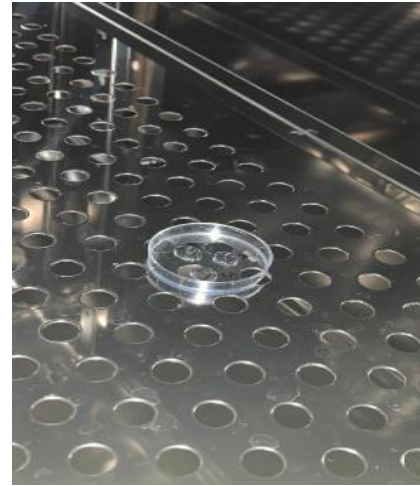
Anexo G. Tipos de COCs



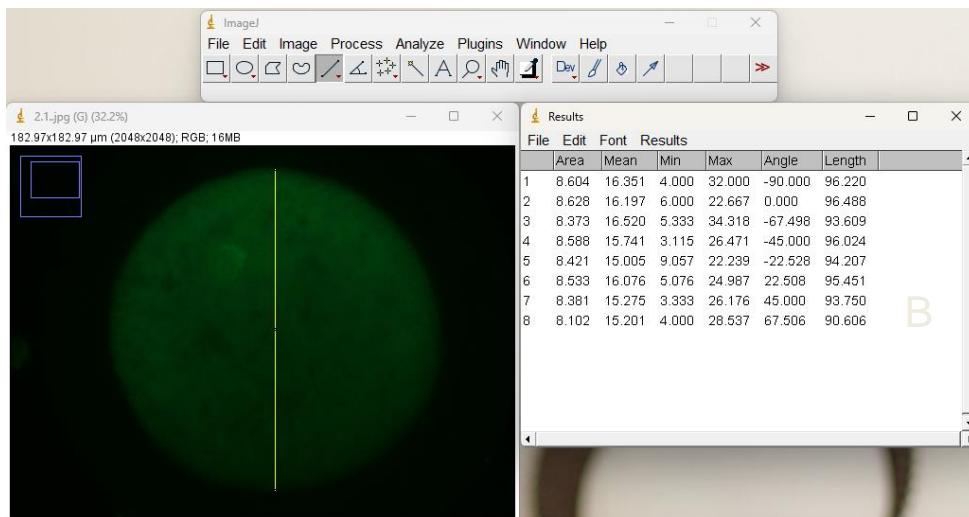
Anexo H. COCs en tinción BCB



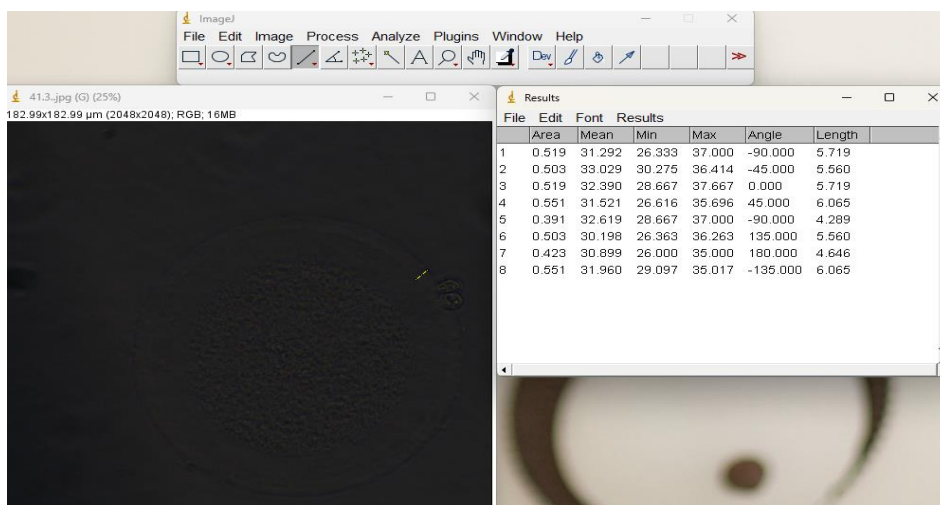
Anexo I. Denudación de ovocitos por Vórtex



Anexo J. Ovocitos en tinción BioTracker



Anexo K. Medición del diámetro ovocitario en el programa Image J.



Anexo L. Medición del grosor de la zona pelúcida en el programa ImageJ.