

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### Adición de suero de cobaya en celo a un medio de maduración *in vitro*

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


#### **Autores:**

Paul Geovanny Quizhpi Bueno

Domenica Yamara Zuña Ortuño

#### **Director:**

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

**Cuenca, Ecuador**

2023-09-21

### Resumen

El trabajo fue realizado en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes porcentajes de suero de cobaya en celo (SCC) como suplemento en un medio de maduración *in vitro* (MIV) para ovocitos de cobaya provenientes de ovarios de matadero. Para esto, en primera instancia se sincronizaron 10 cobayas mestizas, el día que presentaron celo se obtuvo suero sanguíneo. En segunda instancia se colectaron ovarios de matadero y de estos se obtuvieron COC's mediante la técnica de Slicing, estos fueron clasificados en tipo A, B y C en base a su morfología. Se valoraron tres tratamientos: T0=testigo (medio de maduración base), T1=medio base + la suplementación del 5% de SCC, T2= medio base + la suplementación del 10% de SCC, T3= medio base + la suplementación del 20% de SCC. Se determinó que la adición del SCC provocó mayor grado de expansión de las células del cúmulo (5%=84,65 ± 3,98), 10% (84,49 ± 3,63) y 20% (87,43 ± 3,98) respecto al T0 (testigo; 69,7 ± 3,63; p<0,005). El porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II en T1 (25,91 ± 2,79), T2 (26,9 ± 2,79) y T3 (32,48 ± 3,06), resultaron más altos en comparación con el T0 (8,65 ± 2,79; p<0,05). En conclusión, los ovocitos que fueron madurados en medio suplementado con SCC presentaron mejor porcentaje de maduración morfológica de las células del cúmulo y de ovocitos que llegaron a metafase II.

*Palabras clave:* reproducción dirigida, ovocitos, hembras sincronizadas, cobayas

### Abstract

The work was carried out in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Cuenca. The objective of this study was to evaluate the effect of different percentages of guinea pig serum in heat (SCC) as a supplement in an in vitro maturation medium (IVM) for guinea pig oocytes from slaughterhouse ovaries. For this, in the first instance, 10 crossbred guinea pigs were synchronized, the day they showed heat, blood serum was obtained. In the second instance, slaughterhouse ovaries were collected and COC's were obtained from these using the Slicing technique, these were classified into type A, B and C based on their morphology. Three treatments were evaluated: T0=control (base maturation medium), T1=base medium + 5% SCC supplementation, T2= base medium + 10% SCC supplementation, T3= base medium + 20% supplementation. % of SCC it was determined that the addition of SCC caused a greater degree of expansion of cumulus cells 5% ( $84.65 \pm 3.98$ ), 10% ( $84.49 \pm 3.63$ ) and 20% ( $87.43 \pm 3.98$ ) with respect to control ( $69.7 \pm 3.63$ ;  $p < 0.005$ ). The percentage of oocytes that reached metaphase II in T1 ( $25.91 \pm 2.79$ ), T2 ( $26.9 \pm 2.79$ ) and T3 ( $32.48 \pm 3.06$ ), were higher compared to the T0 ( $8.65 \pm 2.79$ ;  $p < 0.05$ ). In conclusion, the oocytes that were matured in medium supplemented with SCC presented a better percentage of morphological maturation than cumulus cells and oocytes that reached metaphase II.

*Keywords:* directed reproduction, oocytes, synchronized females, guinea pigs

**Índice de contenido**

Introducción.....	10
2. Objetivo.....	12
2.1. Objetivo general.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Revisión de literatura.....	13
3.1. Origen del cobayo.....	13
3.2. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya.....	13
3.2.1. Vulva.....	13
3.2.2. Vagina.....	13
3.2.3. Útero.....	14
3.2.4. Oviducto.....	14
3.2.5. Ovarios.....	14
3.3. Fisiología reproductiva de la cobaya.....	14
3.3.1. Pubertad.....	15
3.3.2. Ciclo estral.....	15
3.3.3. Ovogénesis y foliculogénesis.....	16
3.4. Biotécnicas reproductivas utilizadas en la cobaya.....	17
3.5. Maduración in vitro de ovocitos de cobaya.....	18
3.5.1. Medios de maduración usados en cobayos.....	18
3.5.2. Suplementación de medio con suero.....	19
3.6. Criterios de clasificación de ovocitos en cobayas.....	19
4. Materiales y Métodos.....	20
4.1. Materiales.....	20
4.1.1. Biológicos.....	20
4.1.2. Físicos.....	20
4.1.3. Químicos.....	20
4.2. Métodos.....	21
4.1.4. Área de estudio.....	21
4.1.5. Unidad experimental.....	22
4.1.6. Diseño experimental.....	22
4.3. Metodología del estudio.....	23

4.3.1.	Sincronización de las cobayas .....	23
4.3.2.	Recolección de suero de cobaya en celo .....	24
4.3.3.	Recolección de ovarios de camal para recuperación de COC´s.....	24
4.3.4.	Preparación de los ovarios.....	24
4.3.5.	Obtención de COC´s de los ovarios de cobaya.....	25
4.3.6.	Clasificación de COC´s .....	25
4.3.7.	Maduración de ovocitos .....	26
4.3.8.	Evaluación de la maduración <i>in vitro</i> .....	26
4.4.	Análisis estadístico.....	27
5.	Resultados y Discusión .....	28
5.1.	Efecto de la adición de SCC sobre la expansión de las células del cúmulo.....	28
5.2.	Expansión de las células del cúmulo en COC`s tipo A, B y C.....	29
5.3.	Interacción entre los diferentes tratamientos y tipos de COC`s con respecto al porcentaje de las células del cúmulo .....	30
5.4.	Porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II .....	31
5.5.	Comparación de la cantidad de ovocitos tipo A, B y C que llegaron a metafase II.....	33
5.6.	Interacción entre tratamientos y tipos de COC`s con respecto al porcentaje de ovocitos que desarrollaron a metafase II.....	34
	Conclusiones .....	36
	Referencias .....	37
	Anexos .....	43

### Índice de figuras

Figura 1: Ubicación del Laboratorio de Biotecnología. Fuente: Directorio Cartográfico de (Google Maps, 2023).....	21
Figura 2: Ubicación de la Granja Comercial de cobayos, Parroquia Baños. Fuente: Directorio Cartográfico de (Google Maps, 2023).....	22
Figura 3: Protocolo de sincronización del celo en cobayas: día 0=inicio del protocolo, aplicación de progesterona oral (Altrenogest) hasta el día 15. MV=valoración diaria de la apertura de la membrana vaginal. ....	24
Figura 4: Clasificación de ovocitos antes del proceso de maduración in vitro.....	25
Figura 5: Grado de expansión de las células del cúmulo post maduración in vitro. Fuente: Machado et al., (2015).....	26
Figura 6: Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los tratamientos T0=testigo. T1=5% de suero de cobaya en celo (SCC). T2=10% de suero de cobaya en celo (SCC). T3=20% de suero de cobaya en celo (SCC). Prueba de Tukey al 5%. *= diferencia estadística entre tratamientos ( $p<0,05$ ). ....	28
Figura 7: Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los COC's de tipo A, Tipo B y Tipo C. Prueba de Tukey al 5%. *= diferencia estadística entre tipo de COC's ( $p<0,05$ ).....	30
Figura 8: Interacción entre tratamiento y tipo de COC's respecto al porcentaje de expansión de las células del cúmulo en T0=testigo. T1=5% de adición de suero de cobaya en celo. T2=10% de adición de suero de cobaya en celo. T3=20% de adición de suero de cobaya en celo. Prueba de Tukey al 5%.....	31
Figura 9: Porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II en los tratamientos T0=testigo. T1=5% de adición de suero de cobaya en celo. T2=10% de adición de suero de cobaya en celo. T3=20% de adición suero de cobaya en celo. Prueba de Tukey al 5%. *=diferencia estadística entre tratamientos. $p<0.05$ .....	32
Figura 10: Porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II en los COC's de tipo A, Tipo B y Tipo C. Prueba de Tukey al 5%. *= diferencia estadística entre tipo de COC's. $p<0.05$ .....	34
Figura 11: Interacción entre tratamiento y tipo de COC's respecto al porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II en T0=testigo. T1=5% de adición de suero de cobaya en celo. T2=10% de adición de suero de cobaya en celo. T3=20% de adición de suero de cobaya en celo. Prueba de Tukey al 5%. $p<0.05$ .....	35

## Lista de abreviaturas

**MIV**= maduración *in vitro*

**SCC**= suero de cobaya en celo

**MV**= membrana vaginal

**COC´S**= complejos cúmulos ovocitos

**CC**= células del cúmulo

**EMS**= suero de yegua en celo

**SOE**= suero de ovina en estro

**SOV**= superovulación

**SFB**= suero fetal bovino

**SVC**= suero de vaca en celo

**FSH**= hormona folículo estimulante

**LH**= hormona luteinizante

**hMG**= hormona menopaúsica humana

**EGF**= factor de crecimiento epidérmico

**Cys**= cisteamina

**LIF**= factor inhibidor de la leucemia

**PIVE**= producción *in vitro* de embriones

**PGF<sub>2α</sub>**= prostaglandinas F<sub>2α</sub>

### **Dedicatorias**

Quiero dedicar a mi familia, quienes han sido mi mayor fuente de apoyo y motivación a lo largo de esta travesía académica.

A mis padres, Rafael y Teresa, les agradezco profundamente por su amor incondicional, su constante aliento y su sacrificio para brindarme la educación que me ha permitido llegar hasta este punto. Su ejemplo de perseverancia y dedicación ha sido una inspiración para mí.

A mis hermanos, Juan Pablo y Sandra Isabel, les agradezco por su comprensión y por estar siempre dispuestos a escucharme y brindarme su apoyo. Sus palabras de ánimo y sus gestos de cariño han sido un alivio en los momentos de mayor desafío.

A mi querida amiga y compañera de tesis Doménica, por su amistad, su apoyo y dedicación para culminar este trabajo.

Paul Quizhpi.

Con mucho cariño dedico este logro a mis Padres Marco y Betty, por ser el motor de mis sueños, quienes nunca me soltaron y estuvieron con las palabras adecuadas y los abrazos necesarios que me alentaron en cada momento de esta travesía.

A mi hijo Joaquín mi motivo de seguir esforzándome día a día y a Andrés por ser mi empujón diario y estar presente en este proceso siendo mi apoyo incondicional.

A mis hermanos Andrés, Fanny, Paul, Gaby y mis sobrinos Daniela, Juan, Jeremías, Isaí y Valentina que siempre fueron parte del motivo de cumplir mis metas, gracias por darme la mano y una sonrisa cada que lo necesité.

Domenica Zuña



### Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios, por haberme guiado y darme la fuerza para cumplir esta meta, a mi familia y amigos por el apoyo incondicional en todo momento, por creer en mí a lo largo de esta travesía académica. Su apoyo y palabras de aliento fueron un impulso constante para seguir adelante.

Le agradezco a mi director de tesis. Dr. Luis Ayala por su dedicación, apoyo y motivación constante durante todo el proceso. Sus conocimientos y consejos fueron fundamentales para el desarrollo y éxito de este proyecto.

Por último, expresar mi gratitud a la facultad y sus docentes que han sido parte de mi camino universitario, por transmitirme los conocimientos necesarios con vocación para hoy poder estar aquí.

Paul Quizhpi.

Gracias a Dios por guiarme, darme el aliento y ser mi soporte durante todo momento, a mis padres por el esfuerzo que pusieron en mí su amor incondicional y no soltarme, a mi familia por estar siempre pendientes, gracias a mis amigos por hacer este trayecto más llevadero en especial a Genesis y Diego quienes han sido un pequeño soporte. Agradezco a Paul mi compañero de tesis y amigo por su apoyo y ser un buen compañero. Además, quiero dar un agradecimiento especial a nuestro tutor de tesis Dr. Luis Ayala quien es un gran maestro y tutor, gracias por su paciencia, dedicación y aliento.

Domenica Zuña

## Introducción

El cobayo (*Cavia porcellus*) es un roedor originario de América del Sur, su crianza se da en forma artesanal para aprovechar su carne (Flores et al., 2017), que posee alto valor nutricional, cada 100 g de carne aporta 19% de proteínas, 1,6% de grasas, 0,1% de carbohidratos y 1,2% de minerales; además de vitaminas como tiamina, niacina y riboflavina entre otros; por lo que, en la actualidad su consumo tiene alta acogida (Soto, 2021). La producción de cobayos se ha extendido a otros países como Malasia y China donde existen aproximadamente 950.000 explotaciones familiares dedicadas a la crianza de cobayos y en el Ecuador más de 710.000 familias realizan dicha actividad (Chachipanta, 2019).

Además, el cobayo representa un modelo excelente para el estudio de la reproducción en la especie humana por poseer un ciclo estral completo a diferencia de la rata y el ratón (Suzuki et al., 2003). Sin embargo, el uso del cobayo, tanto para fines comerciales como experimentales tienen una gran limitante, si es comparado con otras especies de roedores utilizados en laboratorio, como los ratones y ratas, su camada es pequeña y solo se pueden obtener pocos embriones de pre-implantación de una hembra (Dorsch et al., 2008).

En otras especies para incrementar el número de la descendencia se han implementado biotécnicas reproductivas como la producción de embriones *in vitro* (PIVE), técnica que está estandarizada en la especie bovina (Ayala et al., 2019). La PIVE tiene tres fases: la maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV), en cada una de estas se utilizan medios establecidos y estandarizados de acuerdo con los requerimientos de cada una de las especies (Zhinin et al., 2022).

En la cobaya se ha descrito que la maduración *in vitro* depende principalmente del medio de cultivo y de la calidad de los ovocitos utilizados (Zhinin, 2022). En este contexto Yanagimachi, (1974) describieron los resultados de un proceso de maduración *in vitro* (MIV) de los complejos cúmulo-ovocitos de cobayas, utilizando el 20% de suero fetal bovino, llegando a obtener un 65% de ovocitos en metafase II. En otro trabajo se utilizó TCM 199, suplementado con FSH ovina; LH ovina; estradiol y antibióticos y se determinaron porcentajes de maduración de ovocitos de cobaya entre el 6 al 61,8% (Wang et al., 2019).

Los medios de maduración deben contar con fuentes de proteína como el suero fetal bovino o el líquido folicular, teniendo como precepto que el suero de una hembra en celo es el resultado del proceso de coagulación rica en proteínas (Mucci et al., 2006); además, el suero de una hembra en celo, puede ser utilizado como una fuente de proteína en los medios de

cultivo, al momento de realizar maduración de ovocitos, debido a su capacidad de protección sobre sustancias tóxicas como metales pesados en el cultivo, este suplemento logra reducir la tensión superficial (Guevara, 2009).

Otros beneficios que justifican su utilización es la gran cantidad de hormonas presentes en el suero (resaltando la LH) y el factor transformante de crecimiento (TGF), o el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1) que son encargados de reducir la incidencia de apoptosis y aumentar la cantidad de células embrionarias (Ferreira et al., 2008). Sin embargo, la composición del suero va a depender del momento del ciclo estral y del tipo de donadora de la cual se extraiga el mismo (Mucci et al., 2006).

Estudios recientes analizaron el uso de diferentes tipos de sueros; de yegua en estro, de neonato pre-calostroal, de vaca en estro, y el suero fetal bovino, llegando a determinar que el de yegua en estro permitió obtener un 88% de maduración ovocitaria bovina, atribuyendo estos resultados a la duración del estro en la yegua (5-7 días) y a la vida media larga de la LH (Ferreira et al., 2008). Otros autores que obtuvieron buenos resultados en la maduración de ovocitos de bovino al adicionar suero de hembra en estro (vaca), señalaron que esto se debe al alto contenido de LH, el cual es la responsable de romper la interacción cúmulo-ovocito, permitiendo iniciar la maduración (Ocaña et al., 1999).

Por otra parte, Younis et al. (1989), describieron un mayor porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos al usar suero de vaca en celo (SVC) como suplemento en el medio de maduración en comparación con suero fetal bovino (SFB). De igual manera, Larocca et al. (1966) al valorar la influencia de líquido folicular (LF) y SVC en la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de bovino, observaron porcentajes de maduración de 92,2% al utilizar LF, un 89,2% de SVC y el 88,2% para el tratamiento control.

Por lo antes expuesto, consideramos que la adición de suero de cobaya en celo influiría en el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos de estos roedores.

## Objetivo

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes porcentajes de suero de cobaya en celo como suplemento a un medio de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya provenientes de ovarios de matadero.

### 2.2. Objetivos específicos

- Validar un protocolo para la obtención de suero de cobaya en estro.
- Valorar el efecto de tres porcentajes de suero de cobaya en estro en la maduración *in vitro* de ovocitos de la misma especie.

## Revisión de literatura

### 3.1. Origen del cobayo

Los roedores son muy utilizados en los laboratorios con fines de investigación debido a que el cobayo (*Cavia porcellus*) ha sido un animal de laboratorio desde principios del siglo XX, especialmente utilizado en muchos estudios de biología, genética y reproducción (Wing, 1986). La primera evidencia arqueológica de la existencia del cobayo fue encontrada en Perú y Colombia hace 9000 años, y el animal ha sido domesticado para su alimentación y usos espirituales aproximadamente hace 4500–7000 años (Wing, 1986). El cobayo es un mamífero roedor originario de la Cordillera de los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, donde ha tenido una buena relación con el pueblo preincaico, como fuente de alimento alto en proteína y bajo en grasa o como animal vinculado a tradiciones que se mantienen hasta la actualidad (Avilés et al., 2014).

Sin embargo, la cría de cuyes nativos se considera una raza de bajo rendimiento y por esta razón está siendo reemplazada gradualmente por líneas más productivas, lo que se demuestra en los sistemas comerciales de reproducción (Avilés, 2016), dando lugar a una reducción drástica en la población local de cobayos, lo que resultó en la pérdida de este material genético único en el mundo (Avilés et al., 2014).

### 3.2. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya

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

#### 3.2.1. Vulva

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

#### 3.2.2. Vagina

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

### 3.2.3. Útero

Esta especie presenta un útero bicornes de color rosado, en forma de Y, estructurado por dos cuernos, un cuerpo y un cuello uterino (Clemons & Seeman, 2011). El cuerpo uterino mide 12 mm de longitud y 10 mm de diámetro, y va disminuyendo de craneal a caudal, presenta un ligamento intercornual bien desarrollado. Los cuernos uterinos se unen a los cuellos uterinos los cuales presentan una serie de pequeñas crestas mucosas que se dirigen caudo-medialmente por sus paredes laterales hasta la línea media ventral, mide 25 mm de largo y 14 mm de diámetro cranealmente y 5 mm de diámetro en su extremo dorsal (Wagner et al., 1976). Se denomina endometrio a estas crestas mucosas que se encargan de secretar sustancias que nutren al huevo o cigoto (Solís & Chávez, 2015).

### 3.2.4. Oviducto

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

### 3.2.5. Ovarios

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

## 3.3. Fisiología reproductiva de la cobaya

El cobayo es particularmente adecuado para estudios de fisiología reproductiva debido a su fácil manejo, signos distintivos de estro y comportamiento relacionado claramente con cambios físicos en el tracto reproductivo (Young et al., 1935). De todos los pequeños mamíferos de laboratorio, el sistema reproductivo del cobayo se parece más al humano en que tiene un ciclo largo, ovula espontáneamente, y tiene un cuerpo lúteo secretor activamente (Reed & Hounslow, 1971). En condiciones de laboratorio, los cuyes domésticos son

reproductores poliestros, no estacionales, aunque se han informado ligeras variaciones estacionales en el rendimiento reproductivo (Wagner et al., 1976).

### 3.3.1. Pubertad

Las hembras alcanzan la pubertad entre los 55 y 70 días de edad; sin embargo, este rango podría ser menor dependiendo de la alimentación, la cual debe ser de alta calidad por lo tanto una alimentación inadecuada, podría retardar la presencia de la pubertad (Solís & Chávez, 2015). El peso corporal en la pubertad es un parámetro más constante que la edad, debido a que existe relación entre la tasa de crecimiento y la edad de la pubertad, por lo tanto, podría haber una interacción entre los centros hipotalámicos que controlan el peso corporal y el inicio de la pubertad (Mills & May, 1971).

### 3.3.2. Ciclo estral

El ciclo estral normal en la cobaya tiene una duración media de  $16,1 \pm 0,2$  días con un rango de 13 a 22 días (Shi et al., 2000). El proestro dura de 1 a 1,5 días, estro de 8 a 24 horas, metaestro de 1 a 1,5 días y diestro de 13 a 15 días (Kuhnel & Mendoza, 1992). En condiciones de laboratorio, los cobayos son reproductores poliestros, no estacionales, aunque se han informado ligeras variaciones estacionales en el desempeño reproductivo (Wagner et al., 1976). Almeida, (2016) establece que estas fases se caracterizan por cambios hormonales cíclicos y algunos cambios morfológicos. El período más importante desde un punto de vista práctico y útil es el estro o celo. El estro se define como el período de receptibilidad sexual de la hembra en los animales domésticos. Este diagnóstico es realizado por el macho y se debe en gran parte a un cambio repentino en los niveles hormonales, especialmente de estrógeno producido por el crecimiento de los folículos, que dura un promedio de 12 a 18 horas.

El desarrollo del folículo comienza el día después de la ovulación (día 0) y consta de dos oleadas. Los folículos más grandes de la primera ola alcanzan su diámetro máximo (500-750  $\mu\text{m}$ ) en los días 10-11 del ciclo, pero se atrofian debido a un aumento en los niveles de progesterona (P4) y una retroalimentación negativa que provoca la supresión hormonal por el cuerpo lúteo. Luego la desaparición del cuerpo lúteo permite el desarrollo de un segundo conjunto de folículos antes de la ovulación. Esta fase dura unos 6 a 7 días; en el que se reclutan folículos pequeños y se eliminan de 3 a 5 folículos más grandes en el día 10 (Harris y Foreman, 1984). Los niveles de P4 luego caen bruscamente después del día 12 y los niveles de LH aumentan notablemente entre los días 13 y 15 para estimular la ovulación. Finalmente, la ovulación ocurre al final de la segunda ola (día 17 del ciclo) (Logothetopoulos et al., 1995).

Este comportamiento se considera como verdadero celo que, desde el punto de vista endocrino, establece el patrón fisiológico de la hembra. Sin embargo, desde un punto de vista diferente y más realista, el estro se caracteriza por una serie de signos o indicadores muy distintos del comportamiento animal, como inquietud, extensión de la espalda y elevación de la pelvis, flujo de mucosidad cristalina que se adhiere a la cola y la piel de la espalda (Pignon & Mayer, 2021).

### 3.3.3. Ovogénesis y foliculogénesis

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

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

La foliculogénesis es un proceso altamente selectivo donde usualmente solo un folículo asume dominancia y el destino del resto de los folículos es la atresia mediada por apoptosis, la etapa en que se forma el antro folicular, es independiente de la hormona folículo estimulante (FSH) y se ha confirmado que la fase inicial de la foliculogénesis es estimulada por otros factores, mientras que el folículo antral requiere de gonadotropinas (Villamarin, 2016). El desarrollo de los folículos ocurre en dos oleadas en el cobayo. Los folículos más grandes de la primera ola alcanzan su diámetro máximo en los días 10 a 11 del ciclo (final de la ola), experimentando atresia, debido a la supresión de LH por retroalimentación negativa de la progesterona del cuerpo lúteo. La segunda ola inicia al día 12 del ciclo, se produce el reclutamiento y la selección de los folículos más grandes alrededor del día 13, a menudo se seleccionan de tres a cinco folículos ovulatorios ocurriendo la ovulación al final de la segunda ola (Día 17 del ciclo). (Sadeu et al., 2007).



### 3.4. Biotécnicas reproductivas utilizadas en la cobaya

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

Existen varios métodos en los que se utilizan directamente hormonas o productos sintéticos, que cumplen funciones similares a las hormonas que controlan normalmente el ciclo sexual de los animales (Caravaca et al., 2005). Se ha remplazado la progesterona natural debido a que tiene una vida media de 3 a 5 minutos, por lo que se degrada rápidamente en el organismo del animal. Los progestágenos son productos sintéticos que tienen una función análoga, pero son mucho más activos por lo tanto su aplicación será en dosis menores y sin efectos secundarios (Caravaca et al., 2005). Un fármaco de este grupo es el altrenogest el cual es seguro y eficaz, respeta el bienestar animal en cobayos, y consiste en un tratamiento de 15 días con 0,22mg/kg por vía oral, induciendo la ovulación en 4 a 5 días (Grégoire et al., 2012). Esto mediante la inhibición de la función ovárica, bloqueando al centro cíclico que imposibilita la secreción de factores liberadores de GnRH, gonadotropinas, y así inhibe la ovulación y las manifestaciones de celo. Por lo tanto, al terminar su administración, se reestablece la función sexual, mediante la liberación de FSH y LH, y finalmente la aparición de celo en la hembra (Caravaca et al., 2005). También se ha utilizado la gonadotropina coriónica equina en un momento específico del ciclo sexual, la cual induce la hiperovulación en cobayos cuyo ciclo sexual está sincronizado por la implantación a largo plazo de progesterona (Kosaka & Takahashi, 1989).

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

- Recolección de COC's en mataderos

La obtención de ovocitos de animales en el matadero es una de las formas más habituales de recolectar COCs. Para el ganado, los ovarios recolectados se transportaron en un termo que contenía solución salina (NaCl al 0,9 %) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Alvarado, 2017). Para preservar los ovarios durante el sacrificio en el matadero y el transporte al laboratorio, se deben almacenar entre 35° a 37°C, lo cual es importante porque la maduración *in vitro* (MIV) se ve perjudicada por debajo de este valor en no más de 3 horas (Espín, 2018).

### **3.5. Maduración in vitro de ovocitos de cobaya**

La maduración *in vitro* implica la transformación de un ovocito detenido en metafase II, altamente polarizado y un pequeño cuerpo polar que consigue la haploidía que a su vez retienen los componentes maternos. Consiste en la división asimétrica de ovocitos mediante la polarización (Maro y Verlhac, 2002).

Dentro de la maduración, los ovocitos se desarrollan a través de varios cambios a nivel del núcleo y citoplasma hasta la etapa de blastocisto, en donde la tasa de blastocistos obtenidos está directamente relacionada con el diámetro del folículo del que se recuperan los ovocitos. Esta técnica reproductiva es la clave para lograr una eficiencia en los programas de producción de embriones *in vitro* (Presicce, 2020).

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

#### **3.5.1. Medios de maduración usados en cobayos**

Las condiciones de cultivo en la MIV son de gran importancia en la maduración ovocitaria, tasa de fecundación y la posterior capacidad de desarrollo de los embriones, por tal razón existen diversos estudios donde el objetivo es mejorar el ambiente como, por ejemplo, la suplementación de ciertas sustancias al medio.

Estudios realizados por (Wang et al. 2019), determinaron que la maduración con cisteamina (Cys) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF), pero no con Y27632, en un medio de maduración que contiene LH y FSH mejora la eficiencia de maduración de los ovocitos de cobaya. Otro estudio concluye que la combinación de 50ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 100ng/ml de factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) Y 10% de

suero fetal bovino (FCS) resultaron ser un medio adecuado para el sistema de maduración *in vitro* en ovocitos de cobaya (Cañón et al., 2016).

### **3.5.2. Suplementación de medio con suero**

El suero que es la parte líquida resultante de la coagulación sanguínea, se considera un compuesto variable e indefinido donde su composición química depende del tipo y estado del donante, su uso como suplemento a un medio de maduración se justifica por el aporte como proteína y de ciertos factores de crecimiento y hormonas (Mucci et al., 2006).

### **3.6. Criterios de clasificación de ovocitos en cobayas**

Para conseguir una MIV efectiva es importante considerar la clasificación de ovocitos óptimos, mediante criterios específicos que debe cumplir la célula ovocitaria. Se inicia con la obtención de ovarios de cobayas, seguido de la aplicación de un protocolo que garantice la viabilidad de los ovocitos obtenidos por un método de aspiración y slicing, para continuar con la clasificación, la cual según (Wang et al., 2019), determinó 3 tipos en ovocitos: los tipos I, con 4 o más capas de células del cúmulo, tipo II con 1 a 3 capas de células del cúmulo y los tipos III con algunas células de cúmulo o desnudos.

## Materiales y Métodos

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Biológicos

- Cobayas
- Suero de cobaya en celo
- Ovarios de matadero
- Progesterona (Regumate®, MSD animal health, Igoville, Francia)

#### 4.1.2. Físicos

- Equipo de disección
- Envases para toma de muestras (termo)
- Guantes nitrilo
- Termo de transporte
- Solución salina al 0,9%
- Bisturí
- Guantes de látex
- Baño maría
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Estereoscopio (SMZ745, Nikon, Japón)
- Micropipetas de volumen variable (1 a 20  $\mu$ l, 20 a 200  $\mu$ l y 100 a 1000  $\mu$ l)
- Microscopio de epifluorescencia (Eclipse Ci-E epi-fluorescence set, Nikon, Japón)
- Placas petri 35 mm
- Placa de búsqueda 100mm
- Puntas de pipeta variables
- Papel secante
- Tubos cónicos de 15 ml
- Centrifuga

#### 4.1.3. Químicos

- Esmalte de uñas
- Glicerol (Sigma G-5150)
- Glutaraldehído al 25% (Sigma B-5882)
- Hoechst 33342 (Sigma B-2261)

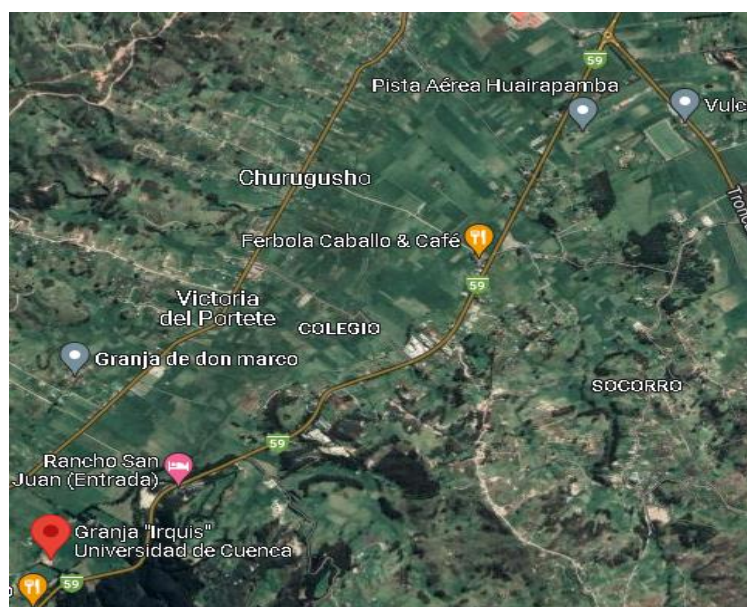
- TCM-199 (Sigma M-4530)
- PVA (Sigma P-8136)
- NaHCO<sub>3</sub> (Sigma S-5761)
- Hepes (Sigma H-6147)
- Glutamina (Sigma G-8540)
- Penicilina (Sigma P-3032)
- Estreptomicina (Sigma S-9137)

## 4.2. Métodos

### 4.1.4. Área de estudio

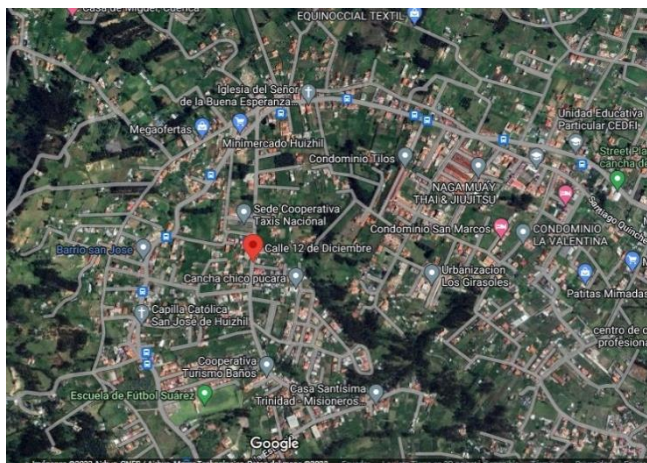
El proyecto fue realizado en dos lugares:

El proceso de colecta de complejos cúmulo ovocitos y el proceso de maduración in vitro se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicado en la Granja de Irquis, área que se encuentra en la jurisdicción política de la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete, a 20 km de la ciudad de Cuenca. Latitud sur 4'48.34"S y Longitud Oeste 79° 4'30.12"O. Altitud de 2.671 m.s.n.m y temperaturas que oscilan entre 7 y 12 ° C respectivamente.



**Figura 1:** Ubicación del Laboratorio de Biotecnología. **Fuente:** Directorio Cartográfico de (Google Maps, 2023)

La sincronización de las cobayas para obtener suero de cobaya en celo fue ejecutada en la granja comercial de cobayos ubicada en el barrio el Paraíso de la parroquia Baños perteneciente a la provincia del Azuay. Latitud sur 2°54'54.2"S y Longitud Oeste 79° 03'51.2"O.



**Figura 2:** Ubicación de la Granja Comercial de cobayos, Parroquia Baños. **Fuente:** Directorio Cartográfico de (Google Maps, 2023)

#### 4.1.5. Unidad experimental

En primera instancia se sincronizaron 10 cobayas de raza mestiza, edad entre 4-6 meses, peso entre 1000-1200 gramos, multíparas. El día del celo se recuperó 1 ml de sangre por punción cardíaca.

En una segunda etapa del experimento, se recolectaron ovarios de cobayas del centro de faenamiento privado “Peñalosa Jaramillo” ubicado en la ciudad de Cuenca. De cada ovario se recolectaron los COC´s, los cuales fueron clasificados y puestos en un proceso de maduración *in vitro*.

#### 4.1.6. Diseño experimental

La primera parte del estudio fue descriptivo y se validó un protocolo para la obtención de suero de cobaya en celo (SCC). En la segunda fase se implementó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo bi-factorial (%SCC y Tipos de COC's), en el cual se evaluó el efecto de la suplementación de SCC en porcentajes del 5, 10 y 20% en el medio convencional de maduración sobre el porcentaje de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de cobaya.



Se establecieron 12 tratamientos:

- T1A= 100 COC´s tipo A en medio de maduración convencional + 5% de SCC
- T1B= 100 COC´s tipo B en medio de maduración convencional + 5% de SCC
- T1C= 100 COC´s tipo C en medio de maduración convencional + 5% de SCC
- T2A= 100 COC´s tipo A en medio de maduración convencional + 10% de SCC
- T2B= 100 COC´s tipo B en medio de maduración convencional + 10% de SCC
- T2C= 100 COC´s tipo C en medio de maduración convencional + 10% de SCC
- T3A= 100 COC´s tipo A en medio de maduración convencional + 20% de SCC
- T3B= 100 COC´s tipo B en medio de maduración convencional + 20% de SCC
- T3C= 100 COC´s tipo C en medio de maduración convencional + 20% de SCC
- Testigo A= 100 COC´s tipo A en medio de maduración convencional
- Testigo B= 100 COC´s tipo B en medio de maduración convencional
- Testigo C= 100 COC´s tipo C en medio de maduración convencional

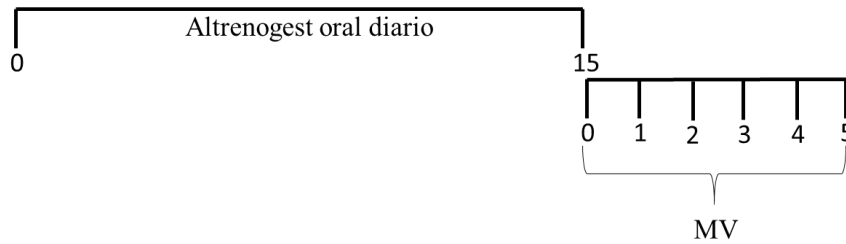
VARIABLES DEPENDIENTES:

- Porcentaje de maduración morfológica de las células del cúmulo al finalizar la MIV.
- Porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II al finalizar la MIV.

### 4.3. Metodología del estudio

#### 4.3.1. Sincronización de las cobayas

La sincronización del celo de las cobayas se realizó mediante la aplicación de 0,22 mg/kg de peso vivo de un progestágeno sintético oral, Altrenogest (Regumate®, MSD Animal Health, Francia), por 15 días consecutivos. La hormona fue administrada mediante una pipeta automática regulable, según la metodología descrita por Grégoire et al. (2012). A partir del día 15 cada 24 horas se observó la membrana vaginal, y cuando esta mostró un 50% de apertura se consideró a la cobaya en celo (**Figura 3**).



**Figura 3:** Protocolo de sincronización del celo en cobayas: día 0=inicio del protocolo, aplicación de progesterona oral (Altrenogest) hasta el día 15. MV=valoración diaria de la apertura de la membrana vaginal.

#### 4.3.2. Recolección de suero de cobaya en celo

El día que las cobayas presentaron celo fueron anestesiadas según el procedimiento descrito por Ayala et al. (2017), con una mezcla de Zolazepam y Tiletamina (Zoletil 50®), dosis de 50 mg/kg vía subcutánea). Luego, con una aguja vacutainer 21G x 25 mm en ángulo de 30° se realizó punción cardiaca en el espacio entre la tercera y cuarta costilla, parte proximal al esternón lado izquierdo del animal. Las muestras fueron centrifugadas a 2.500 rpm x 15 min., se tomó el sobrenadante y se filtró a través de membranas de 0,22µm; a continuación, se elaboraron alícuotas de 100 µl que fueron almacenadas a -20°C hasta el día de uso. La inactivación del SCC se realizó el día del uso a 56°C durante 30 minutos según lo propuesto por Yanagimachi (1974).

#### 4.3.3. Recolección de ovarios de camal para recuperación de COC's

Los ovarios fueron colectados del centro de faenamiento privado "Peñalosa Jaramillo" ubicado en la ciudad de Cuenca (Matadero bajo inspección oficial). Las maniobras fueron realizadas una vez por semana hasta completar 100 COC's por cada tipo (A, B y C) de cada tratamiento. Los ovarios se trasladaron en solución fisiológica (0,9% wt/v) a temperatura de 35°C hasta el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, localizado en la Granja Irquis, en un tiempo no mayor a dos horas.

#### 4.3.4. Preparación de los ovarios

En el laboratorio los ovarios fueron separados del resto de tejidos anexos, luego lavados en solución fisiológica atemperada (35°C) por tres ocasiones hasta quedar completamente limpios, luego se colocaron en la platina térmica (35°) hasta su procesamiento.



#### 4.3.5. Obtención de COC's de los ovarios de cobaya

Para la recuperación de los COC's se utilizó la técnica de Slicing (cortes), descrita por Calvo et al. (2015), con ciertas modificaciones. Brevemente: los ovarios fueron colocados en una caja cuadrículada de 100 mm, a la cual se agregó 1 ml de lactato suplementado con polivinilalcohol. Posteriormente, se realizaron cortes finos longitudinales y transversales a cada lado del ovario finalmente se adicionó 5ml del medio de manipulación a la caja de búsqueda.

#### 4.3.6. Clasificación de COC's

La valoración de los COC's se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (SMZ 745, Nikon, Japón). El criterio de clasificación de los COC's se basó en aspectos morfológicos de las células del cúmulo, homogeneidad del citoplasma del ovocito e integridad de la zona pelúcida, tal como lo describió Wang et al. (2019) con ciertas modificaciones. Brevemente, los ovocitos fueron clasificados en 3 categorías: tipo A: ovocitos que presentaron cuatro o más capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo y la zona pelúcida íntegra; tipo B: ovocitos que poseían de uno a tres capas de células del cúmulo, citoplasma heterogéneo y zona pelúcida íntegra; y tipo C: ovocitos desnudos o que tuvieran pocas células del cúmulo citoplasma heterogéneo y zona pelúcida afectada (**Figura 4**). Una vez seleccionados los COC's, estos fueron lavados dos veces en el medio de maduración.



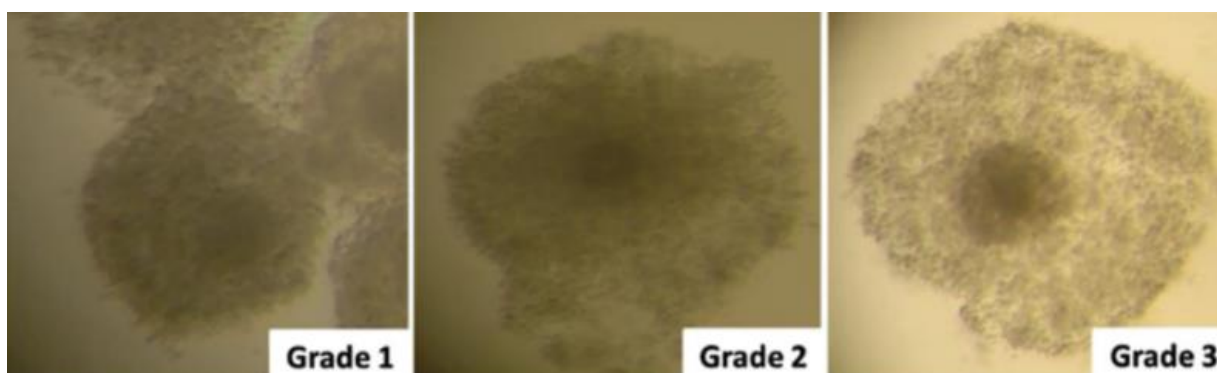
**Figura 4:** Clasificación de ovocitos antes del proceso de maduración *in vitro*

#### 4.3.7. Maduración de ovocitos

Los COC's de tipo A, B y C fueron asignados aleatoriamente a cada tratamiento propuesto, los cuales tuvieron como medio base el usado por Lopes et al. (2019) con ciertas variaciones. Brevemente, el medio contenía TCM-199 (con sales de Earle's) suplementado con 26,2 mM de bicarbonato de sodio, 0,2 mM de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 10 IU/ml de eCG, 10UI/ml de hCG, 100 µM de cisteamina (Sigma M-9768) y 1000 IU/ml de factor inhibidor de la leucemia (Sigma L-5158). La maduración *in vitro* (MIV) fue realizada por 24 horas bajo condiciones de cultivo controladas (93% de humedad, 5% CO<sub>2</sub>, 38,8 °C).

#### 4.3.8. Evaluación de la maduración *in vitro*

Después de la MIV los COC's fueron evaluados mediante estereomicroscopía, observando si estos presentaban expansión de las células del cúmulo, según lo descrito por Machado et al. (2015). Brevemente se usaron tres categorías, grado 1: expansión moderada o nula de las células del cúmulo (CeC), grado 2: expansión parcial (CeC), grado 3: expansión completa o casi completa de las CeC (**Figura 5**).



**Figura 5:** Grado de expansión de las células del cúmulo post maduración *in vitro*. **Fuente:** Machado et al., (2015)

La determinación del estado de maduración nuclear, se realizó con la metodología propuesta por Sena et al. (2019). Brevemente, los COC's de cada tratamiento fueron desnudados mediante pipeteo en gotas de 50 µg de hialuronidasa antes de la fijación. Luego los COC's fueron incubados en glutaraldehído (0,5% de DPBS) por 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Inmediatamente los COC's fueron lavados en Lactato suplementado con PVA (Polivinilalcohol) por 5 minutos y teñidos con el flurocromo Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma B-2261) por 15 minutos en un cuarto oscuro. El medio de montaje usado fue DPBS con glicerol

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

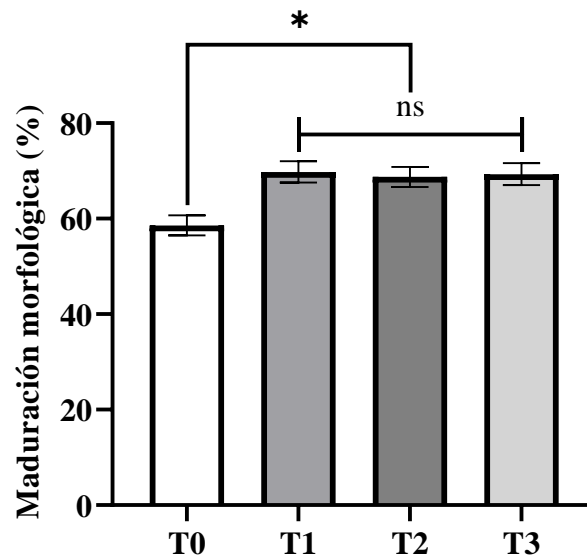
#### **4.4. Análisis estadístico.**

Los datos fueron tabulados en excel y el análisis estadístico se ejecutó mediante el programa estadístico Infostat. La normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov. Se aplicó LOG 10 para a los porcentajes de maduración de las células del cúmulo y maduración nuclear. Luego se aplicó un Análisis de Varianza y para comparar las medias se utilizó la prueba de Tukey al 5%. Se valoró la relación e interacción del tratamiento y los tipos de COC's frente al porcentaje de maduración morfológica y nuclear.

## Resultados y Discusión

### 5.1. Efecto de la adición de SCC sobre la expansión de las células del cúmulo

En el presente estudio, al valorar el porcentaje de maduración morfológica se observó que los tratamientos T1=  $69,8 \pm 2,23$ ; T2 =  $68,8 \pm 2,1$  y T3=  $69,3 \pm 2,3\%$  (**Figura 6**) que recibieron la adición de SCC presentaron mayor porcentaje de expansión de las células del cúmulo (CC), pero sin llegar a ser estos valores significativos entre ellos ( $p>0,05$ ). Sin embargo, al comparar con el testigo=T0 ( $58,6 \pm 2,1$ ) se observó que este fue menos efectivo en el proceso de MIV, comparado con los tres tratamientos ( $p<0,05$ ). Es decir, la adición de SCC en diferentes porcentajes (5%, 10% y 20%) mejoró la capacidad de expansión de células del cúmulo de los COC`s (**Figura 6**).



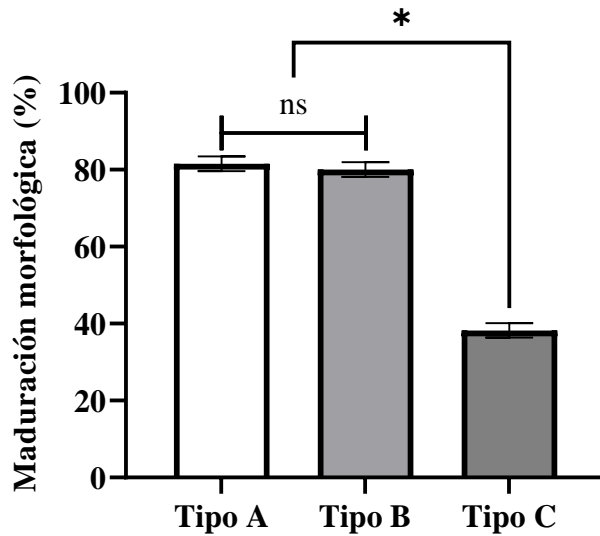
**Figura 6:** Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los tratamientos T0=testigo. T1=5% de suero de cobaya en celo (SCC). T2=10% de suero de cobaya en celo (SCC). T3=20% de suero de cobaya en celo (SCC). Prueba de Tukey al 5%. \*= diferencia estadística entre tratamientos ( $p<0,05$ ).

Según trabajos encontrados como el de Chávez, (2013) manifestó que la adición de suero de yegua en celo (EMS, por sus siglas en ingles) en un medio de maduración convencional basado en TCM 199 presentó mejor porcentaje de maduración de ovocitos, concordando con lo descrito en los trabajos de Shabpareh et al. (1993); Dell'Aquilla et al. (1995) quienes manifestaron que el uso de EMS tanto en un medio de manipulación como maduración, mejoró el porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos de yegua.

Estos resultados estarían ligados al hecho de que el suero actúa como fuente de energía, produce osmorregulación facilitando el transporte de fluidos a través de la membrana favoreciendo la maduración y desarrollo embrionario (Carolan et al., 1995), es un estabilizador de pH y posee numerosos antioxidantes actuando como quelantes de iones de metales pesados, surfactante en la barrera de pH y reaccionado con especies oxígeno dependientes (Santa Cruz et al., 2014). Además, posee factores de crecimiento como el factor transformante de crecimiento (TGF) o el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1) que son los encargados de reducir la incidencia de apoptosis (Ferreira et al., 2008). Y hormonas como la LH la cual es responsable de romper la interacción COC-ovocito permitiendo iniciar la maduración (Ocaña et al., 1999). Estos elementos del suero favorecen la expansión de las células del cúmulo y la producción de factores que promueven el reinicio de la meiosis (Santa Cruz et al., 2014).

## 5.2. Expansión de las células del cúmulo en COC`s tipo A, B y C

De manera general, la evaluación del porcentaje de expansión de células del cúmulo de los COC`s clasificados por categorías A; B y C, se demostró que los ovocitos de tipo A expandieron sus células en un  $81,6 \pm 1,90\%$  y los de tipo B ( $80 \pm 1,9\%$ ; **Figura 7**,  $p > 0,05$ ) presentando un porcentaje de maduración morfológica mayor que los COC`s tipo C ( $38,2 \pm 1,86\%$ ; **Figura 7**,  $p < 0,05$ ). Esta particularidad estaría relacionada a la cantidad y funcionalidad de las células del cúmulo presentes en los ovocitos tipo A y B, puesto que se ha descrito que dichas células son las encargadas de proporcionar nutrientes necesarios para el desarrollo del ovocito, a través de la interacción de las mismas con el ovocito existiendo comunicación intercelular vía uniones Gap, las cuales permiten el paso de moléculas desde el ambiente folicular hasta el ovocito y viceversa así como por la liberación conjunta de glicoproteínas y otros factores (Fair, 2003). Es importante mencionar que un pico pre ovulatorio de LH provoca la pérdida de comunicación intercelular entre el ovocito y las células de la corona radiada debido a la ruptura de las uniones Gap provocando el deceso de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) desencadenando el reinicio de la meiosis (Tarazona et al., 2010).



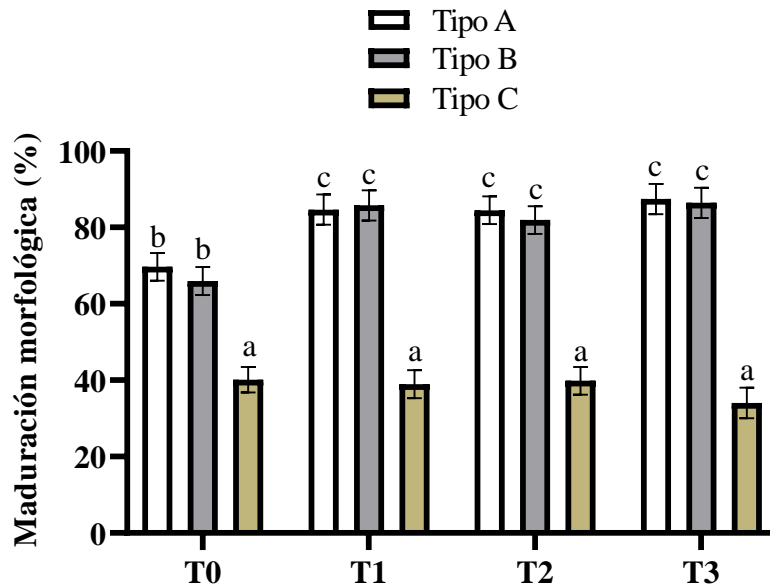
**Figura 7:** Porcentaje de expansión de las células del cúmulo en los COC´s de tipo A, Tipo B y Tipo C. Prueba de Tukey al 5%. \*= diferencia estadística entre tipo de COC´s ( $p < 0,05$ ).

Estudios realizados en varias especies de animales mostraron mayor porcentaje de maduración de los COC´s tipo A y B frente a los de tipo C; así De los Reyes et al. (1999) reportaron porcentajes mayores de maduración en COC´s tipo A (71,95%) y tipo B (51,35%) frente a COC´s tipo C (32,96%) cuando realizaron MIV en ovocitos bovinos. Esta particularidad estaría ligada a que las de células del cúmulo juegan un papel importante en la regulación de la actividad y maduración del ovocito ya que fortalece la capacidad de reinicio de la meiosis I (Madison et al., 1992). Iguales resultados fueron determinados al valorar COC´s de cerdas post-maduración (Toyoda et al., 2015).

### 5.3. Interacción entre los diferentes tratamientos y tipos de COC´s con respecto al porcentaje de las células del cúmulo

El análisis de interacción entre el tipo de COC´s (A, B y C) y el porcentaje de SCC adicionado al medio de maduración demostró que la adición del 5%, 10% y 20% de SCC mejoró el porcentaje de expansión de las células del cúmulo de los COC´s de tipo A y B (T1A=  $84,65 \pm 3,63$ ; T1B =  $85,76 \pm 3,98$ ; T2A=  $84,49 \pm 3,63$ ; T2A=  $81,94 \pm 3,63\%$ ; T3A=  $87,43 \pm 3,98$ ; T3B=  $86,43 \pm 3,98$ ) comparado con los COC´s de tipo A y B del tratamiento testigo (sin adición de SCC; T0A= $69,7 \pm 3,63$ ; T0B=  $65,95 \pm 3,63$ ; **Figura 8**,  $p < 0,05$ ). Además, dentro de los tratamientos que recibieron la suplementación de SCC (5, 10 y 20%) los COC´s de tipo A y B llegaron a duplicar el porcentaje de maduración morfológica, con respecto a los COC´s de tipo

C (T1C= 38,96 ± 3,63; T2C= 39,84 ± 3,63%; T3C= 34,04 ± 3,98 p<0,05). Por lo tanto, la adición de SCC incremento la proporción de COC´s maduros morfológicamente.



**Figura 8:** Interacción entre tratamiento y tipo de COC´s respecto al porcentaje de expansión de las células del cúmulo en T0=testigo. T1=5% de adición de suero de cobaya en celo. T2=10% de adición de suero de cobaya en celo. T3=20% de adición de suero de cobaya en celo. Prueba de Tukey al 5%.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en ovejas, se puede observar que adicionar 10% de suero de oveja en celo aumentó la maduración de ovocitos tipo A (82%) y tipo B (61,3%); sin embargo, los COC´s de tipo C (23,5%) presentaron porcentaje menores de maduración (Herrera & Jara, 2009).

Además, se ha demostrado que la suplementación de EMS en un medio de maduración convencional (TCM 199) proporcionó valores similares a los obtenidos en el presente trabajo al madurar COC´s de yegua de tipo A y B (Chávez, 2013)

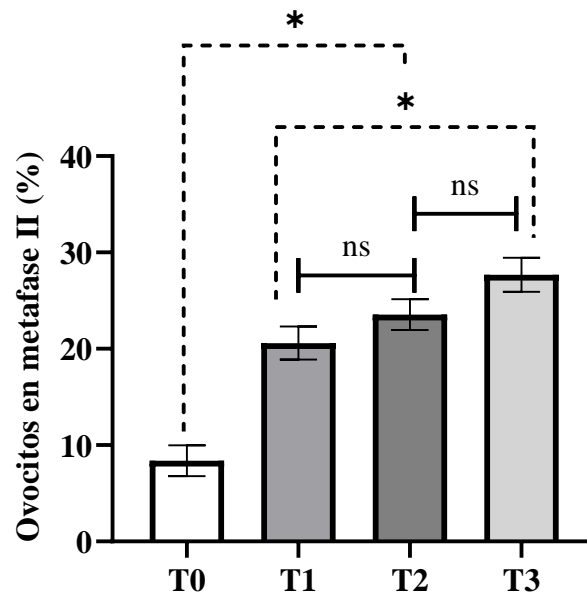
#### 5.4. Porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II

El tratamiento control (T0 = 8,38 ± 1,61) presentó un porcentaje menor de ovocitos que llegaron a metafase II que los tratamientos en los que se suplemento SCC al 5% (T1 = 20,6 ± 1,72), 10% (T2 = 23,6 ± 1,61) y 20% (T3= 27,7 ± 1,77; **Figura 9**). Al comparar T1 (20,6 ± 1,72)

y T2 ( $23,6 \pm 1,61$ ; **Figura 9**) no se observó diferencia estadística ( $p > 0,05$ ) entre tratamientos; sin embargo, al observar los resultados obtenidos de T1 y T2 frente a T3 ( $27,7 \pm 1,77$ ; **Figura 9**) si se manifestó diferencia ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, el SCC debería ser suplementado entre un 10 y 20% dentro de los MIV.

En otras investigaciones se ha descrito un porcentaje de maduración de ovocitos de cobayas que alcanzan hasta el 69% (Yao et al., 2023) atribuyendo el éxito en la MIV a la superovulación con hMG (gonadotropina menopaúsica humana), realizada previamente, luego ellos tomaron COC's tipo A y colocaron en un medio con hCG, FSH, aminoácidos e inhibidores. En esta investigación la tasa de maduración de ovocitos tipo A ( $11,57 \pm 2,48\%$ ) y tipo B ( $8,33 \pm 2,26\%$ ) fue significativamente mayor que la de tipo C ( $1,69 \pm 0,89\%$ )

Además, esta tendencia a mejorar los porcentajes de maduración nuclear ha sido observada en otras especies como ovinos (Herrera & Jara, 2009), equinos (Motlagh et al., 2008) y bovinos (Ferreira et al., 2008), al adicionar suero de hembra en celo.



**Figura 9:** Porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II en los tratamientos T0=testigo. T1=5% de adición de suero de cobaya en celo. T2=10% de adición de suero de cobaya en celo. T3=20% de adición suero de cobaya en celo. Prueba de Tukey al 5%. \*=diferencia estadística entre tratamientos.  $p < 0.05$



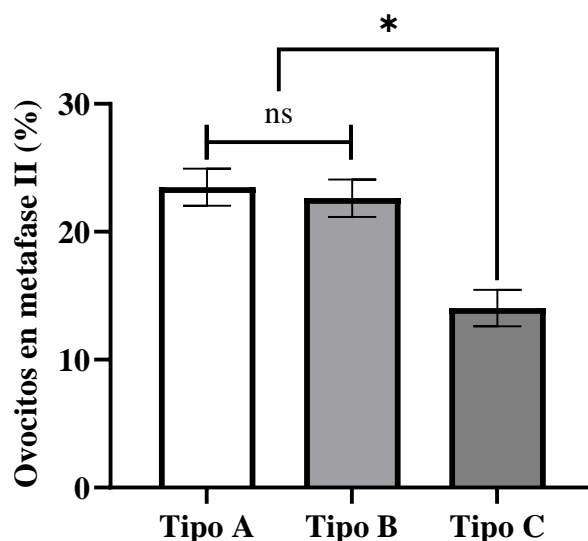
Al observar los resultados del estudio podemos afirmar que mientras más alta es la concentración de SCC, existió mayor probabilidad de que los ovocitos reinicien la meiosis y alcancen la metafase II (Tibary et al., 2005). Según Herrera & Jara, (2009) el suero contiene hormonas esteroideas como progesterona, testosterona, estrógenos, además hormonas hipofisarias como LH,FSH, y factores de crecimiento que contribuyen a crear un ambiente ideal que facilita la maduración de los ovocitos, tal es el caso de la FSH que se une a receptores de la superficie de células foliculares provocando la secreción de estradiol y LH así comenzado la reanudación de la meiosis (Yao et al., 2023).

Motlagh et al. (2008) corroboraron estos resultados, al encontrar más ovocitos en metafase II, al adicionar más del 15% de EMC en el medio de maduración *in vitro* de los ovocitos de oveja, y sus resultados reflejaron una diferencia significativa en la tasa de maduración frente a un medio no suplementado con EMC.

En otra especie como la yegua se ha reportado que adicionar suero de yegua en celo, gonadotropina coriónica humana + FSH + LH permitió contar con un medio óptimo para que los ovocitos alcanzaran metafase II en un 26%.Estos resultados estaría relacionados a la influencia de las gonadotropinas (FSH y LH) en la maduración nuclear, que puede incrementar en un 25% el porcentaje de ovocitos que llegan a MII (Ducolomb, 2004).

### **5.5. Comparación de la cantidad de ovocitos tipo A, B y C que llegaron a metafase II**

Los ovocitos tipo A ( $23,5 \pm 1,46$ ) y B ( $22,6 \pm 1,46$ ; **Figura 10**) no difirieron significativamente entre ellos ( $p > 0,05$ ) en cuanto al porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II, No obstante, presentaron porcentajes significativamente más altos que los ovocitos tipo C ( $14 \pm 1,43$ ; **Figura 10**;  $p < 0,05$ ). Esto indica que la calidad de los ovocitos es importante al momento de la maduración *in vitro*, ya que existen estudios que demuestran que hay relación directa entre las células del cúmulo que rodean al ovocito y el desarrollo de éste, pues se ha visto que ovocitos desnudos o con una sola capa de células presentaron desarrollo deficiente o se degeneraron en el proceso de la producción de embriones *in vitro* (Khurana & Niemann, 2000). Las células del cúmulo juegan un papel importante en los diferentes procesos fisiológicos del ovocito (Li et al., 2006) debido a que brindan protección y soporte nutricional, aumentando el porcentaje de viabilidad ovocitaria cuando estos son sometidos a un proceso de criopreservación (Purohit et al., 2012).

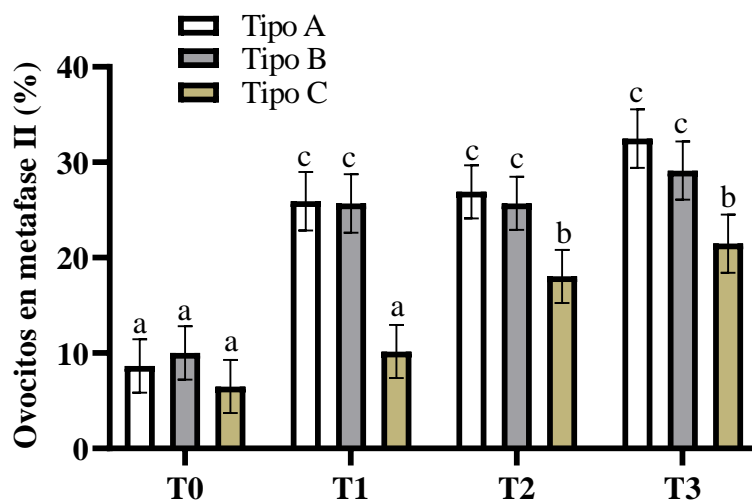


**Figura 10:** Porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis y llegaron a metafase II en los COC's de tipo A, Tipo B y Tipo C. Prueba de Tukey al 5%. \* = diferencia estadística entre tipo de COC's.  $p < 0.05$

Estudios realizados en la especie caprina reportaron una tasa de maduración ovocitaria mayor en los ovocitos provistos de células del cúmulo (41,2%) en comparación con ovocitos denudados (27,4%) (Purohit et al., 2012); sin embargo, estos resultados son diferentes a los reportados por Aké et al. (2015) quienes al evaluar el porcentaje de maduración entre COC's provistos de células del cúmulo (47,59%) vs COC's denudados (47,83%), no encontraron diferencia significativa entre los dos grupos.

#### 5.6. Interacción entre tratamientos y tipos de COC's con respecto al porcentaje de ovocitos que desarrollaron a metafase II

La adición del 5, 10, 20% de SCC permitió incrementar 3 veces más el porcentaje de maduración nuclear de los ovocitos de tipo A y B en T1, T2 y T3, comparado con los COC's de tipo A y B del tratamiento testigo (T0). Además, la adición de 10% (T2) y 20% (T3) de SCC mejoró el porcentaje de COC's de tipo C que llegaron a MII, particularidad que no se observó en el tratamiento T1 (5% SCC; **Figura 11**).



**Figura 11:** Interacción entre tratamiento y tipo de COC´s respecto al porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase II en T0=testigo. T1=5% de adición de suero de cobaya en celo. T2=10% de adición de suero de cobaya en celo. T3=20% de adición de suero de cobaya en celo. Prueba de Tukey al 5%.  $p < 0.05$

La adición de SCC muestra un beneficio similar a la observada en otras especies cuando se adicionó suero de hembra en celo, como por ejemplo en la especie bovina (Espin, 2018). De idéntica manera en la especie equina la adición del 10% de EMS permitió obtener mayor porcentaje de maduración nuclear (Lorenzo et al., 2002).

### Conclusiones

- La adición de suero de cobaya en celo (SCC) en porcentajes del 5, 10 y 20% incrementó el número de COC's con expansión de las células del cúmulo luego de 24 horas de MIV
- Madurar COC's de tipo A y B en medios suplementados con SCC (5, 10, 20%) permitió mejorar el porcentaje de maduración morfológica; sin embargo, esta particularidad no se observó en los de tipo C que recibieron SCC en el medio de maduración.
- El reinicio de la meiosis en ovocitos de cobaya se incrementó significativamente al adicionarse SCC (5, 10 y 20%) en el medio de maduración *in vitro*.
- La suplementación del 10 y 20% de SCC en el medio de maduración permitió que los COC's considerados no aptos para la PIVE (tipo C) incrementaran porcentaje de maduración nuclear.

## Referencias

- Aké Villanueva, J. R., Aké Lopez, J. R., Centurión Castro, F. G., & Ordóñez León, A. (2015). Efecto de las células del cúmulus sobre la viabilidad postdescongelación de ovocitos bovinos vitrificados. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios (ERA)*, 5, 183–191.
- Almeida, J. (2016). Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho. [Universidad de Cuenca]. Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24954/1/tesis.pdf>
- Avilés, D. (2016). Caracterización genética del cuy doméstico en América [Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba]. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/13382>.
- Aviles, D. F., Martinez, A., Landi, V., & Delgado, J. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*): un curso andino de interés agroalimentario. *Recurso Genéticos Animales*, 55, 87–91.
- Ayala Guanga, L., Astiz, S., Nieto Escandon, P., Dutan Saramago, J., Rodas Carpio, R., Pesantez-Pacheco, J. L., & Rosales Jaramillo, C. (2020). Relationship between testosterone and penile spicules in Guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 158, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.034>
- 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>
- Cañón, K., Cajas, Y. N., Carrera, R., Lorenzo, P. L., Rebollar, P. G., Garcia-Garcia, R. M., & Arias-Alvarez, M. (2016). In vitro maturation of guinea pig oocytes supplemented with Epidermal Growth Factor Insuline-Like Growth Factor I. *Animal Reproduction*, 13(3), 637.
- Caravaca, F., Castel, J., Guzman, J., Delgado, M., Mena, M., Alcande, Y., & Gonzalez, P. (2005). Bases de la producción animal. <https://books.google.com.ec/books?id=YQxTe3v1GqkC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Carolan C, Lonergan P, Van Langenonck A, Mermillod P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in syntethic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 43, 1115-1128.

- Chachipanta, L. (2019). Identificación del mercado potencial de los productos elaborados con carne de cuy (*Cavia Porcellus*) en la provincia Tungurahua. *Universidad Técnica de Ambato*.
- Chávez, B. (2013). Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos equinos utilizando suero de yegua en dos etapas del estro, y uniones heterólogas con espermatozoides equinos tratados heparina y procaína [Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas]. *Universidad Michocana de San Nicolás de Hidalgo*.  
[http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB\\_UMICH/1878](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1878)
- Clemons, D., & Seeman, J. (2011). *The laboratory guinea pig* (D. V. M. Mark A. Suckow, Ed.; Second edi)
- De los Reyes, M., Aguayo, J., Del Campo, H., & Barros, C. (1999). Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. *Avances en ciencias veterinarias*, 14, 42–53.
- Dell'aquila, M. E., Fusco, S., Lacalandra, G. M., & Maritato, F. (1995). In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Human Reproduction*, 45, 547–560.
- Dorsch, M. M., Glage, S., & Hedrich, H. J. (2008). Collection and cryopreservation of preimplantation embryos of *Cavia porcellus*. *Laboratory Animals*, 42(4), 489–494.  
<https://doi.org/10.1258/la.2007.007011>
- Ducolomb, Y. (2004). Estudio de las fracciones proteínicas del fluido folicular porcino en la maduración, fertilización in vitro y poliesperma de ovocitos de cerdo. [Universidad Autónoma Metropolitana].  
<http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatasis.php?recno=11933&docs=UAMI11933>.  
PDF
- Echeverría, J. (2013). Sincronización del celo en cuyes (*cavia porcellus*) con la utilización de la prostaglandina (f2 alfa). [Universidad Técnica del Norte].  
<Http://Repositorio.Utn.Edu.Ec/Handle/123456789/2336>
- Espin, P. (2018). Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración. [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>
- Fair T. (2003) Follicular oocyte growth y acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction*.783(4),203-216.

- Ferreira, P. J., de La Salle, U., César Díaz, fedeganorgco A., & Dalmau, E. B. (2008). Evaluación del efecto de promotores de maduración oocitaria in vitro en bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1, 9–26. <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>
- Flores Mancheno, C., Duarte, C., & Patricio Salgado-Tello, I. (2017). Characterization of the guinea pig (*Cavia porcellus*) meat for fermented sausage preparation. In *Revista Ciencia y Agricultura (Ciencia y Agricultura)*, 14(1), 3–9+. <https://link.gale.com/apps/doc/A509469016/IFME?u=anon~c42962e8&sid=googleScholar&xid=f003bacc>
- Gamboa, V., Jara, O. (2009). Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos. *Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos ovinos in vitro ovinos in vitro. Retrieved.* [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinariaO](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinariaO).
- Gregoire, A., Allard, A., Huaman, E., & Leon, S. (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig. *Theriogenology*, 78(4), 842–847.
- Guevara, A. (2008). Análisis económico de la producción y reproducción del cuy (*Cavia Cobayo*) hasta los 10 meses de edad-Provincia de Leoncio Prado. [Universidad Nacional Agraria de la Selva] <https://repositorio.unas.edu.pe/handle/20.500.14292/761>
- Khodaei Motlagh, M., Zare Shahneh, A., Daliri, M., Kohram, H., & Gharagozlou, F. (2008). In vitro maturation of sheep oocytes in different concentrations of mare serum. *African Journal of Biotechnology*, 7(18), 3380–3382. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Kosaka, T., & Takahashi, K. (1989). Effect of pregnant mare`s serum gonadotropin on increased ovulation in guinea pigs with synchronized. *Jikken Dobutsu*, 38(1), 81–83.
- Kuhnel, W., & Mendoza, A. (1992). Scanning electron microscope investigations on the vaginal epithelium of the guinea pig during the estrous cycle. *Archives of Histology and Cytology*, 55, 205–2010.
- Li, G. P., Bunch, T. D., White, K. L., Rickords, L., Liu, Y., & Sessions, B. R. (2006). Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and the ability of cytoplasm, to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 73(4), 446–451. <https://doi.org/10.1002/mrd.20436>

- Logothetopoulos, J., Dorrington, J., & Bailey, D. (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. *Anatomical Record*, 243(1):37–48.
- Lorenzo, P. L., Liu, I. K. M., Carneiro, G. F., Conley, A. J., & Enders, A. C. (2002). Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Veterinary Journal*, 34(4), 378–382. <https://doi.org/10.2746/042516402776249065>
- Machado, M. F., Caixeta, E. S., Sudiman, J., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Lima, P. F., Price, C. A., & Buratini, J. (2015). Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro–produced embryos in cattle. *Theriogenology*, 84(3), 390–398. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.03.031>
- Madison, V., Avery, B., & Greve, T. (1992). Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Animal Reproduction*, 27(1), 1-11.
- Maro, B., & Verlhac, M. (2002). Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol*, 4(12), 281–283.
- Mills, P., & Reed, M. (1971). The onset of first oestrus in the guinea-pig and the effects of gonadotrophins and oestradiol in the immature animal. *Endocrinology*, 50(2), 329–337.
- Modina, S. C., Lodde, V., & Luciano, A. M. (2004). Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocyte cryopreserved without cumulus cells Multi-modality imaging approaches to injection-site sarcoma View Project Identification of multiple non-invasive biomarkers predictive of oocyte quality View project. *European Journal of Histochemistry*, 48(4), 337–346. <https://doi.org/10.4081/906>
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 97–104.
- Ocaña, J., Pinedo, M., Ortega, M., & Moreno, M. (1999). The effect of different sera and bovine serum albumen fraction (BSA) on in vitro maturation of immature bovine oocytes. *Archivos de Zootecnia*, 48, 167–174.
- Palma, G. (2001). *Biotechnología de la reproducción ciencia, Tecnología y Sociedad*. (Primera Ed).
- Pignon, C., & Mayer, J. (2021). Guinea Pigs SECTION III Rodents. <http://www.britishcavycouncil>.



- Purohit, N., Meena, H., & Solanki, K. (2012). Effects of Vitrification on Immature and in vitro Matured, Denuded and Cumulus Compact Goat Oocytes and Their Subsequent Fertilization. In *J Reproduction & Infertility*, 13 (1).
- Reed, M., & Hounslow, W. (1971). Induction of ovulation in the guinea-pig. *Endocrinology*, 49(2), 203–211.
- Rosales, C., Cedillo, J., Taboada, J., Nieto, P., Qhizpi, J., & Guevara, G. (2019). Comparación de camadas de cobayas (*Cavia porcellus*) de genotipos ecuatorianos y la línea mejorada Perú. *Produccion Animal*, 31(2), 23–26.
- Sadeu, J., Adriaens, I., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, 68(9), 1228–1239.
- Santa Cruz P, Carolina, Huanca L, Wilfredo, Condori P, Rosario, & Ampuero B, Antonio. (2014). Uso de Macromoléculas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario in vitro de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 487-493. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10799>
- Shabpareh, V., Squires, E. L., Seidel, G. E., & Jasko, D. J. (1993). Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology* (Vol. 40).
- Shi, F., Watanabe, G., Trewin, A., Hutz, R., & Taya, K. (2000). Localization of Ovarian Inhibin/Activin Subunits in Follicular Dominance during the Estrous Cycle of Guinea-pigs. *Zoological Science*, 16(12), 980.
- Sirard, M. A., & First, N. L. (1988). In Vitro Inhibition of Oocyte Nuclear Maturation in the Bovine. In *biology of reproduction* (Vol. 39).
- Solís, R., & Chávez, P. (2015). Evaluación de producción in vitro de embriones en cuyes (*cavia porcellus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la universidad técnica de cotopaxi. *Universidad Técnica de Cotopaxi*. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2895>
- Soto Hilario, J. (2021). Consumo de carne de cuy como complemento alimenticio para recuperación de hemoglobina en púerperas mediatas / Consumption of guinea pig meat as a food supplement for the recovery of hemoglobin in mediate postpartum. *Comunidad y Salud Año*, 19(1).

- Suzuki, O., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y., & Matsuda, J. (2003). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Mol. Reprod Dev*, 64, 19–25.
- Tarazona, A., López A., y Olivera, A. (2010). La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Scielo Colombia*.15(3),3-18.
- Toyoda, Y., Sato, E., & Naito, K. (2020). Role of the Cumulus Oophorus in Mammalian Fertilization.
- Villamarín, K. (2016). Evaluación de dos crioprotectores(Etilenglicol y Propilenglicol) en la conservación lenta de ovocitos en cobayos (*Cavia porcellus*) en el laboratorio de la carrera de Medicina Veterinaria. *Universidad Técnica de Cotopaxi*.
- Wagner, J., Manning, P. (1976). The Biology of the Guinea pig. *American College of Laboratory Animal*
- Wang, J., Liu, Z., Sun, Q., Xia, S., Cui, J., Yang, L., An, L., Zhang, J., Su, L., Su, Y., & Du, F. (2019). Combined treatment with cysteamine and leukemia inhibitory factor promotes guinea pig oocyte meiosis in vitro. *American journal of translational research*, 11(12), 7479–7491. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31934295>.
- Wing, E. (1986). Domestication of Andean mammals. *High Altitude Tropical Biogeography*, 246–264.
- Yanagimachi, R. (1974). Maturation and fertilization in vitro of guinea-pig ovarian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38(2), 485–488.
- Yao, M., Gong, Z., Xu, W., Shi, X., Liu, X., Tang, Y., Xuan, S., Su, Y., Xu, X., Luo, M., & Sui, H. (2023). Establishment and optimization of an in vitro guinea pig oocyte maturation system. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285016>
- Young, W., Dempsey, E., & Myers, H. (1935). Cyclic reproductive behavior in the female guinea pig. *Journal of Comparative Psychology*, 19(2), 313–335.
- Younis, A., Brackett, B., & Fayrer, R. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction & Development*, 23, 189–201.
- Zhinin Criollo, A., Buñay Ortiz, P., & Ayala Guanga, L. (2022). Implementación de un protocolo de maduración in vitro de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*). *Universidad de Cuenca*.

## Anexos

**Anexo A:** Inicio del trabajo de campo con la aplicación de progesterona oral a los cobayos.



**Anexo B:** Observación de la apertura de la membrana vaginal en la cobaya



**Anexo C:** Abertura de membrana vaginal de una cobaya



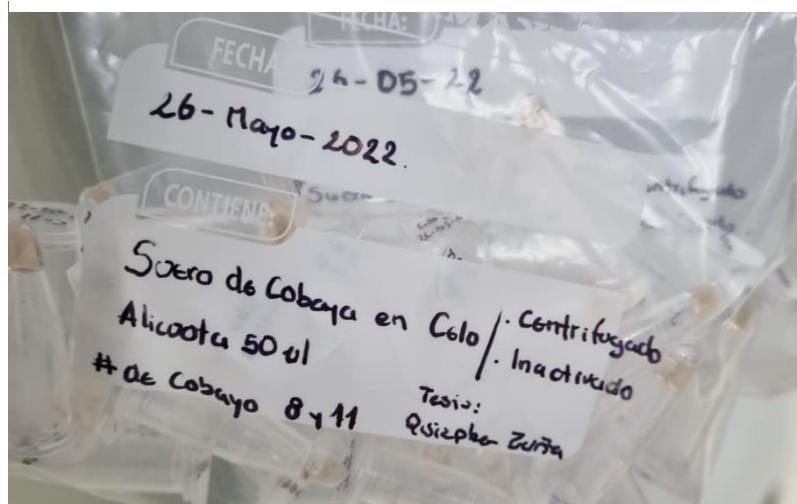
**Anexo D:** Punción cardiaca para la obtención de sangre de cobaya.



**Anexo E:** Tubos vacutainer con muestras de sangre extraídas de cobayas



**Anexo F:** Suero de cobaya en celo en alícuotas de 50ul





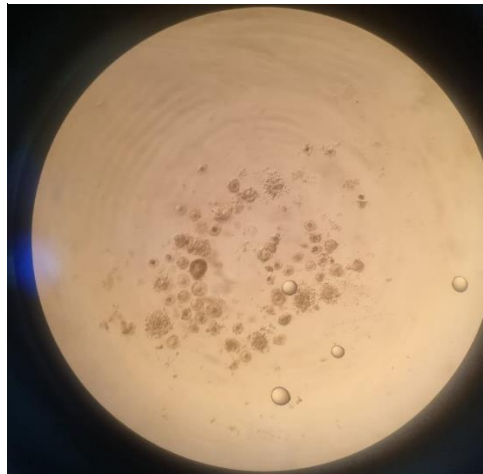
## Anexo G: Obtención de medio de maduración



## Anexo H: Medio de maduración con el 5% de SCC



## Anexo I: Ovocitos de cobaya post maduración *in vitro*



## Anexo J: Plantilla de informe de maniobras realizadas

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL  
 LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL  
 Producción de embriones bovinos *in vitro*

Operadores: J. S. S. Manteca: Dip. Manabita

Fecha	Procedencia	# Ovarios	Hora de llegada	# OOC's	Medio de recuperación	Medio MIV
07/09/22	comel	25	11:30	177	lockley 6 + IVA	#3 miv

Volumen de la gota: 60  
 Volumen de suero: 40  
 Hora de inicio de estabilización: 8:26  
 Hora de inicio de la aspiración: 9:00  
 Ovocitos por gota: 15  
 Número de gotas aspiradas: 8  
 Suplementos empleados: 10. 40000 IU de estradiol  
 Ovocitos que se en maduración: 136  
 Hora final de maduración: 11:00 → 10:25

RECOPILACION Y MADURACION OVOCTARIA

Total	GOTA 1	GOTA 2	GOTA 3	GOTA 4	GOTA 5	GOTA 6	GOTA 7	GOTA 8	GOTA 9	GOTA 10

# OOC's expandidos

% de expansión MIV

EVALUACION MIV NUCLEAR

Tinción fluorescente empleada: \_\_\_\_\_  
 ID de la placa: \_\_\_\_\_

GOTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
# ESTRUCTURAS															
INMADURO															
MADURO															
% MIV NUCLEAR															
% TOTAL DE LA MANIOBRA															

**Anexo K:** Evaluación nuclear de COC`S



**Anexo L:** Evaluación nuclear de Coc`s

