

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto del estadio del ciclo estral y de la categoría de los complejos cúmulo-ovocito (COC's) sobre las características morfológicas y funcionales de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*)

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

Autoras:

Andrea Priscila Pazmiño Rodríguez

Erika Fernanda Pangol Araujo

Director:

Fernando Pedro Perea Ganchou

ORCID:  0000-0001-8301-6339

Cuenca, Ecuador

2023-07-17

Resumen

El objetivo fue evaluar las características de los complejos cúmulo-ovocito obtenidos en diferentes etapas del ciclo estral y su relación con las características morfológicas y funcionales de ovocitos de cobaya. Se utilizaron 40 cobayas de entre 3 a 9 meses, las cuales fueron sincronizadas con REGUMATE® (0,22 mg/kg) durante 15 días. Después de transcurridos 2 y 10 días del retiro del progestágeno, se recolectaron los ovarios y se obtuvieron los COC's mediante cortes seriados, y fueron clasificados en tipo A, B y C. El 40 % de los COC's se destinaron para determinar la actividad de la enzima G6PDH y medir la distribución de gotas lipídicas citoplasmáticas; mientras que, el 60 % restante se utilizó para medir el diámetro y volumen citoplasmático, estudiar la progresión nuclear y la tasa de apoptosis. La prueba BCB evidenció una mayor proporción de ovocitos BCB+ en el periovulatorio que en el diestro. La distribución de gotas de lípidos en el citoplasma fue significativa en el diestro, observando que los ovocitos tipo A y C fueron similares en cuanto a la distribución uniforme de lípidos; mientras que, los ovocitos tipo B, tuvieron un porcentaje ligeramente mayor con distribución central de lípidos. En la tasa de apoptosis, existió un menor porcentaje en la fase periovulatoria que en el diestro. El estatus nuclear evidenció un porcentaje mayor de ovocitos maduros en el periovulatorio que en el diestro. El diámetro y volumen ovocitario demostraron que, los ovocitos fueron significativamente más grandes en el diestro que en el periovulatorio.

Palabras clave: cobayas, ovocitos, lípidos, apoptosis

Abstract

The objective was to evaluate the characteristics of cumulus-oocyte complexes obtained at different stages of the estrous cycle and their relationship with the morphological and functional characteristics of guinea pig oocytes. Forty guinea pigs aged 3 to 9 months were synchronized with REGUMATE® (0.22 mg/kg) for 15 days. After 2 and 10 days after progestogen withdrawal, the ovaries were collected and COC's were obtained by serial sections and classified into type A, B and C. Forty percent of the COCs were used to determine G6PDH enzyme activity and to measure the distribution of cytoplasmic lipid droplets, while the remaining 60% were used to measure cytoplasmic diameter and volume, to study nuclear progression and the rate of apoptosis. The BCB test evidenced a higher proportion of BCB+ oocytes in the periovulatory than in the diestrous. The distribution of lipid droplets in the cytoplasm was significant in the diestrous, observing that type A and C oocytes were similar in terms of uniform lipid distribution; whereas, type B oocytes, had a slightly higher percentage with central lipid distribution. In the apoptosis rate, there was a lower percentage in the periovulatory phase than in the diestrous phase. Nuclear status showed a higher percentage of mature oocytes in the periovulatory than in the diestrous. Oocyte diameter and volume showed that oocytes were significantly larger in the diestrous than in the periovulatory.

Keywords: guinea pigs, oocytes, lipids, apoptosis

Índice de contenido

Introducción.....	13
1. Objetivos	15
2. Revisión de literatura	16
2.1. Fisiología reproductiva de la cobaya	16
2.1.1. Fases del ciclo estral	16
2.2. Mecanismos neuroendócrinos que regulan el ciclo estral.....	16
2.3. Folículo y ondas de crecimiento folicular	17
2.4. Ovocito.....	18
2.5. Métodos para la obtención de ovocitos.....	18
2.6. Clasificación de los ovocitos.....	18
2.7. Marcadores celulares no invasivos.....	19
2.8. Prueba de Azul Brillante de Cresilo (BCB).....	20
2.9. Gotas de lípidos	20
2.10. Progresión nuclear.....	20
2.11. Apoptosis	21
2.12. Características morfométricas del ovocito.....	22
3. Materiales y métodos.....	23
3.1. Materiales.....	23
3.1.1. Materiales físicos.....	23
3.1.2. Materiales biológicos	23
3.1.3. Reactivos	23
3.1.4. Materiales de laboratorio	24
3.2. Metodología.....	24
3.2.1. Descripción del área de estudio	24
3.2.2. Diseño y unidad experimental	25
3.2.3. Protocolo de sincronización del celo.....	26
3.2.4. Obtención de COC's.....	26
3.2.5. Clasificación de COC's.....	26

3.2.6.	Prueba de Azul Brillante de Cresilo (BCB).....	27
3.2.7.	Distribución de gotas de lípidos.....	27
3.2.8.	Tasa de apoptosis y progresión nuclear.....	27
3.2.9.	Determinación del diámetro y volumen del ovocito.....	29
3.3.	Análisis estadístico.....	29
4.	Resultados.....	30
4.1.	Colección de COC's.....	30
4.2.	Prueba Azul Brillante de Cresilo (BCB).....	30
4.3.	Distribución de gotas de lípidos citoplasmáticos.....	32
4.4.	Tasa de apoptosis.....	34
4.5.	Progresión nuclear.....	35
4.6.	Diámetro y volumen del ovocito.....	37
5.	Discusión.....	39
	Conclusiones.....	43
	Referencias.....	44
	Anexos.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Referencia de la ubicación geográfica del área de estudio. Tomado de Google Earth (2022).....	25
Figura 2. Protocolo de sincronización del celo.....	26
Figura 3. Ovocitos de cobaya previamente seleccionados y clasificados de acuerdo a su calidad por tipo A, B y C.	30
Figura 4. Acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante el test azul brillante de cresilo (BCB) en cobayas de acuerdo al tipo de COC.....	31
Figura 5. Ovocitos de cobaya sometidos al test azul brillante de cresilo (BCB) clasificados según su calidad en tipo A, B y C. Se pueden observar ovocitos teñidos (BCB +) y sin teñir (BCB -)	31
Figura 6. Acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante el test azul brillante de cresilo (BCB) en cobayas de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral.	32
Figura 7. Distribución de gotas de lípidos citoplasmáticos mediante la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium) de acuerdo al tipo de COC en cobayas.	32
Figura 8. Ovocitos de cobaya sometidos a la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium). Se pueden observar las gotas de lípidos distribuidos de manera tanto central como uniforme en el citoplasma.....	33
Figura 9. Distribución de gotas de lípidos citoplasmáticos mediante la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium) de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral. En el diestro, las diferencias de las proporciones fueron significativas ($P < 0,05$)	33
Figura 10. Tasa de apoptosis mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC en cobayas.....	34
Figura 11. Ovocitos de cobaya sometidos a la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium). Se puede observar un marcaje positivo en el ovocito apoptótico y un marcaje negativo en el ovocito no apoptótico.	34
Figura 12. Tasa de apoptosis mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral en cobayas.....	35
Figura 13. Estatus nuclear en ovocitos evaluados mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC en cobayas.	35
Figura 14. Ovocitos de cobaya sometidos a la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium). Se pueden observar núcleos tanto en un estado inmaduro, maduro (en diferentes etapas) y degenerado.....	36

Figura 15. Estatus nuclear en ovocitos evaluados mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral en cobayas..... 36

Figura 16. Diámetro y volumen ovocitario evaluado mediante el empleo del programa ImageJ (Java V 1.8.0) en ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC. El diámetro del citoplasma (columnas verdes) fue medido a través de una línea recta en dos puntos de la circunferencia del citoplasma y expresada en micras (μm), mientras que el volumen del ovocito (columnas azules) se determinó mediante la fórmula $\frac{4}{3}(\pi)$ (radio del ovocito) ³ expresado en micras cubicas (μm^3), indistintamente del período del ciclo estral. 37

Figura 17. Medición del diámetro ovocitario mediante el empleo del programa ImageJ..... 37

Figura 18. Diámetro ovocitario en micras (μm) evaluado mediante el empleo del programa ImageJ (Java V 1.8.0) en ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral. En los ovocitos tipo A y C se mostró una diferencia significativa ($P < 0,05$) en relación a su tamaño y período del ciclo, a diferencia de los ovocitos tipo B que no mostraron diferencia significativa ($P > 0,05$). 38

Figura 19. Volumen ovocitario en micras cubicas (μm^3) evaluado mediante el empleo de la fórmula $\frac{4}{3}(\pi)$ (radio del ovocito) ³ en ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral. En los ovocitos tipo A y C se mostró una diferencia significativa ($P < 0,05$) en relación a su volumen y período del ciclo, a diferencia de los ovocitos tipo B que no mostraron diferencia significativa ($P > 0,05$). 38

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de clasificación de los COC's.....	26
Tabla 2. Criterios propuestos para la evaluación nuclear de los ovocitos.	28
Tabla 3. Número de ovocitos recolectados para análisis de apoptosis y lípidos de acuerdo con el tipo de COC y período del ciclo estral.	30

Dedicatorias

A mis padres, Fabián y María, los que han impulsado en mí las ganas de superarme cada día, por su apoyo incondicional y por sus palabras de aliento, este título va dedicado a ustedes, por enseñarme a no rendirme en el camino y que todo esfuerzo tiene su recompensa, Dios me los bendiga siempre, gracias por ser mi ejemplo a seguir.

A Jonnathan, esposo, compañero de vida y mi mejor amigo, quién me ayudó a culminar mis estudios, quién supo alentarme cuando quise desistir, gracias amor mío por todo tu esfuerzo, te admiro mucho y eres mi inspiración para cumplir con todas mis metas.

Danna, hija mía quién llegó a mi vida para darme cuenta que soy capaz de todo, este esfuerzo es por y para ti, gracias por llenarme de vida, alegría y paz. Te amo mucho cada día me haces ser mejor persona.

Edwin y Shirley, mis hermanos, gracias por siempre creer en mí, por sus palabras de apoyo que sin duda alguna las tendré siempre. A mi abuelita Rosario que desde el cielo debe estar orgullosa, ya que al fin cumpliré el sueño que desde niña tenía.

A mis amigas que siempre estuvieron en mis momentos más felices, pero también en los más duros, gracias por enseñarme que la vida es más bonita con amigos, Andrea, Kathy, Liss, las quiero mucho, espero contar con su amistad muchos años más.

Al Doctor Fernando Perea, muchas gracias por su paciencia y por creer en nosotras durante este trabajo, Dios lo bendiga siempre.

Con mucho amor para ustedes.

Erika Fernanda Pangol Araujo.

Dedico este trabajo con todo mi corazón a mis padres, Hugo y Flora, quienes me han impulsado a no rendirme en mi carrera y en la vida, enseñarme a ser una mejor persona cada día con valores y consejos, siendo el pilar fundamental para poder seguir adelante en este camino, que si bien fue largo y difícil, ha sido muy interesante y me ha enseñado muchas cosas de la vida que me han permitido realizarme como persona y sentirme satisfecha. Les deseo lo mejor, los quiero mucho.

A mis hermanos, que han creído en mí a lo largo de toda mi carrera y me han ayudado en lo que he necesitado. A mi sobrina Rafaela, que con su ternura me ha ayudado desde el inicio a no rendirme y seguir adelante por ella y por mí, los adoro y espero me sigan apoyando en mi camino profesional.

Al Dr. Xavier Samaniego, quien desde un inicio me apoyó y me ha ayudado a concluir este proyecto con sus conocimientos y sabiduría que siempre he admirado, además de que ha sido mi soporte para no rendirme y ha estado en los momentos que más he necesitado.

A nuestro tutor de tesis, el Dr. Fernando Perea, por ser un gran guía y una excelente persona, quien con sus conocimientos, experiencia y paciencia nos ha ayudado a concluir con éxito este este trabajo de titulación.

A mis amigas, Erika y Lisseth, quienes me han acompañado desde el inicio en el colegio y me han visto crecer a lo largo de mi carrera profesional y han sido un apoyo en mi vida, las quiero mucho.

Con todo el cariño para ustedes.

Andrea Priscila Pazmiño Rodríguez.

Agradecimientos

En primer lugar, a Dios, por llenarme de sabiduría y paciencia durante este largo camino, a mi compañera Andrea Pazmiño, quien me ha brindado seguridad y gracias a ello pudimos lograr este trabajo, somos un gran equipo.

A nuestro tutor Fernando Perea quien a más de ser nuestro guía se ha convertido en un gran amigo, muchas gracias por compartir sus conocimientos durante la elaboración de este proyecto, de igual manera al Dr. Xavier Samaniego y técnicos de laboratorio de Biotecnología, quienes nos brindaron todo su apoyo y gracias a ello pudimos lograr nuestros objetivos.

Erika Fernanda Pangol Araujo.

Agradezco a las personas que me han ayudado y me han contribuido ampliamente a la realización de este presente trabajo de titulación. En primer lugar, a mi compañera y amiga Erika Pangol, quien me ha ayudado a no rendirme y así poder concluir con éxito este proyecto, estoy segura que vamos a compartir muchos proyectos más juntas.

Al Dr. Fernando Perea, nuestro tutor, que no nos ha dejado atrás en este camino y siempre ha estado al pendiente para poder obtener un buen trabajo y sobretodo poder concluirlo con éxito. Al Dr. Xavier Samaniego que indudablemente sin su ayuda, no hubiese sido posible concluir este proyecto, gracias por estar siempre. Estoy totalmente agradecida.

Andrea Priscila Pazmiño Rodríguez.

Abreviaturas utilizadas

TRA= Técnicas de reproducción asistida

PIV= Producción de embriones *in vitro*

COC´S= Complejos cumulus ovocitos

BCB= Azul Brillante de Cresilo

ATP= Adenosin Trifosfato

Mm= milímetro

g= gramo

µm= micrómetro

µm³= micra cubica

px= pixel

ml= mililitro

CL= Cuerpo Lúteo

PGF2α= Prostaglandina F2α

E₂= Estrógeno

P4= Progesterona

FSH= Hormona Folículo Estimulante

LH= Hormona Luteinizante

ZP= Zona Pelúcida

EPV= Espacio Perivitelino

CP= Corpúsculo Polar

G6PDH= Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GV= Vesícula Germinal

M-II= Metafase II

MIV= Maduración *in vitro*

FIV= Fertilización *in vitro*

Introducción

Los cobayos son mamíferos domésticos, roedores histricomorfos pertenecientes a la familia Caviidae, originarios de la Cordillera de los Andes (Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia) (Lord et al., 2020). Esta especie roedora ha sido considerada emblemática debido a sus diversas utilidades, incluida las investigaciones biomédicas (Dyson et al., 2012; Matsuzawa et al., 2018; Sterusky et al., 2020). Además, la actividad cuyícola en la zona andina se enfoca principalmente en la crianza, reproducción y comercialización de esta especie con fines productivos y económicos (Chauca, 1994).

Esta especie mamífera juega un papel esencial como fuente de alimento de excelente calidad (Sánchez-Macías et al., 2018), y contribuye a mejorar los ingresos familiares en varios países de América Latina (Avilés et al., 2014). Por esta razón, es importante aumentar la población y calidad genética de esta especie mediante técnicas de reproducción asistida (TRA), las cuales han sido utilizadas exhaustiva y exitosamente en otras especies de mamíferos domésticos (Córdova et al., 2011). El mejoramiento genético en especies de interés zootécnico, ha logrado aumentar la eficiencia productiva y reproductiva, así como también la criopreservación de recursos genéticos únicos que puedan disponerse con relativa facilidad para su utilización futura (González & González, 2005).

Una de las principales biotécnicas reproductivas es la producción *in vitro* de embriones (PIV); esta técnica de reproducción asistida consiste en imitar las condiciones ambientales, nutricionales y atmosféricas mediante equipos y medios especializados que soporten y promuevan el desarrollo embrionario (Gordon, 2003). Para el éxito de esta técnica, es importante disponer de una gran cantidad de complejos cúmulos ovocitos (COC's) de óptima calidad (Wani, 2021). Razón por la que, la morfometría y la funcionalidad de los COC's son de vital importancia dentro de un programa de PIV (Hurtado de Mendoza & Fernández, 2015).

En cobayas, para la obtención de COC's se ha utilizado la punción folicular en fase estrogénica (estro), con la ayuda de una aguja se han puncionado folículos mayores a 1 mm (Yanagimachi, 1974; Wang et al., 2019). Otro método reportado en cobayas es el rebanado (Slicing), Beltrán et al. (2012), compararon las dos técnicas: punción y cortes, observando que no existía diferencia estadística en cuanto al número de ovocitos viables obtenidos, así como en el tiempo empleado en la recuperación de los complejos cúmulo ovocitos (COC's).

Sin embargo, hasta la fecha, en el caso de las cobayas existe escasa información publicada sobre la producción de embriones *in vitro*. En años recientes se han realizado varios esfuerzos en la maduración *in vitro* de COC's en esta especie (Beltrán et al., 2015; Wang et

al., 2019; Yao et al., 2021), sin que haya reportes alentadores sobre las subsiguientes fases de la PIV. Un importante cúmulo de evidencias han dejado claro que existe una fuerte relación entre la morfología y apariencias de los COC's al momento de la colecta y el posterior potencial de desarrollo ovocitario (Boni, 2012). Lo que se conoce en otras especies es que los ovocitos de mejor calidad derivan en blastocistos que logran desarrollarse a término (De Loos et al., 1989; Hawk y Wall, 1994).

Un primer paso para emprender con éxito ciclos de maduración, fecundación y posterior producción de embriones *in vitro* en cobayas, consiste en disponer de una clasificación de COC's que permita la selección de aquellos más competentes (Aguila et al., 2020). Referido esta última, como la capacidad que tiene un COC's de alcanzar la metafase II, ser fecundado y de mantener un desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto (Sirait et al., 2021). Sin embargo, hasta la fecha no existe información que relacione la calidad de los COC's con la funcionalidad de las organelas relacionadas con la competencia ovocitaria en esta especie de roedores.

Por lo cual, este trabajo de titulación propuso los siguientes objetivos.

1. Objetivos

Objetivo general

Evaluar las características de los complejos cúmulo-ovocito obtenidos en diferentes etapas del ciclo estral y su relación con las características morfológicas y funcionales de ovocitos de cobaya.

Objetivos específicos

De acuerdo con las categorías de los COC's y estadio del ciclo estral de las cobayas determinar:

- La morfometría del ovocito y la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.
- La distribución de las gotas de lípidos citoplasmáticos y la progresión nuclear.
- El grado de apoptosis de los ovocitos.

2. Revisión de literatura

2.1. Fisiología reproductiva de la cobaya

La pubertad en la cobaya es la etapa en donde se desarrollan los caracteres sexuales y producción o maduración de gametos y desarrollo de los órganos reproductivos. La edad adecuada para iniciar la vida sexual y apareamiento es entre los 3 a 4 meses, edad en la que han madurado sexualmente y han alcanzado un peso mínimo de 600 g (Cadena, 2000). Los cobayos son una especie poliéstrica no estacional con pequeñas variaciones en la fecundidad (Roy et al., 1993).

En esta especie, existe la peculiaridad de que ocurre un celo posparto, que se produce en un rango de 30 minutos a 2 horas después del parto, dura un promedio de 3,5 horas y da como consecuencia madres lactantes y gestantes a la vez, lo cual tiene como beneficio un mayor número de partos al año (Barahona & Quishpe, 2012).

La ovulación en esta especie de mamífero es espontánea y ocurre 10 horas después de haberse iniciado el celo. La cobaya tiene en promedio 3,14 ovulaciones por ciclo estral, pudiendo llegar hasta 8 ovulaciones (Aranibar & Echevarría, 2014). Los óvulos perduran aproximadamente 15 horas luego de la ovulación, mientras que los espermatozoides sobreviven hasta 30 horas después de eyaculados (Quenta, 2020).

2.1.1. Fases del ciclo estral

El ciclo estral del cuy tiene una duración promedio de 16 días con un rango de 13 a 22 días, y se presentan cuatro fases: proestro, estro o celo, metaestro y diestro (Roy et al., 1993). Estas fases se describen a continuación:

- **Proestro:** Dura alrededor de 14 horas, se presentan cambios como aumento del tamaño de los genitales externos y flujo sanguíneo acompañado de secreciones serosas (Aranibar & Echevarría, 2014).
- **Estro:** Dura alrededor de 8 a 11 horas, el animal se presenta inquieto, estira la espalda y eleva la pelvis, existe mucosidad en la vagina, se da la apertura de la membrana vaginal y acepta la monta. Se puede observar celo también de 2 a 3 horas después del parto (Aranibar & Echevarría, 2014).
- **Metaestro:** Dura de 18 a 24 horas, la hembra rechaza completamente al macho.
- **Diestro:** Dura aproximadamente de 13 a 16 días, en esta fase el cuerpo lúteo (CL) aumenta su tamaño y el útero está preparado para una posterior gestación (Ruiz et al., 1998).

2.2. Mecanismos neuroendócrinos que regulan el ciclo estral

El ovario además de secretar ovocitos, también posee mecanismos que le permiten secretar hormonas sexuales femeninas de manera endócrina, estas hormonas son en su mayoría estrógenos (E_2) y progesterona (P_4) (Pino, 2015). Las células de la granulosa son las encargadas de producir estrógenos, los cuales se producen principalmente en el celo, esta hormona es la encargada de inducir el crecimiento y desarrollo de los órganos sexuales femeninos, presentando así el comportamiento propio del celo (Grégoire et al., 2012).

Las células lúteas y de la placenta son las encargadas de producir P_4 (Balgobin et al., 2013). La P_4 estimula el desarrollo de las glándulas uterinas, ocasionando un acondicionamiento del endometrio para la posterior implantación del embrión (Grégoire et al., 2012).

Las hormonas gonadotrópicas pituitarias tales como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son las responsables de regular el crecimiento y maduración de los folículos. Un día antes de presentar el celo existe un nivel máximo de FSH. Para inducir la ovulación, debe existir liberación máxima de LH, la cual ocurre gracias a la secreción ovárica de estrógenos (Grégoire et al., 2012). Posteriormente, la LH interactúa con receptores de la pared folicular rota e inicia la formación del CL y comienza con la liberación de P_4 . En el caso de que exista gestación, el CL persiste, pero en el caso de que no haya gestación, el CL regresa gracias al factor luteolítico que es la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Pino, 2015).

2.3. Folículo y ondas de crecimiento folicular

Los folículos son estructuras ováricas donde se encuentran los COC's. De acuerdo con el grado de desarrollo y de la complejidad de los componentes que los conforman, los folículos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios, antrales y ovulatorios (Gordon, 2003). Aunque todos los estadios son importantes, desde el punto de vista funcional los folículos antrales que han logrado cierto grado de desarrollo son capaces de proveer ovocitos (COC's) competentes (Gordon, 2003), que pueden ser usados en las TRA.

La cobaya posee dos ondas foliculares, la primera onda folicular inicia el día después de la ovulación cuando esta ha culminado (día 0), los folículos más grandes de esta ola alcanzan un diámetro de hasta 750 μm durante los días 10 a 11 del ciclo. Debido a la elevada P_4 y a la supresión de la LH provocada por la retroalimentación negativa, estos folículos de la primera onda se vuelven atrésicos. Posteriormente, se produce la segunda onda folicular ya que no existe presencia de CL, la cual dura entre 6 a 7 días, existiendo en este tiempo un reclutamiento de folículos y selección de los 3 a 5 folículos más grandes aproximadamente en el día 10 (Garris & Foreman, 1984). Después del día 12, las concentraciones de P_4 disminuyen y los niveles de LH aumentan entre los días 13 y 15, lo que va a dar lugar a la

ovulación. Finalmente, la ovulación ocurre al final de la segunda ola el día 17 del ciclo (Logothetopoulos et al., 1995).

2.4. Ovocito

El ovocito es la célula germinal femenina que se encuentra en proceso de convertirse en un gameto maduro. Para ello, es necesario que ocurra un complejo proceso de división celular llamado meiosis con la finalidad de reducir su dotación cromosómica a la mitad (Scott, 2005). Los ovocitos están totalmente envueltos por la zona pelúcida (ZP), que es una estructura constituida por matriz extracelular (formada por diferentes glicoproteínas) que rodean al ovocito y al embrión mamífero en estadios tempranos de desarrollo (Palma, 2001), la cual cumple diferentes funciones sobre las que destacan el bloqueo de la polispermia y el inicio de la reacción acrosomal. Además, el ovocito posee un espacio perivitelino (EPV), que es el área que queda entre la membrana plasmática del ovocito y la ZP que lo envuelve. En este espacio se localizarán el primer y el segundo corpúsculo polar (CP) una vez concluidas la meiosis I y II (Saavedra, 2010).

Estudios recientes en cobayas en los que se realizaron mediciones de cada parte del ovocito de acuerdo con la calidad, dieron como resultado diferentes mediciones tales como: el diámetro total del ovocito con valores que fueron desde 111 a 122 μm , el espesor de la ZP con un promedio de 13 μm , el diámetro del citoplasma que fue desde 95 a 106 μm y el EPV que tuvo un promedio de 2 μm . Además, también se hace referencia al volumen del ovocito, el cual varió según el tamaño del ovocito (Zhinin & Buñay, 2022).

2.5. Métodos para la obtención de ovocitos

Para la obtención de COC's de ovarios en distintos mamíferos postmortem, se describen métodos que son utilizados hasta la actualidad. El primer método se lo conoce como aspiración folicular, que consiste en succionar el contenido de folículos antrales localizados en la superficie ovárica con jeringas de 1-10 ml acopladas a agujas, usualmente, de calibre 18 a 30 G. El segundo método es el corte seriado o "*slicing*", el cual consiste en realizar cortes consecutivos en la corteza ovárica, separados por aproximadamente 2 mm y sobre una placa de Petri que contenga solución salina o un medio de mantenimiento, donde los ovocitos sean depositados (Velarde & Gandarillas, 2019). En cualquiera de los métodos, el procedimiento de colección es seguido por la búsqueda, selección y posterior clasificación de COC's.

2.6. Clasificación de los ovocitos

Las metodologías de selección pueden ser invasivas o no invasivas y se pueden aplicar en varias etapas de desarrollo, desde el ovocito hasta embriones divididos e incluso hasta en

blastocistos (Wrenzycki, 2021). La evaluación de la morfología sigue siendo el mejor método para seleccionar ovocitos viables para la PIV o de embriones antes de la transferencia. Aunque los enfoques no invasivos están mejorando, los invasivos han sido extremadamente útiles para encontrar genes candidatos para determinar la calidad del ovocito/embrión (Wrenzycki, 2021).

Según Martínez (2013), los ovocitos se pueden clasificar mediante criterios relacionados a las células del cúmulo y a la homogeneidad y apariencia del citoplasma, aunque las categorías de clasificación varían en número según los autores (De Loos et al., 1989; Hawk y Wall, 1994). Entre las categorías se encuentran: los ovocitos tipo A, que corresponde a un ovocito con células del cúmulo con número de capas múltiples (> 4) compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cúmulo (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por carecer de células del cúmulo y por tener un citoplasma menos homogéneo con zonas oscuras, por último el tipo D que tiene un cúmulo con células expandidas y un citoplasma irregularmente homogéneo y con zonas oscuras (De Loos et al., 1989; Hawk y Wall, 1994). Por otro lado, un citoplasma negro indica que el ovocito está envejecido, en proceso de degeneración y con bajo potencial para soportar el desarrollo (De Loos et al., 1989; Hawk y Wall, 1994).

2.7. Marcadores celulares no invasivos

Además de existir marcadores morfológicos y visuales para la selección de los mejores ovocitos, tales como la morfología ovárica, tamaño del folículo, morfología de los COC's, contenido de lípidos, tinción con Azul Brillante de Cresilo (BCB), entre otras; es de gran interés la identificación precisa de marcadores no invasivos que predigan la competencia ovocitaria (Aguila et al., 2020).

Actualmente, se realizan estudios en mamíferos para encontrar marcadores moleculares predictivos de la calidad de los ovocitos. Hasta el momento, la mayoría de los datos muestran variaciones considerables, quizás debido a las diferentes condiciones experimentales y/o al criterio de calidad/competencia, lo que da como resultado visiones científicas variadas. Una de las técnicas celulares no invasivas consiste en estudiar la muerte celular o apoptosis en las células del cúmulo, lo cual consiste en determinar la fragmentación del ADN, externalización de fosfatidilserina y/o la relación de expresión de genes antiapoptóticos (Bcl-2) y proapoptóticos (Bax) (BCL 2/BAX) (Ikeda et al., 2003). Otro método se basa en el análisis del líquido folicular, el mismo que contiene proteínas, citocinas, factores de crecimiento, esteroides, metabolitos y otros factores indeterminados que ayudan a determinar la capacidad de desarrollo del ovocito y, por lo tanto, del embrión

resultante (Sutton, 2003).

2.8. Prueba de Azul Brillante de Cresilo (BCB)

Esta prueba es de tipo no invasiva, es un método indirecto de evaluar la competencia ovocitaria y, consiste en la determinación de la actividad intracelular de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Mangia & Epstein, 1975). Esta enzima de la vía pentosa fosfato disminuye según el ovocito llega a la fase final de su crecimiento (Mangia & Epstein, 1975). De acuerdo con ello, un ovocito es BCB+ si el citoplasma presenta un color azulado, indicando una baja actividad de la G6PDH que no es capaz de degradar el BCB y, por lo tanto, es un indicativo de que ha finalizado su fase de crecimiento. En un ovocito BCB- el citoplasma se observa incoloro, lo que indica una alta actividad de la G6PDH que degrada el BCB y, por lo tanto, este es un ovocito en crecimiento (Cuadrado, 2014). Los ovocitos BCB+ son significativamente más grandes (Duma et al., 2019) y más competentes para alcanzar el estadio de blastocisto (Argudo et al., 2020) que los BCB-

2.9. Gotas de lípidos

Las gotas de lípidos intracelulares, son orgánulos citoplasmáticos involucrados en el almacenamiento y regulación de triglicéridos y ésteres de colesterol (Welte & Gould, 2017). Los lípidos en el ovocito se pueden utilizar para obtener una mejor comprensión de los patrones de lípidos mitocondriales durante la maduración del ovocito con el objetivo de mejorar la fertilización y el desarrollo del embrión. La actividad y organización de las mitocondrias y los lípidos son particularmente relevantes para la maduración citoplasmática porque la fosforilación oxidativa es la vía principal para suministrar Adenosin Trifosfato (ATP) para las actividades celulares (Prates et al., 2014).

El desarrollo adecuado de los ovocitos se logra cuando hay suficientes componentes energéticos disponibles dentro del citoplasma, que comprende lípidos, mitocondrias y transporte de ATP. El contenido de gotas de lípidos y la funcionalidad mitocondrial pueden contribuir a mejorar la capacidad de un ovocito para completar el proceso de maduración (Castaneda et al., 2013). Para observar gotas de lípidos en los ovocitos, existen estudios que tiñen los mismos con PBS suplementado con BSA al 0,4 % y colorante rojo Nilo 1 mM (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se proceden a lavarlos tres veces en PBS y a montarlos en un portaobjeto observando así al ovocito en un microscopio de epifluorescencia (Milakovic et al., 2015).

2.10. Progresión nuclear

Para determinar la progresión meiótica de los ovocitos es importante señalar el estado de la vesícula germinal (GV). Se considera inmaduro al ovocito con una GV intacta y maduro al

que tiene el núcleo en metafase II (M-II; placa metafásica más el primer corpúsculo polar). Uno de los métodos para determinar la progresión meiótica es denudar a los ovocitos y exponerlos al fluorocromo Hoechst (33342, Sigma), el cual es específico para teñir ácidos nucleicos (ADN, cromosomas y núcleos) (Ayala et al., 2019).

2.11. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es una respuesta genéticamente controlada para que las células desencadenen su autodestrucción. Los signos de la apoptosis son la pérdida de viabilidad acompañada de ebullición citoplasmática, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Wyllie, 1980). Durante décadas, los mecanismos responsables del agotamiento de las células germinales del ovario ya sea directamente durante el período perinatal o indirectamente durante la atresia folicular en la vida posnatal, han permanecido relativamente poco entendidos. La aplicación reciente de técnicas bioquímicas sensibles para el estudio de la muerte celular junto al análisis de la función ovárica, ha revelado que estos dos eventos, así como la degeneración de las células luteales, dependen de la activación de mecanismos fisiológicos de muerte celular (Tilly, 1996).

Una revisión de la literatura indica que la apoptosis juega un papel fundamental en tres procesos discretos relacionados con el desarrollo o ciclicidad ovárica: (1) oogonio perinatal y atrición de ovocitos, (2) atresia folicular y (3) luteólisis. Aunque la gran mayoría de la información disponible se refiere a la pérdida de células de la granulosa durante la muerte del folículo, un número creciente de estudios ha implicado a la apoptosis en la degeneración de las células germinales y de las células lúteas (Tilly, 1996).

En cuanto a la pérdida de células germinales durante la mitosis y la meiosis, grandes cantidades de estas células se eliminan, lo que da como resultado que menos de un tercio del número total de células germinales potenciales estén presentes en el ovario dentro de los folículos primordiales poco después del nacimiento (Tilly, 1996). El uso de la clasificación celular activada por fluorescencia como medida del contenido de ADN, combinado con evaluaciones posteriores de la morfología celular y nuclear por microscopía, demostraron que la degeneración de las ovogonias y ovocitos fetales en el ratón *in vivo* ocurre a través de la apoptosis (Coucovanis et al., 1993).

Experimentos adicionales usando microscopía de luz y electrónica, así como análisis bioquímicos de células germinales primordiales de ratón cultivadas *in vitro*, revelaron que las células germinales privadas del soporte del factor trófico degeneran con muchas de las características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular apoptótica (Pesce et al., 1993; Pesca & De Felici, 1994). Aunque se desconoce cuáles son los factores que determinan la supervivencia o muerte de las ovogonias, parece ser que el SCF (Stem cell

growth factor), el LIF (Leukaemia inhibitory factor) y la activación del receptor de ácido retinoico podrían jugar un papel importante (Tilly, 1996).

Estudios realizados en ratas en diferentes etapas foliculares, demostraron que las células de la granulosa expresan genes de apoptosis dependientes de mitocondrias (p53, Bax y Bcl-2). Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de las células de la granulosa en diferentes etapas de desarrollo a la apoptosis, en donde la regulación de la apoptosis en estas células se analizó mediante la clasificación de células activadas con fluoresceína, la reacción en cadena de la polimerasa competitiva cuantitativa y los métodos de transferencia Western (Choi, 2004).

La inhibición de la síntesis de esteroides y la degeneración de la integridad celular en el CL mediada por PGF_{2a} son eventos únicos que, cuando se combinan, conducen a la luteólisis (Nett et al., 1976). La apoptosis, una forma de muerte celular fisiológica, se produce durante la luteólisis natural e inducida en el ovario bovino (Juengal et al., 1993; Rueda et al., 1995a), de conejo (Dharmarajan et al., 1994), ovino (Rueda et al., 1995b) y humano (Shikone et al., 1996). En estudios realizados, se demostró que los genes Bax pueden estar relacionados en la inducción de la apoptosis durante la regresión lútea, además, el aumento de los niveles de ARNm de la enzima convertidora de interleucina-1 en el CL en regresión, proporciona la primera evidencia de que la familia ICE de proteasas de muerte puede estar involucrada en la luteólisis. Para ello, se aislaron los genes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa con ARN total preparado a partir del CL funcional o regresivo (Rueda et al., 1997).

2.12. Características morfométricas del ovocito

El ovocito es la célula más grande del cuerpo y es esencialmente esférico con una relación superficie-volumen de aproximadamente tres cuartos del radio, por lo tanto, cuanto mayor es el radio, menor es la relación entre la superficie de la membrana y su volumen (Calvo et al., 2015).

Según la metodología descrita por Ueno y Niimura (2008), se describe las siguientes medidas morfométricas: diámetro del citoplasma (medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del citoplasma y expresada en micras (μm) y volumen del ovocito (determinado mediante la fórmula $= 4/3(\pi)$ (radio del ovocito)³ expresado en micras cúbicas (μm^3).

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales físicos

- Guantes de examinación (látex)
- Equipo de disección básico
- Rotulador indeleble
- Fundas ziploc
- Envase para toma de muestras (termo)
- Balanza
- Jeringas de 1 ml
- Hojas de bisturí
- Papel aluminio
- Papel secante

3.1.2. Materiales biológicos

- Hembras cobayas
- Progestágeno sintético Altrenogest (REGUMATE®, MSD animal health, Igoville, Francia)
- Ovarios de cobaya
- Medio de maduración *in vitro*
- Medio de manipulación

3.1.3. Reactivos

- Lactato de Ringer
- Solución salina fisiológica
- PVA (Alcohol Polivinílico)
- Gentamicina
- Formaldehído al 4 % (Sigma B-5882)
- Hialuronidasa

- Glicerol (Sigma G-5150)
- Esmalte de uñas
- Tinción Azul Brillante de Cresilo (B5388)
- Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium, USA, #30018)
- LipidSpot™ 488 (Biotium, USA, #70065)

3.1.4. Materiales de laboratorio

- Baño María
- Tubos cónicos de 15 ml
- Placa de búsqueda 100 mm
- Placas Petri 90 mm
- Estereoscopio (SMZ745, Nikon, Japón)
- Pipetas de volumen variable (1 a 20 µl, 20 a 200 µl y 100 a 1000 µl)
- Puntas para pipeta
- Incubadora Memmert
- Microscopio de epifluorescencia (Eclipse Ci-E epi-fluorescence set, Nikon, Japón)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Nevera

3.2. Metodología

3.2.1. Descripción del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicado en la hacienda de Irquis, en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, provincia del Azuay en el kilómetro 23 vía Girón, a una altitud de 2663 m s. n. m., con las siguientes coordenadas sexagesimales: 3°04'48.33" S 79°04'30.99" O. En el área en cuestión predomina una temperatura promedio de 14° C, una humedad relativa de 90,3% y una precipitación media anual de 789 mm.



Figura 1. Referencia de la ubicación geográfica del área de estudio. Tomado de Google Earth (2022).

3.2.2. Diseño y unidad experimental

Se consideraron como unidades experimentales a 40 cobayas mestizas obtenidas de criaderos locales de la ciudad de Cuenca, con ciclos estrales regulares, una edad de entre 3 a 9 meses y criadas bajo un sistema de crianza semi-intensivo. Los animales fueron alimentados con una dieta homogénea formulada para cobayos en crecimiento, basada en pastos y alimento balanceado (Materia seca 88 %, Proteína Cruda 19,75 %, Vitaminas, Minerales; entre otros).

Las cobayas fueron divididas en dos grupos de 20 animales para cada estadio del ciclo, y para cada caso se realizaron cuatro repeticiones. Para trabajar cada grupo en una fase determinada del ciclo estral, las cobayas fueron sincronizadas con un progestágeno sintético vía oral (REGUMATE®, MSD animal Health, Igoville, Francia). En cada día establecido del ciclo se recolectaron los ovarios y se obtuvieron los COC's, que fueron clasificados de acuerdo con su morfología en 3 tipos (A, B y C).

Los COC's obtenidos se dividieron en 2 grupos: el 40 % de los ovocitos, inmediatamente después de ser colectados, se destinaron para determinar la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y medir la distribución de las gotas lipídicas citoplasmáticas con la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium #70065); mientras que el 60 % restante de los ovocitos, luego de la maduración *in vitro*, se utilizaron para medir el diámetro y volumen citoplasmático, estudiar la progresión nuclear y la tasa de apoptosis mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium, USA, #30018).

3.2.3. Protocolo de sincronización del celo

Para sincronizar el celo en las cobayas, se aplicó un progestágeno sintético a base de Altrenogest, el cual se administró por vía oral, una vez al día, durante 15 días a una dosis de 0,22 mg/kg de peso vivo, según la metodología aplicada por Grégoire et al. (2012).

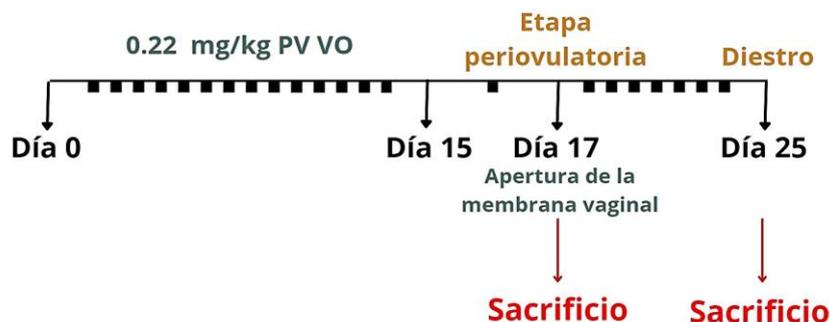


Figura 2. Protocolo de sincronización del celo.

3.2.4. Obtención de COC's

Una vez transcurridos 2 y 10 días de haber retirado el progestágeno, las cobayas fueron sacrificadas siguiendo las recomendaciones planteadas por Marshall et al. (1994) y Noonan (1994) mediante el uso de Pentobarbital Sódico vía intraperitoneal al doble de la dosis establecida para cobayos (45 a 70 mg/kg).

Los ovarios fueron identificados, removidos y se colocaron dentro de fundas ziploc en un envase para toma de muestras con una solución de Lactato de Ringer a una temperatura de 37° C. Posteriormente, se transportaron al laboratorio en donde se colectaron los COC's mediante cortes sucesivos del ovario en una placa de búsqueda de 100 mm con Lactato de Ringer suplementado con PVA y gentamicina a una temperatura de 37° C.

3.2.5. Clasificación de COC's

Para la búsqueda y clasificación de COC's, se utilizó un estereomicroscopio (Nikon SMZ745), tomando en cuenta los criterios de clasificación planteados por De Loos et al. (1989) para bovinos con algunas modificaciones. Los criterios de clasificación fueron los siguientes:

Tabla 1. Criterios de clasificación de los COC's.

Categoría	Descripción
A	Revestimiento compacto de células del cúmulo con varias capas, citoplasma homogéneo o irregular, que puede o no tener forma de medialuna, claro y transparente o relativamente oscuro.

B	Revestimiento de cúmulos con pocas capas, citoplasma homogéneo o irregular, que puede o no tener forma de medialuna, claro y transparente o relativamente oscuro.
C	Revestimiento de células del cúmulo expandidas, parcial o inexistente, citoplasma regular o irregular, claro u oscuro.

3.2.6. Prueba de Azul Brillante de Cresilo (BCB)

El 40% de los COC's, independientemente de su clasificación, fueron sometidos a la tinción BCB para determinar la actividad de la enzima G6PDH, siguiendo la metodología propuesta por Catalá et al. (2009) y modificada por Ayala et al. (2017). Los ovocitos se colocaron en 52 μ M de BCB diluido en PBS y se llevaron a una incubadora Memmert durante 90 minutos a 38,5° C en una atmósfera humidificada. Luego de la exposición, los ovocitos se lavaron tres veces en medio de manipulación (HSOF) atemperado; posteriormente, se examinaron bajo estereoscopia de luz clara y se clasificaron en BCB+ a aquellos que mantuvieron teñido el citoplasma y como BCB- a los que su citoplasma se encontraba sin teñir.

3.2.7. Distribución de gotas de lípidos

Para determinar la distribución de las gotas de lípidos en el citoplasma, se utilizó la tinción de lípidos neutros fluorogénicos LipidSpot™ 488 (Biotium, USA, #70065), siguiendo las instrucciones del fabricante en células vivas para su correcta utilización.

Para dicha tinción, los ovocitos que se utilizaron para determinar la actividad de la enzima G6PDH, fueron desnudados con hialuronidasa, lavados con HSOF y fijados en formaldehído al 4 % por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a lavar los ovocitos con PBS y se los colocó en la respectiva tinción LipidSpot™ 488 durante 10 minutos a cuarto oscuro. Una vez transcurrido el tiempo, los ovocitos se montaron en un portaobjeto con glicerol y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse Ci-E Epifluorescence set, Japón) utilizando los filtros correspondientes.

Los ovocitos se clasificaron según la distribución de gotas de lípidos en el citoplasma como lo describieron previamente Hiraga et al. (2013) en "clase I": gotas lipídicas localizadas uniformemente en todo el citoplasma y "clase II": gotas lipídicas ubicadas centralmente en el citoplasma.

3.2.8. Tasa de apoptosis y progresión nuclear

El 60% de los COC's obtenidos se utilizaron para determinar la tasa de apoptosis y la progresión nuclear en los ovocitos mediante el uso de la tinción Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium, USA, #30018) siguiendo las instrucciones del [Healthy Cells Quantification Kit \(Biotium, USA, #30018\)](#) siguiendo las instrucciones del Andrea Priscila Pazmiño Rodríguez – Erika Fernanda Pangol Araujo

fabricante para su correcta implementación.

Previamente, los ovocitos se clasificaron según los criterios anteriormente descritos y se procedieron a madurar durante 24 horas en un medio de maduración *in vitro* (TCM 199-Earle's salt, SFB 10 %, Piruvato de sodio 0,2 mM, FSH 25 µg/mL, LH 5 µg/mL, Gentamicina 50 µg/mL, L-glutamina 2 mM, Cisteamina 25 µM, Estradiol 2 µg/mL) en una incubadora al 5 % de CO₂, humedad 92 % y temperatura de 38.8°C. Una vez que los ovocitos maduraron, se desnudaron con hialuronidasa, se lavaron con HSOF y se fijaron con formaldehído al 4 % por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de fijarlos, los ovocitos se lavaron con PBS y se colocaron por 15 minutos en dicha tinción, una vez transcurrido el tiempo, se lavaron con 1X Binding Buffer que contiene el mismo kit. Por último, los ovocitos se montaron en un portaobjeto con glicerol y se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse Ci-E Epifluorescence set) utilizando el filtro verde, el cual es el recomendado para observar un marcaje positivo o negativo de la apoptosis.

Según el grado de apoptosis de los ovocitos, se clasificaron en apoptóticos y no apoptóticos, dependiendo del marcaje positivo o negativo de dicha tinción.

Con respecto a la progresión nuclear, el kit empleado para determinar la apoptosis contiene Hoechst 33342, por lo cual, con tan solo cambiar el filtro del microscopio de epifluorescencia de verde a azul, se pudo observar el estado del núcleo. Este se clasificó según criterios propuestos por Ayala et al. (2019) para la evaluación de ovocitos bovinos, con ciertas modificaciones que se describen a continuación.

Tabla 2. Criterios propuestos para la evaluación nuclear de los ovocitos.

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

3.2.9. Determinación del diámetro y volumen del ovocito

Luego de someter a los ovocitos a la tinción Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit, con la ayuda de una cámara (MSHOT MS60) acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon, Eclipse Ci, Japón), se procedió a determinar el diámetro (μm) y volumen (μm^3) ovocitario mediante el empleo del programa ImageJ (Java V 1.8.0) a una calibración de 20x o 40x.

3.3. Análisis estadístico

Los datos recolectados en el laboratorio se tabularon en una base en Excel y posteriormente se analizaron estadísticamente. Las proporciones de ovocitos BCB positivos y negativos, con diferente configuración de la cromatina nuclear y con diferente distribución de gotas lipídicas citoplasmáticas se analizaron por el método de regresión logística del SAS (V 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Por no cumplir los supuestos de normalidad según la prueba de Shapiro Wilk, el diámetro y volumen citoplasmático del ovocito fueron transformados al log 10 y analizados mediante el análisis de varianza del SAS, utilizando el procedimiento GLM. Las diferencias entre medias se compararon con el método de los mínimos cuadrados. En ambos modelos estadísticos, el de regresión logística y el de GLM, se consideraron como variables independientes la categoría de los COC's (A, B y C) y la fase del ciclo estral (periovulatorio y diestro). Se realizaron pruebas de chi-cuadrado para comparar proporciones dentro de cada fase del ciclo estral. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Colección de COC's

De los 686 ovocitos obtenidos, 379 se colectaron en el período periovulatorio y 307 en el diestro. Para la aplicación de la tinción de apoptosis, se utilizaron 267 ovocitos (38,9 %) en la etapa del periovulatorio y 145 (21,1 %) en el diestro (total 60 %). Para aplicar la tinción de lípidos se usaron 112 ovocitos (16,3 %) en el periovulatorio y 162 (23,6 %) en el diestro (total 40 %). Cabe mencionar que los ovocitos utilizados para medir el diámetro y volumen citoplasmático fueron los mismos usados para la tinción de apoptosis, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de ovocitos recolectados para análisis de apoptosis y lípidos de acuerdo con el tipo de COC y período del ciclo estral.

	APOPTOSIS					Porcentaje (%)	
	A	B	C	TOTAL			
Periovulatorio	15	83	169	267	38,9	60	
Diestro	10	106	29	145	21,1		
	LÍPIDOS						
Periovulatorio	2	17	93	112	16,3	40	
Diestro	19	124	19	162	23,6		
TOTAL	46	330	310	686	100	100	

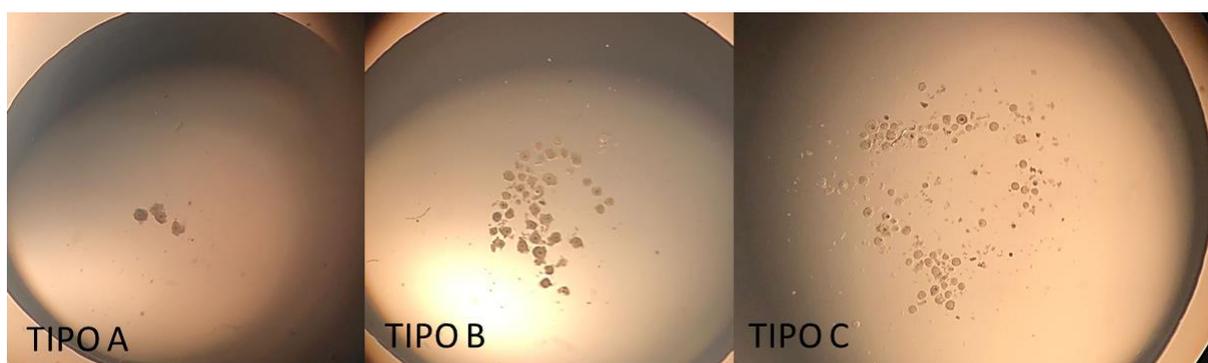


Figura 3. Ovocitos de cobaya previamente seleccionados y clasificados de acuerdo a su calidad por tipo A, B y C.

4.2. Prueba Azul Brillante de Cresilo (BCB)

El análisis estadístico mostró un efecto significativo del estadio del ciclo estral ($P = 0,0033$) pero no del tipo de COC ($P = 0,0649$). La Figura 4 muestra que, en las 3 categorías de

COC's, hubo mayor proporción de ovocitos negativos que positivos a la prueba de BCB. Es importante observar que en los COC's tipo A, la diferencia entre BCB positivos y negativos fue 33,4 puntos porcentuales mayor que en los B y C (14,1 y 18,2 puntos porcentuales respectivamente).

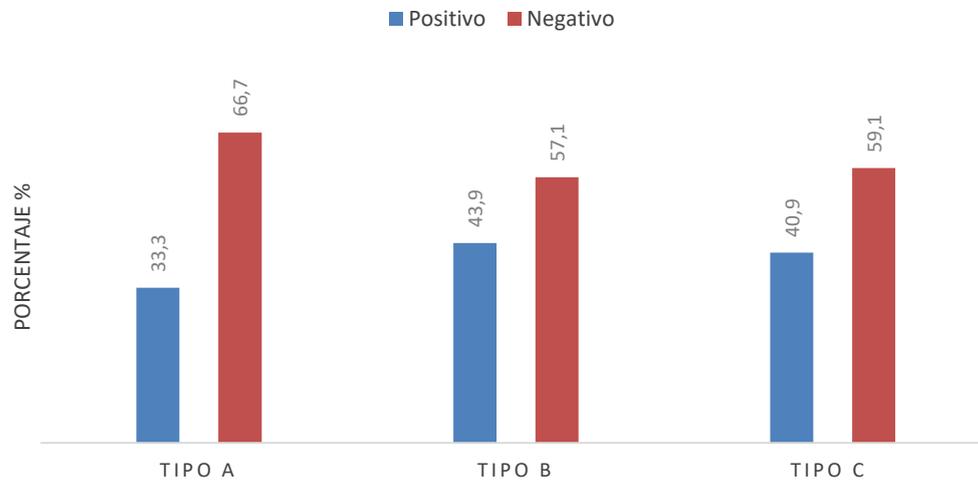


Figura 4. Acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante el test azul brillante de cresilo (BCB) en cobayas de acuerdo al tipo de COC.

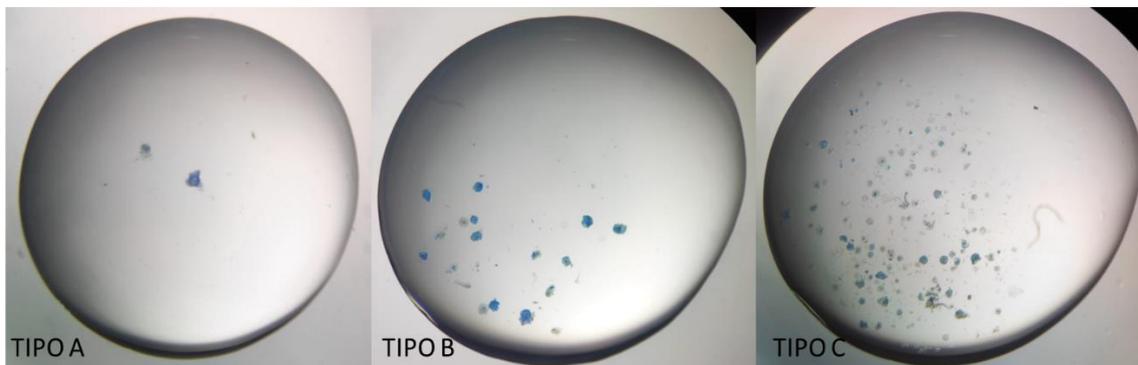


Figura 5. Ovocitos de cobaya sometidos al test azul brillante de cresilo (BCB) clasificados según su calidad en tipo A, B y C. Se pueden observar ovocitos teñidos (BCB +) y sin teñir (BCB -)

La Figura 6 indica que en los COC's A, B y C hubo mayor proporción de ovocitos BCB+ en el periodo periovulatorio que en el diestro. Mientras que, la proporción de ovocitos BCB+ en el periovulatorio varió entre 50 % y 61,1 % ($P = 0,5241$), en el diestro estos valores estuvieron entre 20,7 y 40,8 % ($P = 0,1036$).

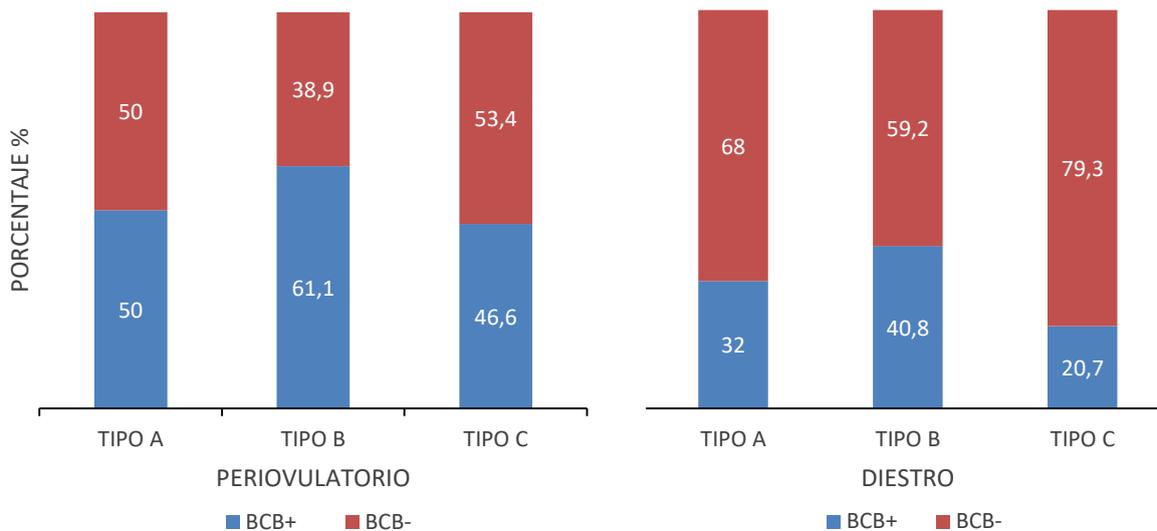


Figura 6. Acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) mediante el test azul brillante de cresilo (BCB) en cobayas de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral.

4.3. Distribución de gotas de lípidos citoplasmáticos

El análisis estadístico mostró un efecto del estadio del ciclo estral ($P = 0,0176$) y del tipo de COC ($P = 0,0516$) sobre las gotas de lípidos citoplasmáticos. La Figura 7 muestra un mayor porcentaje de ovocitos tipo A con distribución uniforme de lípidos en el citoplasma comparando con los de tipo B y C, que estas dos categorías tuvieron porcentajes similares de distribución (uniforme y central).

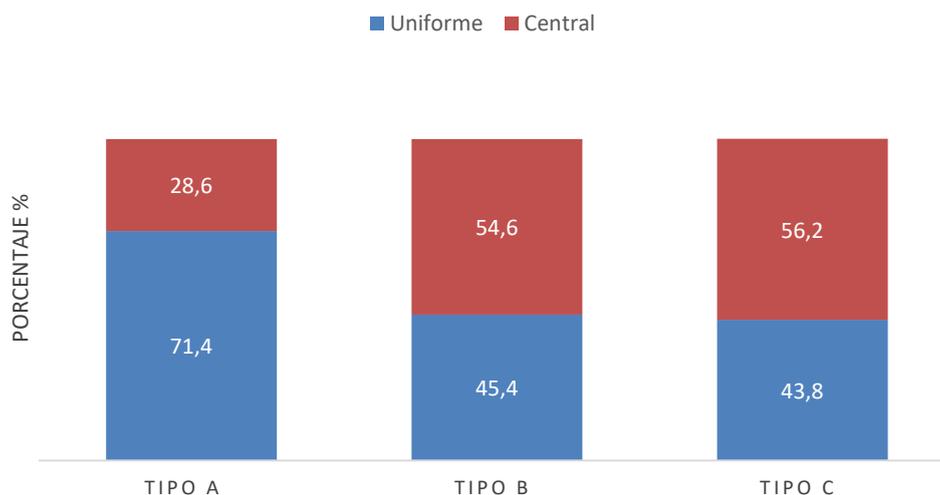


Figura 7. Distribución de gotas de lípidos citoplasmáticos mediante la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium) de acuerdo al tipo de COC en cobayas.

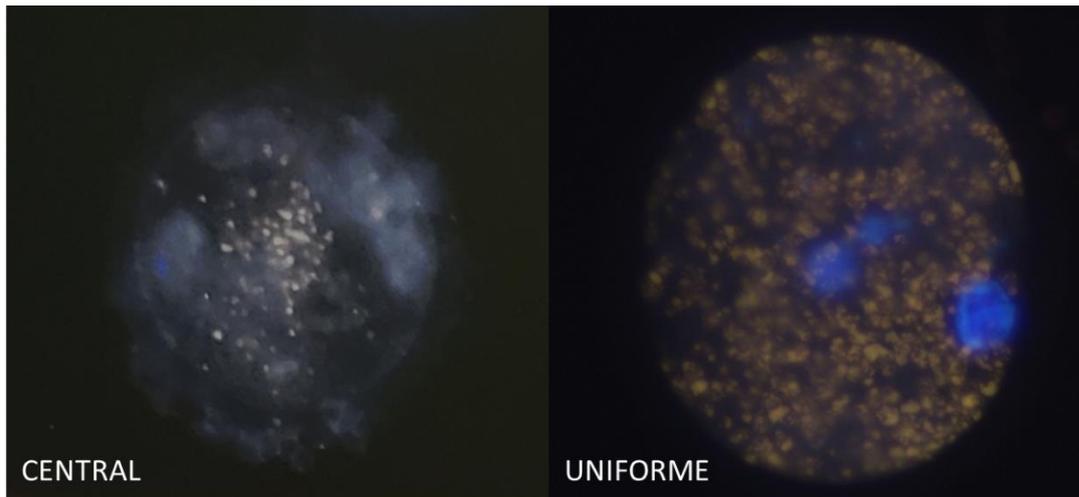


Figura 8. Ovocitos de cobaya sometidos a la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium). Se pueden observar las gotas de lípidos distribuidos de manera tanto central como uniforme en el citoplasma.

La Figura 9 muestra las proporciones de ovocitos con diferente distribución de lípidos en el citoplasma según el tipo de COC y fase del ciclo estral. En el periovulatorio no hubo diferencia significativa entre las proporciones de COC's ($P = 0,9108$), mientras que en la etapa del diestro hubo una evidente diferencia significativa ($P = 0,0305$). Se puede observar que en la etapa del diestro los ovocitos tipo A y C fueron similares en cuanto a la distribución uniforme de lípidos en el citoplasma, con un mayor porcentaje de estructuras con esta distribución; mientras que, en los ovocitos tipo B, hubo un porcentaje ligeramente mayor con distribución central de lípidos.

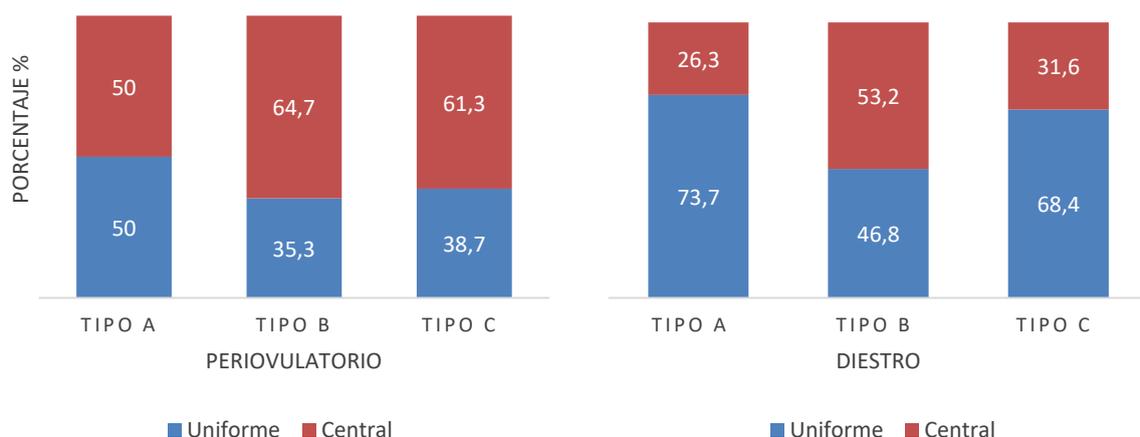


Figura 9. Distribución de gotas de lípidos citoplasmáticos mediante la tinción fluorescente LipidSpot™ 488 (Biotium) de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral. En el diestro, las diferencias de las proporciones fueron significativas ($P < 0,05$)

4.4. Tasa de apoptosis

El estadio del ciclo estral ($P = 0,0005$) y el tipo de COC ($P = 0,0390$) afectaron la tasa de apoptosis. En la Figura 10 se puede observar que la tasa de apoptosis fue menor en los ovocitos tipo A y se incrementó en los de tipo B y C.

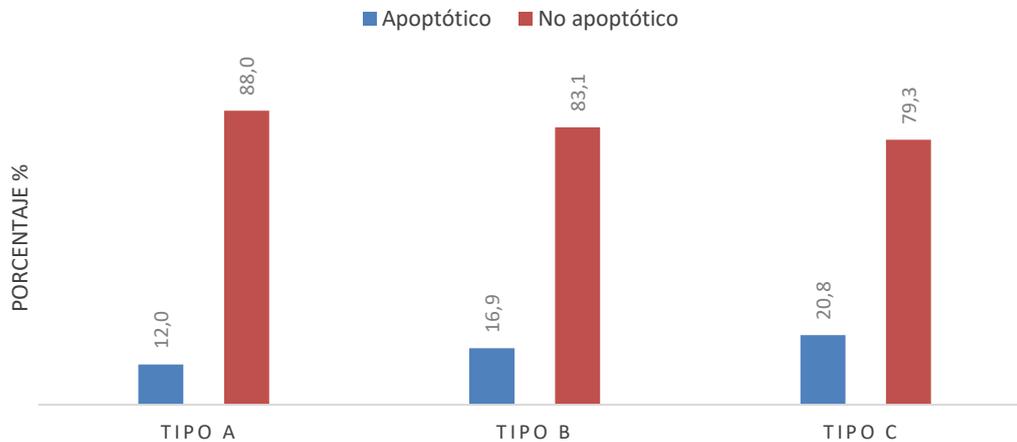


Figura 10. Tasa de apoptosis mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC en cobayas.

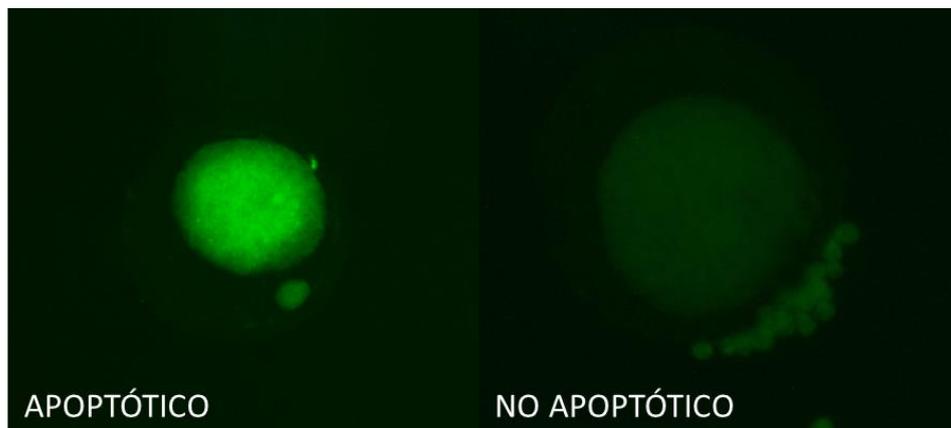


Figura 11. Ovocitos de cobaya sometidos a la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium). Se puede observar un marcaje positivo en el ovocito apoptótico y un marcaje negativo en el ovocito no apoptótico.

Independientemente del estadio del ciclo estral y tipo de COC, la tasa de apoptosis fue de 18,4%. Este porcentaje fue de 14,6% en la fase periovulatoria y de 25,5% en el diestro. En el periovulatorio, la tasa de apoptosis se incrementó 1,6 veces en los COC's B y 2,6 en los C con respecto a los COC tipo A (Figura 12). En el diestro, sin embargo, la tasa de apoptosis fue similar entre los COC's tipo A y B, pero se duplicó en los C.

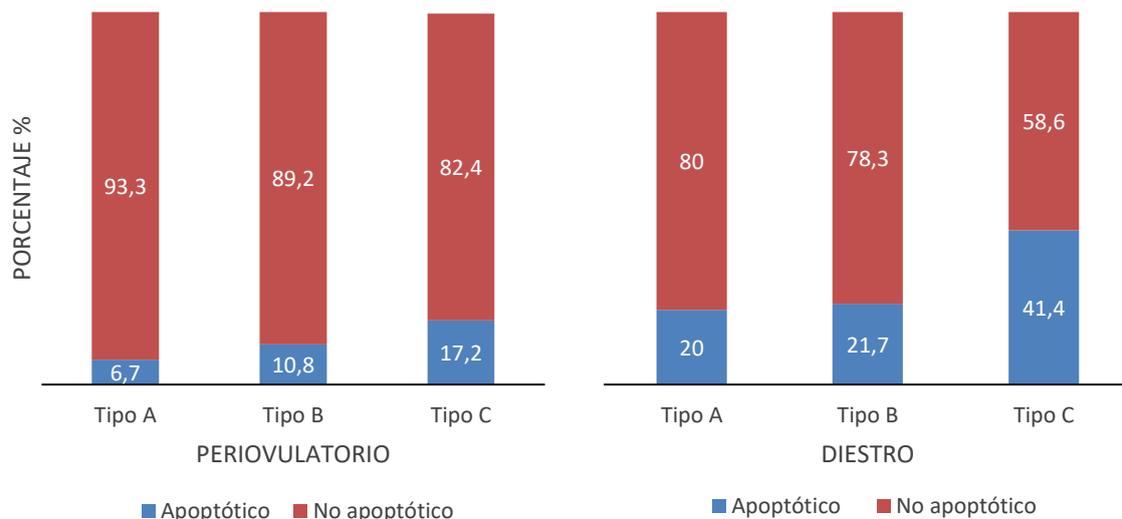


Figura 12. Tasa de apoptosis mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral en cobayas.

4.5. Progresión nuclear

El estatus nuclear fue afectado por el estadio del ciclo estral ($P = 0,0005$) pero no por el tipo de COC ($P = 0,3386$). Como era de esperarse, en la Figura 13 se puede observar un elevado porcentaje de ovocitos maduros en las categorías A, B y C. Mientras que en los COC’s tipo A y B se encontraron resultados relativamente similares de ovocitos maduros, inmaduros y degenerados, en los ovocitos C, hubo una mayor proporción de COC’s degenerados.

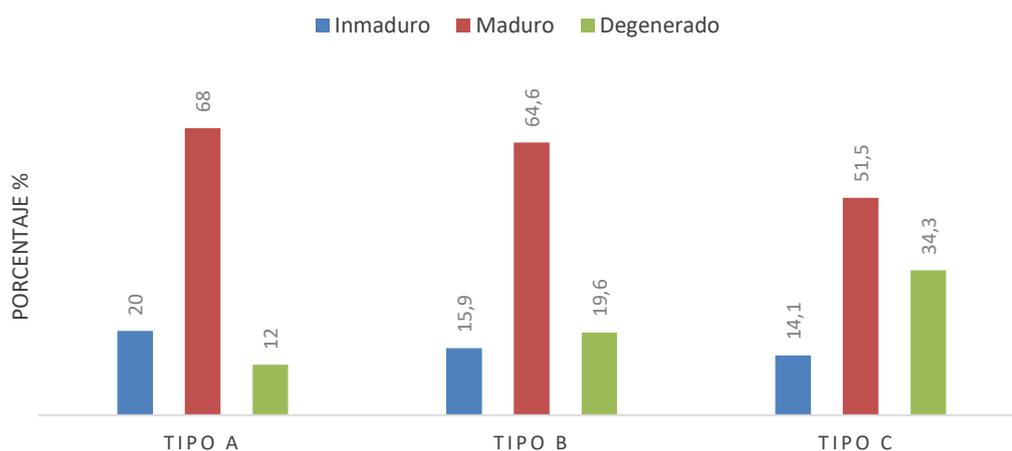


Figura 13. Estatus nuclear en ovocitos evaluados mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC en cobayas.

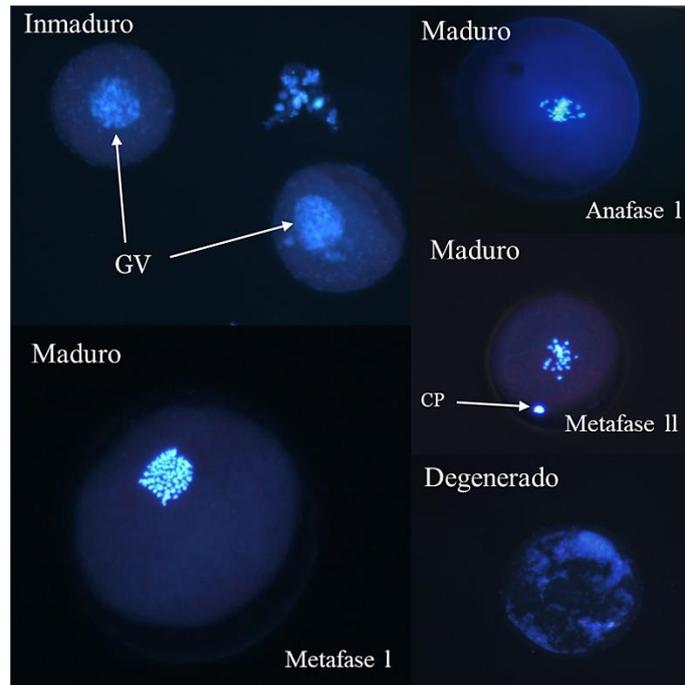


Figura 14. Ovocitos de cobaya sometidos a la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium). Se pueden observar núcleos tanto en un estado inmaduro, maduro (en diferentes etapas) y degenerado.

En el período periovulatorio el porcentaje de ovocitos maduros osciló entre 60 y 55% en los tres tipos de COC ($P = 0,0629$) (Figura 15), mientras que en el diestro la proporción de ovocitos maduros fue 1.3 y 2.6 veces menor en los COC's B y C respectivamente, comparado con los A ($P = 0,0015$).

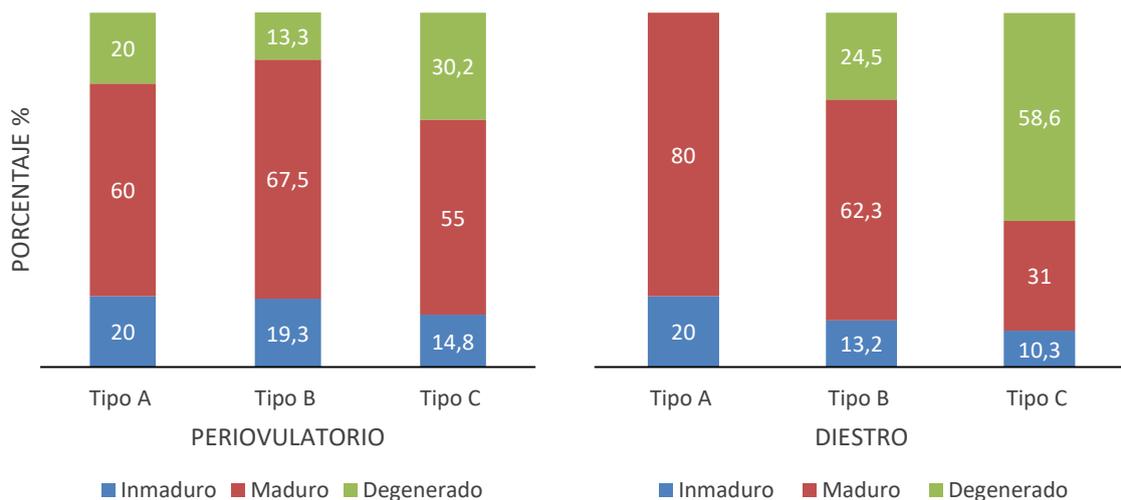


Figura 15. Estatus nuclear en ovocitos evaluados mediante la tinción fluorescente Apoptotic, Necrotic, and Healthy Cells Quantification Kit (Biotium) de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral en cobayas.

4.6. Diámetro y volumen del ovocito

El diámetro ovocitario fue afectado por el estadio del ciclo estral ($P = 0,0053$) y por el tipo de COC ($P < 0,0001$). De igual modo, ambas variables afectaron el volumen del ovocito ($P = 0,0066$ y $P < 0,0001$ respectivamente). Los ovocitos fueron significativamente más grandes (mayor diámetro y volumen) en el diestro que en el periovulatorio. Independientemente del período del ciclo estral, los ovocitos tipo A y B fueron de tamaño similar, pero más grandes que los de tipo C ($P < 0,05$ y $P < 0,0001$ respectivamente) (Figura 16).

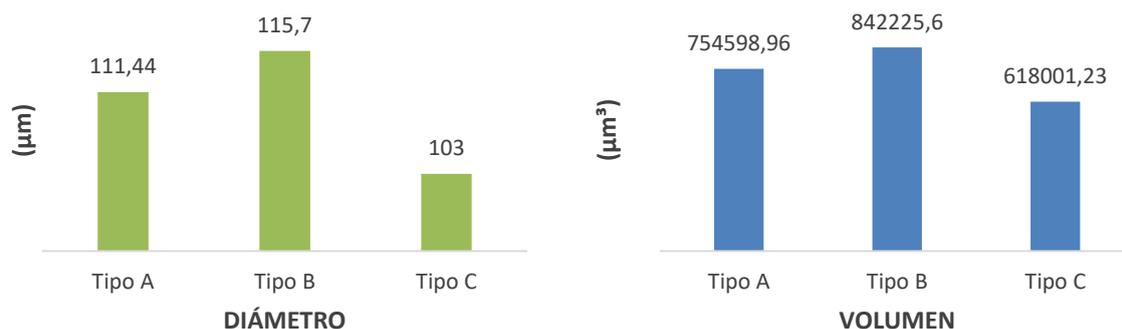


Figura 16. Diámetro y volumen ovocitario evaluado mediante el empleo del programa ImageJ (Java V 1.8.0) en ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC. El diámetro del citoplasma (columnas verdes) fue medido a través de una línea recta en dos puntos de la circunferencia del citoplasma y expresada en micras (μm), mientras que el volumen del ovocito (columnas azules) se determinó mediante la fórmula $\frac{4}{3}(\pi) (\text{radio del ovocito})^3$ expresado en micras cubicas (μm^3), indistintamente del período del ciclo estral.

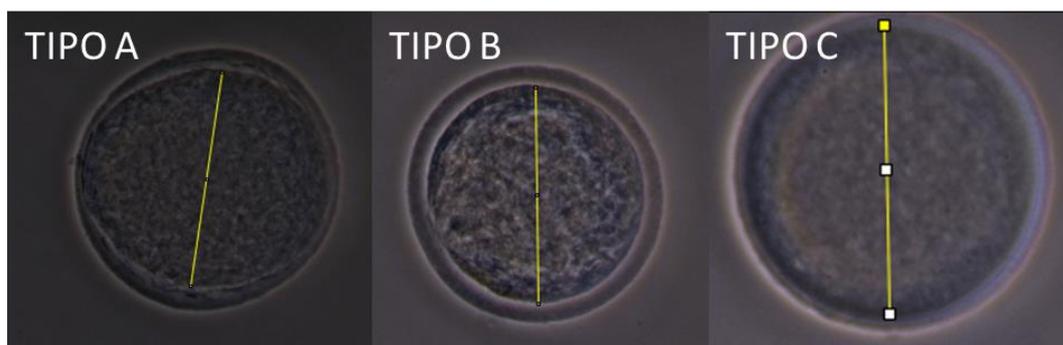


Figura 17. Medición del diámetro ovocitario mediante el empleo del programa ImageJ.

En el diestro, los ovocitos A y B tuvieron un diámetro similar que fue significativamente mayor que en los C ($P < 0,05$). En el estadio periovulatorio, sin embargo, el diámetro ovocitario fue significativamente mayor en B que en A ($P < 0,05$) y C ($P < 0,0001$), que no variaron entre sí (Figura 18). Mientras que los ovocitos de tipo B fueron similares en ambos estadios del ciclo estral, los A y C fueron significativamente más pequeños en el periovulatorio que en el diestro.

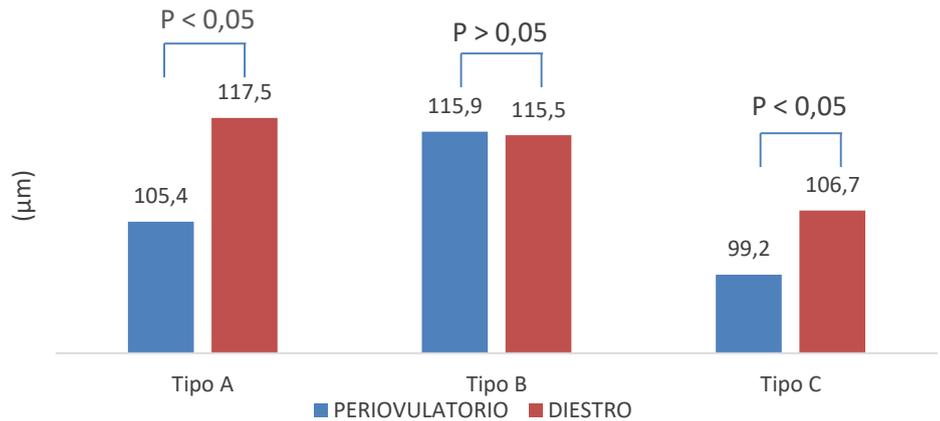


Figura 18. Diámetro ovocitario en micras (μm) evaluado mediante el empleo del programa ImageJ (Java V 1.8.0) en ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral. En los ovocitos tipo A y C se mostró una diferencia significativa ($P < 0,05$) en relación a su tamaño y período del ciclo, a diferencia de los ovocitos tipo B que no mostraron diferencia significativa ($P > 0,05$).

La misma tendencia numérica que con el diámetro se observó en el diestro con el volumen ovocitario, pero en este caso no hubo diferencia estadística entre tipos de COC's (Figura 19). En el periovulatorio, los ovocitos B fueron significativamente más grandes que los A ($P < 0,05$) y C ($P < 0,0001$). Los ovocitos A y B fueron estadísticamente similares en ambos periodos del ciclo estral, no obstante, los C fueron significativamente más pequeños en el periodo periovulatorio que en el diestro ($P < 0,05$).

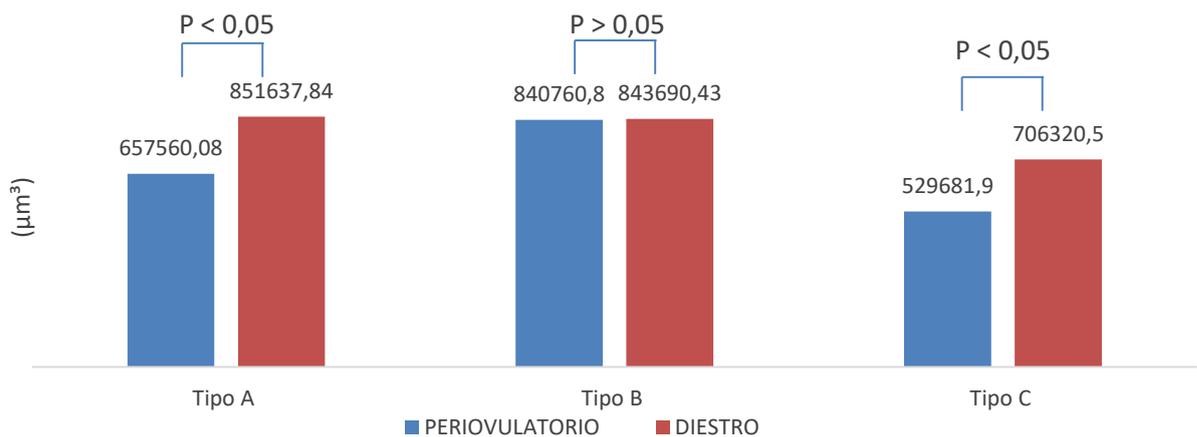


Figura 19. Volumen ovocitario en micras cúbicas (μm^3) evaluado mediante el empleo de la fórmula $\frac{4}{3}(\pi)$ (radio del ovocito)³ en ovocitos de cobaya de acuerdo al tipo de COC y período del ciclo estral. En los ovocitos tipo A y C se mostró una diferencia significativa ($P < 0,05$) en relación a su volumen y período del ciclo, a diferencia de los ovocitos tipo B que no mostraron diferencia significativa ($P > 0,05$).

5. Discusión

Los resultados del presente estudio demostraron que el 60,6 % de los ovocitos tenían actividad de la enzima G6PDH y, por lo tanto, no habían culminado el crecimiento, es decir, fueron BCB -. Este hallazgo es contrario con los estudios de Zhinin & Buñay (2022) y Bravo & Castro (datos no publicados), quienes encontraron en cobayas un porcentaje mayor de ovocitos BCB+ que BCB- (65 y 60,7 % respectivamente). Asimismo, la proporción de ovocitos BCB- fue mayor que los BCB+ en las tres categorías de COC's; estos resultados también son opuestos con los de Zhinin & Buñay (2022), quienes observaron mayor proporción de ovocitos BCB+ en las tres categorías de COC's. Sin embargo, en el estudio de Bravo & Castro (datos no publicados), aunque los COC's tipo A tuvieron mayor proporción de BCB+ que BCB- (65 versus 35%), la relación de BCB's en los COC's tipo B fue de 46,9 y 53,1% respectivamente, y de 7,2 (BCB+) y 92,8% (BCB-) en los COC's tipo C, lo cual difiere, en general, con lo observado en esta investigación. Probablemente, el origen de los ovarios (matadero u ovariectomía) (Zhinin & Buñay, 2022; Duma, 2019) la concentración de la tinción, la edad, el grupo racial y el estadio del ciclo estral podrían explicar estas diferencias.

Los resultados de la prueba BCB en la etapa periovulatoria mostraron mayor porcentaje de ovocitos maduros (BCB +) en las categorías A (50 %), B (61,1 %) y C (46,6 %), lo que permite argumentar que habían concluido su crecimiento y estaban listos para la maduración. Sin embargo, en el diestro, existió mayor porcentaje de ovocitos inmaduros (BCB -) en las categorías A (68 %), B (59,2 %) y C (79,3 %), indicativo de que estos se encuentran en fase de crecimiento (Pujol et al., 2004). Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Rodríguez et al. (1999) en cabras prepúberes, quienes utilizando diferentes concentraciones de la tinción BCB, observaron mayor proporción de ovocitos BCB-, es decir, no completaron su crecimiento. Asimismo, nuestros resultados son consistentes con los hallazgos de Bravo & Castro (datos no publicados), quienes en el diestro de cobayas encontraron igual (COC's A) o mayor (COC's B y C) proporción de ovocitos BCB- que BCB+. El diestro se caracteriza por la presencia de un CL y altas concentraciones de progesterona. La influencia de la progesterona en la competencia ovocitaria evaluada a través de la actividad de la enzima G6PDH ha sido controversial, ya que algunos estudios encontraron mayor proporción de ovocitos BCB+ (Quezada-Casasola et al., 2018; Argudo et al., 2020) mientras que otros no encontraron diferencia entre ambas poblaciones (Sugulle et al., 2008).

Referente a la distribución de gotas lipídicas en el citoplasma, se utilizaron ovocitos sin previa maduración, que en el periovulatorio, los COC's tipo A tuvieron igual distribución, es decir, tanto central como uniforme, mientras que los COC's B y C presentaron una mayor distribución de tipo central, demostrando una mayor competencia en el desarrollo que los

ovocitos distribuidos de manera uniforme, como lo demuestra el estudio realizado por Hiraga et al. (2013) en ovocitos porcinos madurados previamente. Estos autores compararon los ovocitos clase I (distribución uniforme) y clase II (distribución central) después de la fertilización *in vitro* (FIV), obteniendo como resultado que los ovocitos clase II mostraron una tasa significativamente mayor de desarrollo de blastocistos que los ovocitos de clase I, sugiriendo que los ovocitos con alta competencia de desarrollo pueden seleccionarse en función de los patrones de localización de las gotas de lípidos. No obstante, a diferencia del estudio citado, nosotros evaluamos la distribución de lípidos en ovocitos inmaduros, es decir, luego de un corto período de tiempo de ser colectados y, como demostró Hyttel et al. (1997) en bovinos, el tamaño y la cantidad de gotas de lípidos puede cambiar entre ovocitos maduros e inmaduros. Así se demostró en ratones, cuyos ovocitos inmaduros tuvieron una distribución homogénea de lípidos, mientras que en los que habían alcanzado la metafase II los lípidos estaban formado grupos (clústeres) en el citoplasma (Bradley et al., 2016).

En la etapa del diestro, los ovocitos tipo A presentaron una distribución lipídica predominantemente uniforme y en menor proporción de tipo central, obteniendo resultados similares en los COC's tipo C, mientras que en los COC's tipo B existió igual proporción de ovocitos con distribución uniforme y central. Basados en los hallazgos de Hiraga et al. (2013), estos resultados sugieren que en esta etapa hubo menos ovocitos con alta competencia de desarrollo, como si se observaron en mayor proporción en los ovocitos colectados en el periovulatorio. Un estudio que evaluó el número y tamaño de lípidos en ovocitos bovinos pre y post maduración (Hyttel et al., 1997), demostró que los ovocitos inmaduros contienen pequeñas gotas de lípidos, pero en mayor cantidad, mientras que los maduros poseen gotas de mayor tamaño, pero en menor cantidad. No hay información sobre estudios que hayan evaluado en cobayas la distribución de gotas lipídicas en el citoplasma. No obstante, en caninos, la distribución de lípidos en ovocitos inmaduros siguió un patrón periférico o central en la fase luteal y predominantemente homogéneo en la fase folicular (Ariu et al., 2015). Considerándose a la fase luteal como el diestro y la folicular como el periovulatorio de nuestro estudio, los resultados de Ariu et al. (2015) son contrarios a los observados en esta investigación; eso hace pensar que pudiera haber diferencias entre especies.

La apoptosis es un buen marcador de la calidad y la competencia de desarrollo del ovocito (Abd et al., 2014), independientemente del estadio de ciclo estral y del tipo de COC, se observó luego de la MIV una menor proporción de ovocitos apoptóticos que no apoptóticos, obteniendo un mayor porcentaje de ovocitos apoptóticos en el diestro, especialmente en los ovocitos tipo C. Esto concuerda con resultados de Oltvai et al. (1993), quienes demostraron que los ovocitos tipo C se encuentran en un proceso apoptótico más avanzado, lo que

explica por qué estos ovocitos tienen menos competencia de desarrollo que los de tipo A y B (Hawk & Wall, 1994).

A pesar de tener menores porcentajes de apoptosis en los COC's de mejor calidad, Janowski et al. (2012) menciona que este hecho podría deberse al grado de atresia que se encuentra normalmente en los folículos, así como también al estrés generado durante el transporte, la extracción de los COC y la producción de radicales libres derivados del oxígeno. Estudios realizados en COC's previamente sometidos a MIV tanto de bovinos como de cabras prepúberes, mencionan que los ovocitos de mayor diámetro son más competentes para dar lugar a un embrión viable, además de que sufren menor incidencia de apoptosis (Bustamante, 2007), lo que concuerda con nuestros resultados, en donde los ovocitos de mayor diámetro (Tipo A), presentaron una menor proporción de apoptosis tanto en la etapa periovulatoria como en el diestro.

El estatus nuclear fue evaluado en ovocitos previamente madurados durante 24 horas, esto explica el hecho de haber obtenido mayores porcentajes de ovocitos maduros en las tres categorías de COC's. A medida que disminuyó la calidad ovocitaria, especialmente en los ovocitos tipo C y particularmente en la etapa del diestro, se observó un ligero aumento de la apoptosis y una mayor cantidad de ovocitos con el núcleo degenerado.

Conforme existió una mayor cantidad de ovocitos maduros, hubo una correlación directa con una menor tasa de apoptosis independientemente del estadio del ciclo estral. Una investigación realizada por Auclair et al. (2013) en ovocitos bovinos previamente madurados, en la que se empleó la tinción Hoescht para medir el estado meiótico de los ovocitos, se encontró que más de un 88 % de ovocitos con o sin células del cúmulo alcanzó la metafase II; sin embargo, luego de la FIV, la tasa de desarrollo embrionario se redujo en un 50 % en ovocitos desnudos con respecto a los que mantenían las células del cúmulo. De igual manera, Khurana & Niemann (2000) observaron diferencias en las tasas de maduración, fecundación y desarrollo embrionario entre distintos grupos de ovocitos que contenían diferentes grados de células del cúmulo, los resultados indican un papel importante de las células del cúmulo para el proceso de producción de embriones. En nuestro estudio, los ovocitos tipo A que tenían más capas compactas de células del cúmulo lograron mayores tasas de maduración, particularmente en el diestro, que los tipos B y C.

Para el diámetro y volumen ovocitario, se obtuvieron medidas proporcionales a la calidad del ovocito, alcanzando mayores diámetros para los ovocitos tipo A, y menores diámetros para los ovocitos tipo B y C, de igual manera, el volumen fue proporcional al diámetro. Los autores Zhinin & Buñay (2022) encontraron resultados similares con respecto al diámetro y volumen ovocitario en ovocitos de cobaya, obteniendo un promedio de 106 μm para los ovocitos tipo

A, 100 μm para tipo B y 95 μm para ovocitos tipo C. Los autores Bravo & Castro (datos no publicados) obtuvieron resultados similares en el diámetro del ovocito para el período periovulatorio (Tipo A: 90,6 μm ; Tipo B: 85,2 μm ; Tipo C: 82,6 μm) y diestro (Tipo A: 91,2 μm ; Tipo B: 89,9 μm ; Tipo C: 83,8 μm) sin embargo, estas medidas fueron ligeramente menores a las obtenidas en nuestro estudio.

La evaluación del diámetro ovocitario es esencial para clasificar la calidad de dichos ovocitos, la cual se relaciona con la capacidad de este para reanudar y completar la meiosis *in vitro* (Duma, 2019). Los ovocitos con un diámetro mayor son proporcionales a presentar una mejor calidad y por lo tanto tasas más altas de fecundación (Loutradis et al., 1999). Existen trabajos en otros roedores que establecen que ovocitos con tamaños $>70 \mu\text{m}$ son significativamente más grandes y con mayor funcionalidad comparados con los ovocitos medianos (60-70 μm) y pequeños ($< 60 \mu\text{m}$) (Wu et al., 2007), a diferencia en nuestra investigación en los cuales se obtuvieron medidas superiores en diámetro y volumen ovocitario.

Estudios realizados por Sadeu et al. (2007) obtuvieron aproximadamente 78 μm de diámetro ovocitario, la diferencia se basa en que este autor realizó cortes histológicos en folículos de cobaya. Fernández et al. (2018) reportaron un diámetro ovocitario (sin ZP) de $75,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$ y el volumen de $234.003,8 \pm 76.547,1 \mu\text{m}^3$ respectivamente, en su estudio de caracterización morfológica de ovario y ovocitos en cobayos. Aunque estas dimensiones son entre 25 y 40 μm menores a las observadas en nuestro estudio, hay que considerar que los métodos de medición no fueron iguales.

Conclusiones

- Las características morfométricas, estructurales y funcionales de los ovocitos variaron según la categoría de los complejos cúmulo-ovocito y del estadio del ciclo estral de las cobayas.
- El test BCB en la etapa periovulatoria resultó en un mayor porcentaje de ovocitos maduros que inmaduros, mientras que, en el diestro se observó mayor proporción de ovocitos inmaduros.
- En general, la distribución de gotas lipídicas citoplasmáticas fue predominantemente central en la etapa periovulatoria y uniforme en el diestro.
- Se observó una mayor proporción de ovocitos no apoptóticos tanto en el periovulatorio como en el diestro.
- Independientemente del estadio del ciclo estral, la tasa de apoptosis se incrementó conforme disminuyó la calidad ovocitaria.
- El estatus nuclear evidenció un mayor porcentaje de ovocitos maduros y de ovocitos tipo C degenerados en las dos etapas del ciclo estral.
- Los ovocitos de mejor calidad (Tipo A y B) presentaron mayor tamaño que los de menor calidad (Tipo C). El volumen fue proporcional al diámetro ovocitario, es decir, a mayor diámetro, el ovocito tuvo un mayor volumen.

Referencias

- 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), 2196. doi:10.3390/ani10122196
- Araníbar, E., & Echevarría, L. 2014. Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Rev Inv Vet Perú*, 25(1), 29–36. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v25n1/a03v25n1.pdf>
- Argudo, D.E., Tenemaza, M.A., Merchán, S.L., Balvoa, J.A., Méndez, M.S., Soria, M.E., Galarza, L.R., Ayala, L.E., Hernández-Fonseca, H.J., Perea, M.S., Perea, F.P. 2020. Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.05.044
- Ariu, F., Strina, A., Murrone, O., Falchi, L., Bebbere, D., Ledda, S., ... Bogliolo, L. 2015. Lipid droplet distribution of immature canine oocytes in relation to their size and the reproductive stage. *Animal Science Journal*, 87(1), 147–150. doi:10.1111/asj.12432
- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., ... Uzbekova, S. 2013. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 304(6), E599–E613. doi:10.1152/ajpendo.00469.2012
- Avilés, D.F., Martínez, A.M., Landi, V., Delgado, J.V. 2014. El cuy (*Cavia porcellus*): Un recurso andino de interés agroalimentario. The guinea pig (*Cavia porcellus*): An Andean resource of interest as an agricultural food source. *Animal Genetic Resources/Ressources Génétiques animales/Recursos Genéticos Animales*, 55, 87–91. doi:10.1017/s2078633614000368
- 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., Vázquez, J., Murillo, Y., Dután, J., Calle, G., Argudo, D., & Perea, F. 2017. Competencia del ovocito bovino obtenido por Ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de Cresilo. *Maskana*, 8, 77–80. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1492>
- Balgobin, S., Montoya, T. I., Shi, H., Acevedo, J. F., Keller, P. W., Riegel, M., Wai, C. Y., & Word, R. A. 2013. Estrogen alters remodeling of the vaginal wall after surgical injury in guinea pigs. *Biology of Reproduction*, 89(6), 1–10.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.112367>

- Barahona, M., & Quishpe, O. 2012. Inducción de superovulación en cobayas primerizas, usando gonadotropina sérica con tres dosis diferentes [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/653/1/T-UCE-0014-19.pdf>
- Boni, R. 2012. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. *Anim Reprod*, 9, 362-369.
- Bradley, J., Pope, I., Masia, F., Sanusi, R., Langbein, W., Swann, K., & Borri, P. 2016. Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy. *Development*, 143(12), 2238–2247. doi:10.1242/dev.129908
- Cadena, S. 2000. Crianza Casera y Comercial Cuyes. Quito: Cadena de Editores, 2000
- Calvo, J., Robert, D., Viqueira, M., y Lombide, P. 2015. Viabilidad de ovocitos vitrificados y madurados in vitro de gata doméstica adulta (*Felis catus*) en estación reproductiva. *International Journal of Morphology*, 33(4), 1242– 1247. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000400008>
- Beltrán, K., Cajas, Y., Garcia-Garcia, R., Lorenzo, P., Carrera, R., Rebollar, P., & Arias-Álvarez, M. 2015. Effect of epidermal growth factor on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of guinea pig oocytes. *Developmental Biology and Physiology of Reproduction*, 12(3), 793.
- Beltrán, K., Rodríguez, X., García, R., Arias, M., Lorenzo, P. 2012. Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) En Ecuador: resultados preliminares. *Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos*. 4 (15): 57, 2012 ISSN: 1989-5003.
- Bustamate, B. 2007. Estudio molecular y de apoptosis en ovocitos de cabras prepúberes y su relación con el desarrollo embrionario. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. ISBN: 9788469050835.
- Castaneda, C.A., Kaye, P., Pantaleon, M., Phillips, N., Norman, S., Fry, R., D’Occhio, M.J. 2013. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, 79(3), 417–422. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.10.006
- 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. https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2009/comunicaciones/2009_Rep_14.pdf
- Chauca, L. 1994. Crianza de cuyes (en línea). Folleto No. 6-94 1:1-27. <https://idl-bnc-idrc.dspacedirect.org/bitstream/handle/10625/13468/100144.pdf?sequence=1>
- Choi, D., Hwang, S., Lee, E., Yoon, S., Yoon, B.-K., & Bae, D. 2004. Expression of Mitochondria-Dependent Apoptosis Genes (p53, Bax, and Bcl-2) in Rat Granulosa Cells During Follicular Development. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*,

11(5), 311–317. doi:10.1016/j.jsjg.2004.01.015

- Córdova, I.A., Ruiz, L.C., Solalpa, C.V., Córdova, J.M., & Córdova, J.C. 2011. Biotecnologías de reproducción animal con posibilidad de aplicación para optimizar el potencial reproductivo y productivo de los animales. Una revisión. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 5(2). doi:10.5209/rev_rccv.2011.v5.n2.36938
- Coucouvani, E.C., Sherwood, S.W., Carswell-Crumpton, C., Spack, E.G., Jones, P.P. 1993. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Experimental Cell Research*, 209(2), 238–247. doi:10.1006/excr.1993.1307
- Cuadrado, F. 2014. Evaluación de Ovocitos Ovinos por Microscopia de Luz Polarizada. Universidad de Oviedo. Master Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/4014/TFMdef.pdf;jsessionid=A8A79084017DAC5CEC0B04AC2DBC3F84?sequence=1>
- De Loos, F., van Vliet, C., van Maurik, P., & Kruip, T. A. M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, 24(2), 197–204. doi:10.1002/mrd.1120240207
- Dharmarajan, A.M., Goodman, S.B., Tilly, K.I., Tilly, J.L. 1994. Apoptosis during functional corpus luteum regression: evidence of a role for chorionic gonadotropin in promoting luteal cell survival. *Endocr J (Endocrine)*; 2:295-303.
- Duma, M. 2019. Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero (Bachelor's thesis). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/32159>
- Duma, J., Argudo, D., Perea, F., Ayala, L. 2019. Relationship of the metabolic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and the morphometry of bovine oocytes before and after in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 54(S4), 129-130. doi:10.13140/RG.2.2.23449.57444
- Dyson, R.M., Palliser, H.K., Kelleher, M.A., Hirst, J.J., Wright, I.M. 2012. The guinea pig as an animal model for studying perinatal changes in microvascular function. *Pediatric Research*, 71(1), 20–24. doi:10.1038/pr.2011.9
- Fernández, A., Encalada, T., Guaman, A., Ayala, L., Argudo, D., Rosales, C., y Perea, F. 2018. Caracterización morfométrica 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. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30751/1/documento.pdf>
- Garris, D. R., & Foreman, D. 1984. Follicular Growth and Atresia during the Last Half of the Luteal Phase of the Guinea Pig Estrous Cycle: Relation to Serum Progesterone and Estradiol Levels and Utero-Ovarian Blood Flow. *Endocrinology*, 115(1), 73–77.

<https://doi.org/10.1210/ENDO-115-1-73>

- González, H., & González, H. 2005. Biotecnología reproductiva: Una alternativa para mejorar la producción animal. *Biotempo*, 5, 5–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.31381/biotempo.v5i0.886>
- Gordon I. 2003. In vitro fertilization. In Gordon I, editor. *Laboratory production of cattle embryos*. Second edition. London, UK: CABI Publishing; pp. 176-219.
- 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>
- 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. doi:10.1016/0093-691x(94)90822-z
- Hiraga, Kou & Hoshino, Yumi & Tanemura, Kentaro & Sato, Eimei. 2013. Selection of In Vitro-Matured Porcine Oocytes Based on Localization Patterns of Lipid Droplets to Evaluate Developmental Competence. *The Journal of reproduction and development*. 59. 10.1262/jrd.2012-126.
- Hurtado de Mendoza, M. V., & Fernández, J. 2015. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. (3rd ed.). ASEBIR. <https://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/>
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23–32. doi:10.1016/s0093-691x(96)00336-6
- Ikeda, S., Imai, H., & Yamada, M. 2003. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction*, 125(3), 369–376. doi:10.1530/rep.0.1250369
- Janowski D, Salilew-Wondim D, Torner H, Tesfaye D, Ghanem N, Tomek W, El-Sayed A, Schellander K, Hölker M. 2012. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*. Aug;78(3):656-69.e1-5. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.012.
- Juengal, J.L., Garverick, H.A., Johnson, A.L., Youngquist, R.S., Smith, M.E. 1993. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology*; 132: 249-254.
- Khurana, N. K., & Niemann, H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54(5), 741–756. doi:10.1016/s0093-691x(00)00387-3
- [Logothetopoulos, J., Dorrington, J., Bailey, D., y Stratis, M. 1995. Dynamics of follicular](#)

- growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: Fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *The Anatomical Record*, 243(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/ar.1092430106>
- Lord, E., Collins, C., deFrance, S., LeFebvre, M.J., Pigièrre, F., Eeckhout, P., Erauw, C., Fitzpatrick, S.M., Healy, P.F., Martínez-Polanco, M.F., Garcia, J.L., Ramos Roca, E., Delgado, M., Sánchez Urriago, A., Peña León, G.A., Toyne, J.M., Dahlstedt, A., Moore, K.M., Laguer Diaz, C., Zori, C., Matisoo-Smith, E. 2020. Ancient DNA of Guinea Pigs (*Cavia* spp.) Indicates a Probable New Center of Domestication and Pathways of Global Distribution. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-65784-6
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinis, S., & Michalas, 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)
- Mangia, F., & Epstein, C. J. 1975. Biochemical studies of growing mouse oocytes: Preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Developmental Biology*, 45(2), 211–220. doi:10.1016/0012-1606(75)90061-5
- Marshall, S., Milligan, A., Yates, R. 1994. Experimental techniques and anaesthesia in the rat and mouse. ANZCCART Facts sheet. ANZCCART News 7 (1) 4pp
- Martínez, Y. 2013. Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación in vitro. <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf>.
- Matsuzawa, S., Isobe, M., & Kurosawa, N. 2018. Guinea pig immunoglobulin VH and VL naïve repertoire analysis. *PLOS ONE*, 13(12), e0208977. doi:10.1371/journal.pone.0208977
- Milakovic, I., Jeseta, M., Hanuláková, S., Drahomira, K., Hanzalova, K., Hulinska, P., Machal, L., Kempisty, B., Antosik, P., Machatkova, M. 2015. Energy Status Characteristics of Porcine Oocytes During In Vitro Maturation is Influenced by Their Meiotic Competence. *Reproduction in Domestic Animals*. 50. doi:10.1111/rda.12592.
- Nett, T.M., McClellan, M.C., Niswender, G.D. 1976. Effects of Prostaglandins on the Ovine Corpus Luteum: Blood Flow, Secretion of Progesterone and Morphology, *Biology of Reproduction*. Volume 15. <https://doi.org/10.1095/biolreprod15.1.66>
- Noonnan, D. 1994. The guineapig (*Cavia porcellus*). ANZCCART fact Sheet. ANZCCART News 7 (3), 8 pp
- Nor Azlina Abd Aziz, Nurul Atikah Osman, Habsah Bidin, Wan Khadijah Embong, Noor Hashida Hashim. 2014 Influence of Early Apoptosis Incidence on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes, *APCBEE Procedia*, Volume 8,

<https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.039>

- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. Aug 27;74(4):609-19. doi: 10.1016/0092-8674(93)90509-o
- Palma, G. 2001. *Biología de la reproducción*. 2001. ISBN 9874337796, 9789874337795.
- Pesce, M & De Felici, M. 1994. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope *Anatomy and Embryology* 189 435–440
- Pesce, M., Farrace, M.G., Piacentini, M., Dolci, S., De Felici, M. 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis) *Development* 118 1089–1094
- Pino, T. 2015. Descripción histológica de ovarios y testículos de cuyes (*Cavia porcellus*) a los dos meses de edad, suplementados con nucleótidos [Universidad Católica de Santa María]. <https://core.ac.uk/download/pdf/198133271.pdf>
- Prates, E.G., Nunes, J.T., Pereira, R.M., 2014. A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/692067
- Pujol, M., López-Béjar, M., Paramio, M. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735–744. doi:10.1016/s0093-691x(03)00250-4
- 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 Andrés. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/25507>
- Quezada-Casasola, A., Martínez-Armendáriz, K. E., Itzá-Ortiz, M. F., Escárcega-Ávila, A. M., Pérez-Eguía, E., Filipiak, Y., Larocca, C., Carrera-Chávez, J. M. 2018. Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of in vitro matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 967–972. doi:10.1080/09712119.2018.1440566
- Rodríguez, E., López, M., Velilla, E., Oter, M., Paramio, M. (1999). Selección de ovocitos de cabras prepuberes mediante la tinción vital Brillant Cresil Blue. *Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (España). Facultad de Veterinaria*, 20(2), 687-689. ISSN: 1130-6009.
- Roy, M.M., Goldstein, K.L., & Williams, C. 1993. Estrus Termination Following Copulation in Female Guinea Pigs. *Hormones and Behavior*, 27(3), 397–402. doi:10.1006/hbeh.1993.1029

- Rueda, B.R., Tilly, K.I., Botros, I.W., Jolly, P.D., Hansen, T.R., Hoyer, P.B., Tilly, J.L. 1997. Increased bax and interleukin-1beta-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biol Reprod*; 56(1):186-93. doi: 10.1095/biolreprod56.1.186. PMID: 9002648.
- Rueda, B.R., Tilly, K.I., Hansen, T.R., Hoyer, P.B., Tilly J.L. 1995a. Expression of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the bovine corpus luteum: evidence supporting a role for oxidative stress in luteolysis. *Endocrine*; 3:227-232.
- Rueda, B.R., Wegner, J.A., Marion, S.L., Wahlen, D.D., Hoyer, P.B. 1995b. Internucleosomal DNA fragmentation in ovine luteal tissue associated with luteolysis: in vivo and in vitro analyses. *Biol Reprod*; 52:305- 312.
- Ruiz, M., Rivera, B., & Ruiz, A. 1998. *Reproducción Animal: Métodos de estudio en sistemas*. IICA Rispal.
- Saavedra, L. 2010. Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados in vitro. Proyecto de Investigación: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/9708>
- Sadeu, J. C., Adriaens, I., Cortvrindt, R., y 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>
- Sánchez-Macías, D., Barba-Maggi, L., Morales-delaNuez, A., & Palmay-Paredes, J. 2018. Guinea pig for meat production: A systematic review of factors affecting the production, carcass and meat quality. *Meat Science*, 143, 165–176. doi:10.1016/j.meatsci.2018.05.004
- Scott, G. 2005. *Biología del desarrollo*. s.l.: Panamericana. ISBN-10: 9500608693
- Shikone, T., Yamoto, M., Kokawa, K., Yamashita, K., Nishimori, K., Nakano, R. 1996. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol & Metab*; 81:2376- 2380.
- Sirait, B., Wiweko, B., Jusuf, AA., Iftitah, D., Muharam, R. 2021. Oocyte Competence Biomarkers. Associated With Oocyte Maturation: A Review. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:710292. doi: 10.3389/fcell.2021.710292
- Sterusky, M., Plevkova, J., Grendar, M., Buday, T. 2020. Female guinea pig model for cough studies and its response to most common tussive substances. *Physiological Research* 69(Suppl 1):S171-S179. doi:10.33549/physiolres.934409
- Sugulle, A. H., Dochi, O., & Koyama, H. 2008. Developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue Staining: Effect of the presence of corpus luteum on embryo development. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(1), 50-55.
- Sutton, M. L. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human*

- Reproduction Update, 9(1), 35–48. doi:10.1093/humupd/dmg009
- Tilly, J. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*, 1(3), 162–172. doi:10.1530/ror.0.0010162
- Ueno, S., y Niimura, S. 2008. Size of Perivitelline Space and Incidence of Polyspermy in Mouse Oocytes Matured In Vivo and In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(1), 44–49. <https://doi.org/10.1274/jmor.25.44>
- Velarde, C. N., & Gandarillas, E. D. 2019. Recuperación de ovocitos recolectados de vacas criollas post mórtem del sur del Perú. *Ciencia Y Desarrollo*. <https://doi.org/10.33326/26176033.2005.9.186>
- 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. *Am J Transl Res*, 11(12):7479-7491.
- Wani, N. A. 2021. In vitro embryo production (IVEP) in camelids: Present status and future perspectives. *Reproductive Biology*. Volume 21. Issue 1. 100471. ISSN 1642-431X. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.100471>.
- Welte, M., Gould, A. 2017. Lipid droplet functions beyond energy storage, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Volume 1862, Issue 10, Part B, Pages 1260-1272, ISSN 1388-1981, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006>.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., & Currie, A. R. 1980. Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology*, 251–306. doi:10.1016/s0074-7696(08)62312-8
- Wrenzycki, C. 2021. Parameters to identify good quality oocytes and embryos in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 34, 190-202. <https://doi.org/10.1071/RD21283>
- Wu, Y. G., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G. C., Han, D., Miao, D. Q., y Tan, J. H. 2007. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: A study using the mouse model. *Cell Research*, 17(8), 722–731. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.66>
- Yanagimachi, R. 1974. Maturation and fertilization in vitro of guinea pig ovarian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38(2), 485–488. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0380485>
- Yao, M., Cheng, W., Liu, L., Zheng, H., Gu, W., Miao, F., Zhang, J., Wang, L., Su, Y., Liu, Y., Sui, H. 2021. Relationship between chromatin configuration and in vitro maturation ability in guinea pig oocytes. *Veterinary Medicine and Science*. doi:10.1002/vms3.596
- Zhinin Criollo, A. B., & Buñay Ortiz, P. A. 2022. Implementación de un protocolo de maduración in vitro de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) (Bachelor's thesis). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/39214>

Anexos

Anexo A. Cobayas en jaulas experimentales (*Cavia porcellus*).



Anexo B. Administración de Altrenogest (REGUMATE®) mediante vía oral a las cobayas.



Anexo C. Apertura de membrana vaginal.



Anexo D. Membrana vaginal cerrada.



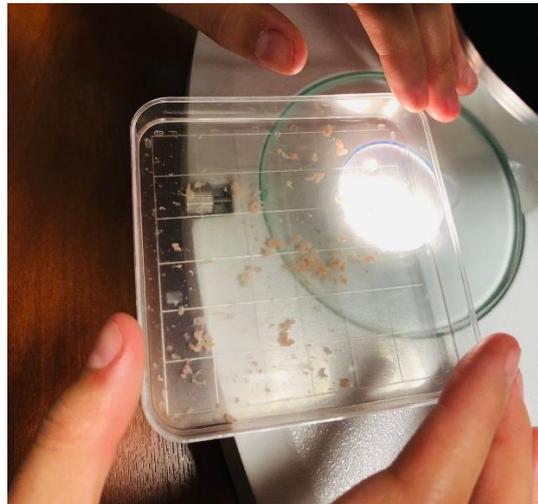
Anexo E. Equipo para la extracción y transporte de los ovarios.



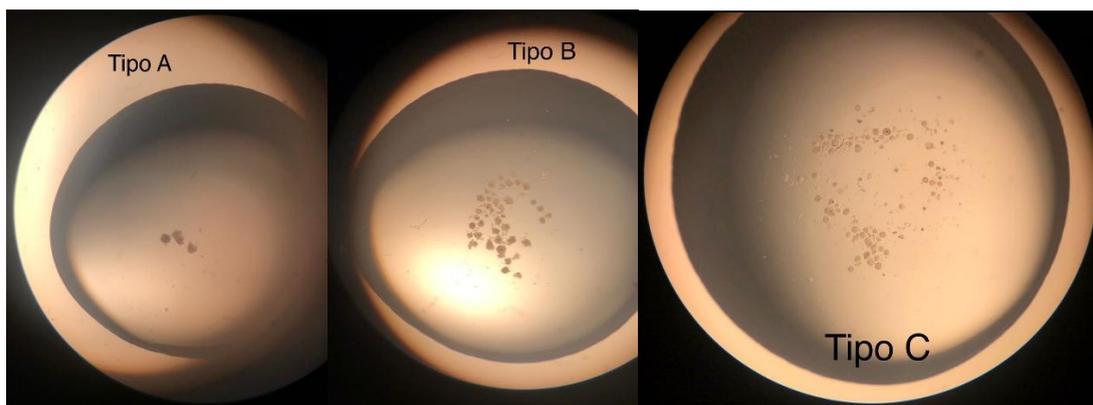
Anexo F. Localización del ovario.



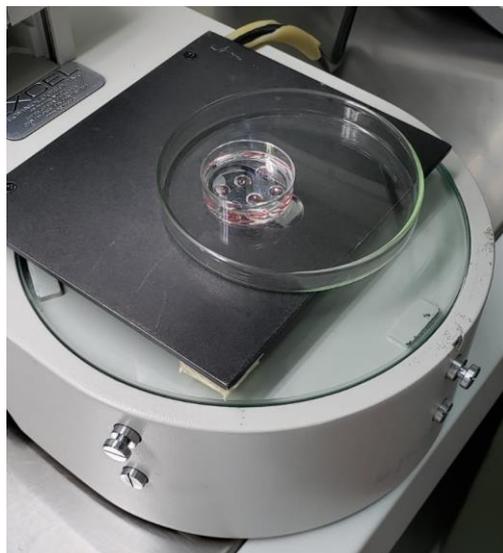
Anexo G. Búsqueda de estructuras (COC's) en placa de búsqueda.



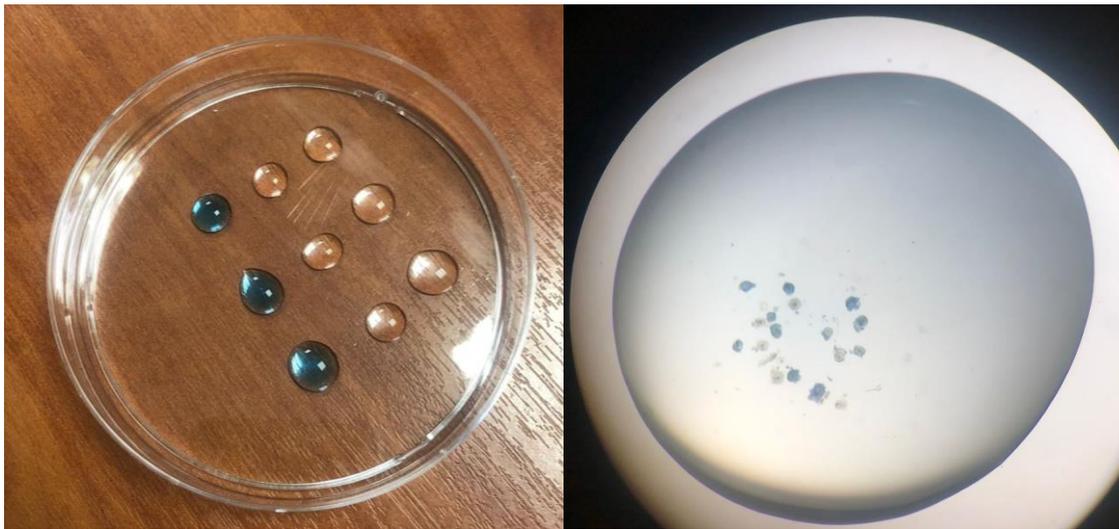
Anexo H. Clasificación de COC's según su calidad.



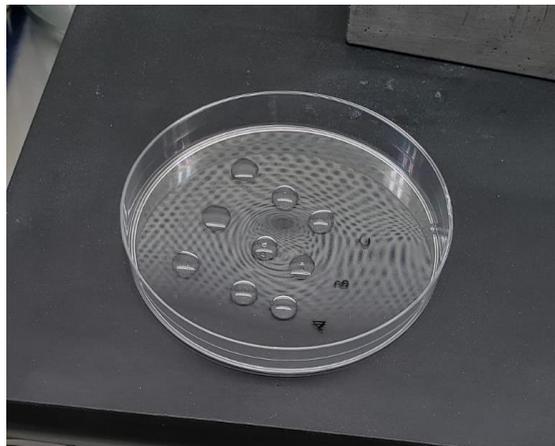
Anexo I. Medio de maduración de COC's.



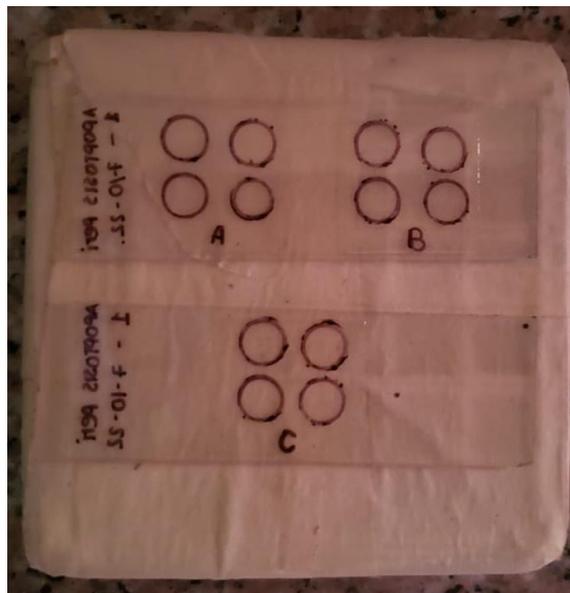
Anexo J. Tinción BCB.



Anexo K. Tinción de Apoptosis.



Anexo L. Placas listas para observar.



Anexo M. Evaluación de placas en el microscopio de epifluorescencia.



Anexo N. Medición del diámetro citoplasmático con el software ImageJ.

