

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria

### **Efecto de la administración de diferentes dosis de gonadotropina menopáusica humana (hMG) sobre la respuesta ovárica en cobayas**

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


**Autor:**

Melani Yajaira Mayorga Chávez

Andy Steven Sozoranga Romero

**Director:**

José Luis Pesántez Pacheco

ORCID:  0000-0002-5669-6014

**Cuenca, Ecuador**

2024-03-06

## Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG) en diferentes dosis sobre la respuesta ovárica de cobayas, con previa sincronización del ciclo estral. Se utilizaron un total de 18 cobayas de edad media de  $80 \pm 15$  días, con un peso medio de 1050 gramos, sujetas a un proceso de adaptación de 10 días. Se formaron 3 grupos experimentales, los cuales fueron sincronizados durante 15 días con progesterona (P4); empezando el último día de la administración de P4 y durante 3 días consecutivos se administró vía intraperitoneal hMG a diferentes dosis, 5, 10, y 15 UI/kg/día. La administración de hMG incrementó significativamente el número de cuerpos lúteos (CLs) en todos los grupos, además del número total de estructuras recuperadas, no obstante, no hubo diferencias significativas en el número de CLs observados, en la superficie del ovario, ni en las estructuras recuperadas entre las diferentes dosis de hMG. El número de estructuras clasificadas como aptas fue mayor en todos los grupos, asimismo, la proporción entre mórulas y blastocistos considerados como aptos difirió entre grupos, todos los grupos mostraron una mayor proporción de mórulas vs. la cantidad de blastocistos recolectados en el día del lavado. El diámetro de los folículos fue afectado por la administración de diferentes dosis de hMG mostrando un mayor diámetro folicular los grupos con dosis más altas de hMG vs. el grupo de menor dosis. No se evidenció diferencias significativas en la apertura de la membrana vaginal; así como en el volumen ovárico, tamaño de cuerpos lúteos y número de folículos. Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de hMG, tiene un efecto directo sobre la respuesta ovárica y por lo tanto sobre el número de embriones recuperados, esta respuesta se debe al alto número de cuerpos lúteos observados en el día de la colecta, sin embargo, este efecto es independiente de la dosis administrada.

*Palabras clave:* reproducción animal, ciclo estral, respuesta ovárica, hormonas gonadotrópicas



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

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

### Abstract

The aimed of this study was to evaluate the effect of the administration of Human menopausal gonadotropin (hMG) in different doses on the ovarian response in guineapigs, with prior synchronization of the estrous cycle. A total of 18 female guineapigs with an average age of  $80 \pm 15$  days, weight about of 800 to 1150 grams, were used, under to 10 days adaptation process. 3 experimental groups were formed, which were synchronized for 15 days with progesterone (P4); starting on the last day of P4 administration and for 3 consecutive days, hMG was administered intraperitoneally at different doses, 5, 10, and 15 IU/kg/day. The administration of hMG significantly increased the number of corpora lutea (CLs) in all groups, in addition to the total number of recovered structures; however, there were no significant differences in the number of CLs observed, on the surface of the ovary, or in the structures recovered between the different doses of hMG. The number of the structures classified as suitable was higher in all groups, likewise, the proportion between morulas and blastocysts considered suitable was different between groups, all groups showed a higher proportion of morulas vs. the number of blastocysts collected on the wash day. The diameter of the follicles was affected by the administration of different doses of hMG, showing a greater follicular diameter in the groups with higher doses of hMG vs. the lowest dose group. No significant differences were evident in the vaginal membrane opening; as well as ovarian volume, size of corpora lutea and number of follicles. The results obtained suggest that the application of hMG has a direct effect on the ovarian response and therefore on the number of embryos recovered. This response is due to the high number of corpora lutea observed on the day of collection, however, this effect is dose independent.

*Keywords:* animal reproduction, oestrus, ovarian response, gonadotropic hormones



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

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

## Índice de contenido

Introducción .....	12
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo general.....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
3. Revisión de literatura .....	16
3.1. Morfofisiología del aparato reproductor de la cobaya .....	16
3.1.1. Ovarios y oviductos.....	16
3.1.2. Útero.....	17
3.1.3. Vagina y vulva .....	17
3.2. Pubertad .....	17
3.3. Ciclo estral .....	17
3.3.1. Proestro .....	18
3.3.2. Estro .....	18
3.3.3. Metaestro.....	19
3.3.4. Diestro .....	20
3.4. Membrana vaginal .....	20
3.5. Citología vaginal .....	20
3.6. Dinámica folicular.....	21
3.7. Aspectos sobre la sincronización del ciclo estral en cobayas.....	22
3.8. Superovulación .....	22
3.9. Gonadotropina menopáusica humana (hMG) .....	22
3.10. Clasificación de ovocitos y embriones de cobaya.....	23
4. Materiales y métodos.....	25
4.1. Materiales .....	25
4.2. Métodos.....	26
4.2.1. Área de estudio.....	26
4.2.2. Diseño y preparación de las unidades experimentales .....	26

4.2.3.	Revisión de apertura vaginal.....	28
4.2.4.	Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras .....	29
4.2.5.	Evaluación del desarrollo morfológico y calidad de estructuras colectadas....	30
4.2.6.	Volumen ovárico, número y diámetro de cuerpos lúteos y folículos .....	30
4.3.	Análisis estadístico .....	31
5.	Resultados.....	33
5.1.	Clasificación de estructuras recuperadas.....	33
5.2.	Efectos de la administración de hMG sobre el desarrollo folicular.....	34
5.3.	Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas.....	35
6.	Discusión .....	37
	Conclusiones .....	41
	Referencias.....	42
9.	Anexos.....	50

## Índice de figuras

Figura 1. Visualización de células intermedias (flecha roja) y presencia de mucus (flecha azul), después de la tinción con Hematoxilina y eosina (HE), indicativo de Proestro.....	18
Figura 2. Predominio de células superficiales (flecha roja), después de la tinción con HE, indicativo de Estro.....	19
Figura 3. Número regular de leucocitos (flecha azul) y mayor cantidad de células intermedias (flecha roja) en relación con las superficiales (flecha verde), después de la tinción con HE, indicativo de Metaestro.....	19
Figura 4. Gran cantidad de leucocitos (flecha roja) en relación a las células intermedias (flecha azul), después de la tinción con HE, indicativo de Diestro. ....	20
Figura 5. Toma de muestra y procesamiento de citología vaginal. 1) apertura de la vagina, 2) toma de muestra con hisopo estéril, 3) extendido, fijación y tinción de muestra, 4) placa rotulada y fijada, 5) observación en microscopio.....	21
Figura 6. Protocolos de sincronización de los grupos experimentales. 5-hMG, administración de 5 UI/kg/día hMG (panel A). 10-hMG, administración 10 UI/kg/día de hMG (panel B). 15-hMG, administración de 15 UI/kg/día hMG (panel C). ....	28
Figura 7. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal. Durante el período de latencia del ciclo estral, la membrana se ve cerrada (A, B). Cuatro a cinco días antes de la ovulación, cambia la coloración de la membrana vaginal, signo de una posible perforación de esta (C). Al momento de la ovulación, se perfora la membrana vaginal y aumentan las secreciones vaginales (D). Tras la ovulación, la membrana vaginal comienza a cerrarse (E, F).....	29
Figura 8. Proceso de lavado de los oviductos (panel A) y cuernos uterinos (panel B).....	30
Figura 9. Esquemmatización de la medición del volumen ovárico.....	31
Figura 10. Representación de la medición del diámetro del CL.....	31
Figura 11. Número de cuerpos lúteos (panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopaúsica humana a varias dosis (hMG). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). ....	33
Figura 12. Número de folículos (panel A) y diámetro de folículos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopaúsica humana a varias dosis (hMG). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). ....	35

Figura 13. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal (AMV) de cobayas desde el retiro de la fuente de P4 (Altrenogest) hasta la manifestación de celo (panel A), y tiempo que permaneció abierta la membrana vaginal de cobayas desde el inicio de la aplicación del tratamiento con diferentes dosis de gonadotropina menopaúsica humana (hMG) (panel B). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). ..... 36

Figura 14. Volumen ovárico (VO) de cobayas a las que se les aplico un tratamiento de superovulación basado en la administración diferentes dosis de gonadotropina menopaúsica humana (hMG). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05). ..... 36

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de estructuras de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de diferentes dosis de gonadotropina menopaúsica humana (hMG).....	34
Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de diferentes dosis de gonadotropina menopaúsica humana (hMG). .....	35



## Agradecimientos

Agradezco a Dios por acompañarme en cada paso, a mis padres Jaime y Mirian por su dedicación, paciencia y apoyo inquebrantable a lo largo de mi vida. Les agradezco por estar siempre ahí, celebrando los éxitos y superando los obstáculos a mi lado.

Al Dr. José Luis Pesantez por otorgarme su apoyo y conocimiento, a los docentes y técnicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por su aporte al desarrollo del presente trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a mis amigos, quienes han sido un pilar esencial en este viaje académico. Su aliento constante y momentos compartidos han iluminado los días más desafiantes.

Gracias a mi compañera fiel, Poli, por su presencia reconfortante y su amor incondicional. Ha sido una fuente constante de alegría y apoyo durante las largas horas de estudio.

Melani Mayorga Chávez

Mi reconocimiento y agradecimiento a los miembros de la facultad de Ciencias Agropecuarias por su colaboración e interés en este trabajo. De igual manera agradezco a mi director de tesis Dr. José Luis y a los miembros de los laboratorios de Irquis y del Campus por su tiempo y su cooperación para ayudarme en mi investigación.

A mi bella madre Alba, estoy muy agradecido por su total apoyo y paciencia desde el primer día en la escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, hasta el final. También me gustaría agradecer a mis hermanos, a mi padre y amigos por su apoyo y consejos. A mi perro Copo por su compañía y a mis demás perros, gracias por ser un motivo. Asimismo, quiero agradecer a Dios por permitirme el regalo de la vida y poder alcanzar esta meta. Finalmente me permito agradecerme a mí, por mi perseverancia, por mi esfuerzo en cada lucha, por cada lágrima y levantarme una y mil veces.

“La experiencia es la maestra más exigente, primero te pone a prueba y después te enseña la lección” Travis Bradberry

Andy Sozoranga Romero

## Dedicatorias

A mis padres y hermano, quienes han sido mi fuente de fortaleza y parte fundamental de mi crecimiento y éxito académico.

Melani Mayorga Chávez

A mi amada madre, a su apoyo incondicional y anhelo de que sus hijos fuésemos profesionales. Un pilar para desarrollarnos mejor en nuestra sociedad moderna.

Andy Sozoranga Romero

## Abreviaturas

**FSH** = Hormona folículo estimulante

**hMG** = Gonadotropina menopáusica humana

**eCG** = Gonadotropina coriónica equina

**LH** = Hormona luteinizante

**P4** = Progesterona

**PG** = Prostaglandina

**GnRH** = Hormona liberadora de gonadotropina

**UI** = Unidades internacionales

**AMV** = Apertura de membrana vaginal

**DAMV** = Duración de apertura de membrana vaginal

**PBS** = Solución buffer fosfato

**CLs** = Cuerpos lúteos

**HE** = Hematoxilina y eosina

**ANOVA** = Análisis de varianza

**DMS** = Diferencia mínima significativa

## Introducción

Los primeros reportes de trabajos realizados en cobayos (*Cavia porcellus*) en Ecuador datan de los años 70, estos reportes han sido encaminados a aumentar y mejorar la producción de la especie (Avilés y col., 2014). La información sobre parámetros fisiológicos y reproductivos de esta especie es amplia (Chauca, 1997; Aliaga y col., 2009); no obstante, las evidencias acerca de la efectividad del control del ciclo estral y superovulación mediante el uso de hormonas en dicha especie son hasta la actualidad discrepantes en los resultados (Garza, Shaban y Terranova, 1984; Kosaka y Takahashi, 1989; Shi y col., 2000a).

El cobayo no solo se reproduce para consumo, sino también es un animal que se utiliza desde el siglo XVIII dentro del campo de la biomedicina (Taylor y Lee, 2012), por ser un excelente biomodelo para estudios reproductivos en humanos, debido a sus características fisiológicas únicas, como el poseer un ciclo estral completo dividido en fase folicular y luteal, y tener la ovulación espontánea; además, durante el proceso de formación del cuerpo lúteo las características morfológicas de este son semejantes a las de la especie humana (Yao y col., 2023). Con base en todas estas consideraciones, las investigaciones realizadas hasta el momento se centran en perfeccionar los procedimientos para el control del ciclo estral y la gestión de la ovulación múltiple (superovulación). El propósito es obtener una cantidad más significativa de ovocitos o embriones, orientados hacia futuros estudios embriológicos (Grégoire y col., 2012). En consecuencia, es imperativo obtener una comprensión más completa de los diversos métodos actualmente empleados para dirigir el ciclo estral y manejar la respuesta a la ovulación múltiple. Esto se hace con el objetivo de desarrollar un enfoque más eficaz que permita incrementar tanto la cantidad como la calidad de ovocitos y embriones disponibles (Suzuki y col., 2003).

Los principales tratamientos que se han usado para sincronización de celo de la cobaya se basan en el uso de hormonas exógenas como prostaglandinas (PG) y progestágenos. La administración de prostaglandinas en dosis única vía intramuscular no provoca el efecto luteolítico deseado lo que ocasiona que las cobayas no demuestren conducta estral (Grégoire y col., 2012). Sin embargo, la administración oral de progestágeno ha demostrado hasta ahora, ser la mejor hormona para la sincronización del celo; existen reportes en los que se ha alcanzado una tasa de sincronización de hasta el 95% en esta especie (Grégoire y col., 2011).

Asimismo, en otros estudios realizados en ratones, Pallares y González (2009), al utilizar diferentes protocolos basados en progestágenos y hormonas luteolíticas, obtuvieron mejores tasas de sincronización y fertilidad al usar inyecciones intraperitoneales de D cloprostenol con tres días de diferencia más una dosis única subcutánea de progesterona (P4).

Por otra parte, Hasegawa y col. (2016), lograron tasas de sincronización del 93% en la etapa de metaestro en el día 4, después de usar dos inyecciones diarias de P4 (día 1 y 2) en combinación con inyecciones de Suero Antiinhibina en los días 3 y 4, más una inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) en el día 6, además de obtener tasas de superovulación altamente eficientes.

De la misma manera, se han utilizado diversas gonadotropinas, entre las cuales se destacan la hormona folículoestimulante (FSH), la gonadotropina menopáusica humana (hMG) y la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG), para estimular la superovulación en roedores. También, existen reportes con compuestos inmunoneutralizantes como lo son las vacunas neutralizantes de la inhibina; el empleo de cualquiera de estas dos metodologías se enfoca en promover el aumento del número de ovulaciones en los roedores (Shi y col., 2000a; Wang y col., 2012).

Bland (1980), Wang y col. (2012), y estudios de nuestro grupo de investigación (datos no publicados) indican que el uso de eCG en cobayas no inducen una respuesta superovulatoria satisfactoria, sino más bien ocasiona un luteinización folicular antes de la ovulación de los folículos preovulatorios. De igual manera se ha reportado resultados discrepantes cuando se usa FSH en un protocolo de superovulación. Quizás esta variabilidad de resultado entre trabajos se deba al método, dosis y momento de administración, por lo que hasta ahora su uso es limitado (Muñoz y col., 1994; Salcedo, 2016).

Por lo antes mencionado, en la actualidad se ha venido empleando otra gonadotropina, la hMG, hormona que posee una relación 1:1 "FSH y LH" y que administrada por vía intramuscular o intraperitoneal ha demostrado resultados satisfactorios; sin embargo, estos resultados podrían variar por factores como el momento del ciclo estral en el que se aplica la hormona (fase luteal media: días 6, 7 y 8) (Suzuki y col., 2003) o fase preovulatoria (días 14, 15 y 16) (Dorsch, Glage y Hedrich, 2008), evidenciándose variación en la cantidad de estructuras (embriones y ovocitos no fecundados) recuperadas después de la cópula. Es así que los mejores resultados reportados hasta ahora, medidos a través del mayor número de

estructuras obtenidas (5,2 embriones) ha sido cuando la hormona es aplicada consecutivamente durante los días 12, 13 y 14 posteriores a la ovulación (Portelli, 2013).

No obstante, los protocolos que emplean esta hormona requieren un monitoreo diario del ciclo estral, que implica la observación de cambios en la citología vaginal y la apertura de la membrana vaginal para determinar el momento exacto de la ovulación. Esto determina la fase específica del ciclo en la cual debe administrarse la hormona (Suzuki y col., 2003; Dorsch y col., 2008), lo que implica una inversión de tiempo considerable en el trabajo. Es relevante señalar que un enfoque basado en el uso de hMG con previa sincronización del ciclo estral resulta confiable, eficiente y puede implementarse de manera rutinaria en el entorno de laboratorio (Dorsch y col., 2008). Por lo anterior expuesto, en la presente investigación se priorizó la utilización de diferentes dosis de hMG con previa sincronización del ciclo estral, lo cual podría mejorar la producción de embriones.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la hMG en diferentes dosis sobre la respuesta ovárica de cobayas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Valorar el efecto de la administración de diferentes dosis de hMG administrada al momento del retiro de la fuente de progesterona, sobre la respuesta ovárica de cobayas.
- Cuantificar y clasificar el número de estructuras recuperadas después de la ovulación de cobayas superovuladas.

### 3. Revisión de literatura

#### 3.1. Morfofisiología del aparato reproductor de la cobaya

Conocer la anatomía del aparato reproductor de la cobaya es de suma importancia, para entender todos los procesos fisiológicos que se desarrollan y que contribuyen de manera directa en la reproducción. Dicho aparato está conformado por: ovarios, oviductos, útero, vagina y vulva.

##### 3.1.1. Ovarios y oviductos

Los ovarios son considerados como el principal órgano de la reproducción, de acuerdo con Felipe y Masson (2005), las estructuras ováricas presentes en los ovarios de cobayas sexualmente maduras muestran semejanzas con la morfología de los ovarios de otras especies como nutrias, ratas e inclusive humanos.

Aliaga y col. (2009) describen los ovarios de cobayas como órganos de forma ovalada ubicados en la región caudolateral del polo caudal de ambos riñones, entre la tercera y cuarta vértebra lumbar, miden de 3 a 6 mm de largo por 2 a 4 mm de ancho, y su peso varía entre 50 a 150 mg; el tamaño y estructura del ovario varía de acuerdo con la edad y el estado reproductivo. Histológicamente los ovarios están formados por la corteza (contiene folículos y cuerpos lúteos) y la médula (contiene vasos y nervios). La superficie de la corteza se encuentra cubierta por epitelio germinativo formado por el estroma, el cual está compuesto principalmente por células fusiformes y sustancia intercelular. Debajo de éste, se encuentra la túnica albugínea, que contiene mayor sustancia intercelular que el estroma; sus fibras y células están dispuestas de manera paralela a la superficie. En el borde dorsal del ovario se encuentra el hilio, que es el área de entrada y salida de vasos y nervios que se insertan en el pliegue peritoneal o mesovario, y fija al ovario con el ligamento ancho del cuerno uterino (Bacha y Bacha, 2012; Banks, 1996).

Los ovarios tienen dos funciones principales: una endócrina (esteroideogénesis) y otra exocrina (liberación de óvulos). Dentro de la función endócrina se encuentra la producción de estrógenos, que son el resultado de la síntesis de andrógenos secretados por las células de la teca interna y que durante el estro por acción de las células de la granulosa estos son transformados a estrógenos; después de la ovulación y por acción de la hormona luteinizante (LH) las células del folículo sufren un proceso de luteinización y la principal hormona secretada por estas es la P4 que inicia su secreción durante el metaestro y



alcanza su máximo de concentración durante el diestro, y en casos en los que exista gestación es secretada además por la placenta (Bearden y Fuquay, 1982).

Los oviductos derivan del conducto de Müller y son los encargados de recibir al óvulo, proveer un ambiente idóneo para la fecundación y transportar el embrión al útero; conectan los ovarios con el útero, y miden aproximadamente 57 mm de largo por 1,5 mm de ancho (Aliaga y col., 2003).

### **3.1.2. Útero**

Está formado por dos cuernos, cuerpo y cuello uterino, sujeto a la pared pélvica y abdominal. Los cuernos forman una V, tienen forma cónica aplanados dorsoventralmente, se encuentran sostenidos por el ligamento ancho del útero; mide 37 mm de largo y 6 mm de ancho en su parte media (Aliaga y col., 2003).

### **3.1.3. Vagina y vulva**

La vagina se ubica en la cavidad pelviana, su parte dorsal está relacionada con el recto y en su porción ventral con el cuello y cuerpo de la vejiga. Es un músculo fibroelástico de forma tubular que mide 3 cm de largo por 1 cm de ancho (Hargaden y Singer, 2012). La vulva forma una Y invertida juntamente con el ano, donde las dos ramas corresponden al orificio vulvar. En la parte dorsal existen dos proyecciones en forma de labios separados en la línea media por otra proyección más pequeña, correspondiente al clítoris (Aliaga y col., 2003).

## **3.2. Pubertad**

Los cobayos son animales prolíficos, Rood y Weir (1970) encontraron que la época de cría de éstos está determinada por las condiciones climáticas, en su mayoría por la temperatura; alcanzan la madurez sexual aproximadamente a las 4 o 5 semanas de edad. La mejor edad para recibir el empadre es entre 2 meses y medio a 3 meses de edad o un peso de 450 - 600 g, en temperaturas entre los 18 y 22°C (Chauca, 1997).

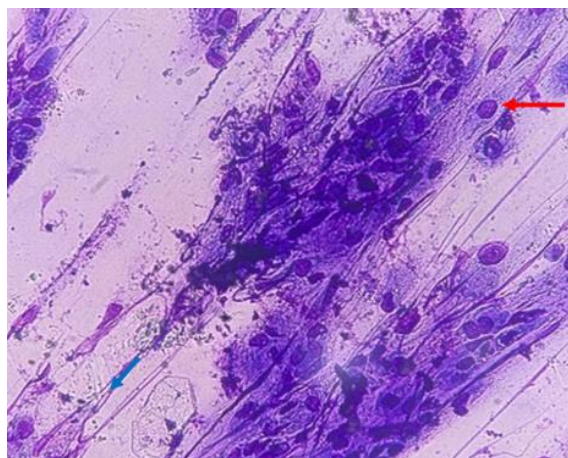
## **3.3. Ciclo estral**

A diferencia de otros roedores como el ratón, las cobayas tienen un período gestacional relativamente largo y un ciclo estral completo que consiste en dos fases, una folicular y una luteal con control endocrino diferente (Grégoire y col., 2011). El ciclo estral comienza después de la ovulación, la cual ocurre de 1 a 1,5 días posteriores a la apertura vaginal (Aranibar y Echevarría, 2014), tiene una duración promedio de  $16,1 \pm 0,2$  días con un rango

de 13 a 22 días, una producción promedio de óvulos de 3,4 por ciclo, y se divide en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro.

### 3.3.1. Proestro

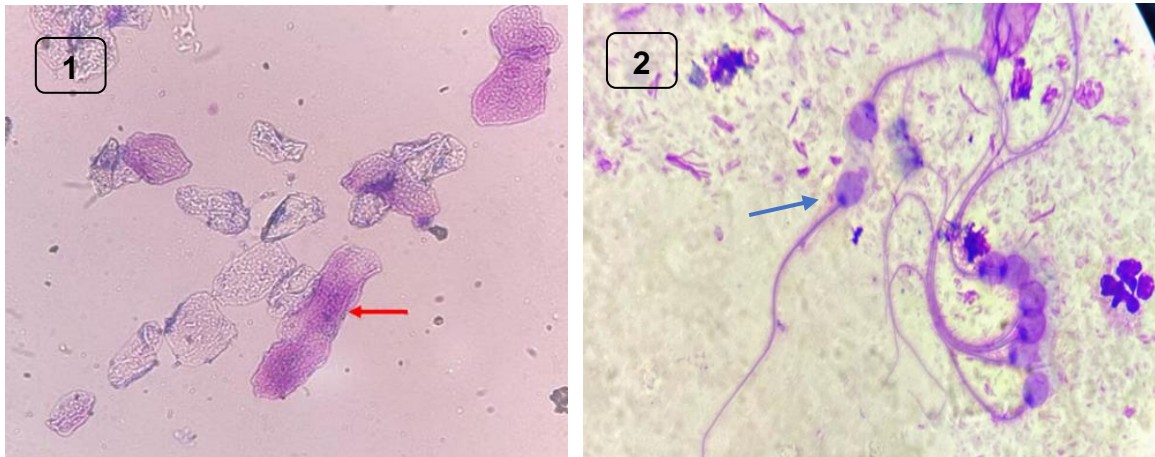
Durante esta fase, el aparato reproductor de la cobaya se prepara para la liberación del ovulo maduro del ovario, se evidencia congestión genital externa acompañado de secreción serosa, tiene una duración de 1 a 1,5 días (Aliaga y col., 2009). Citológicamente, se diferencian células escamosas intermedias nucleadas, con escasos neutrófilos polimorfonucleares (Figura 1) (Lilley, Epping, y Hafner, 1997).



**Figura 1.** Visualización de células intermedias (flecha roja) y presencia de mucus (flecha azul), después de la tinción con Hematoxilina y eosina (HE), indicativo de proestro. Fuente: autores.

### 3.3.2. Estro

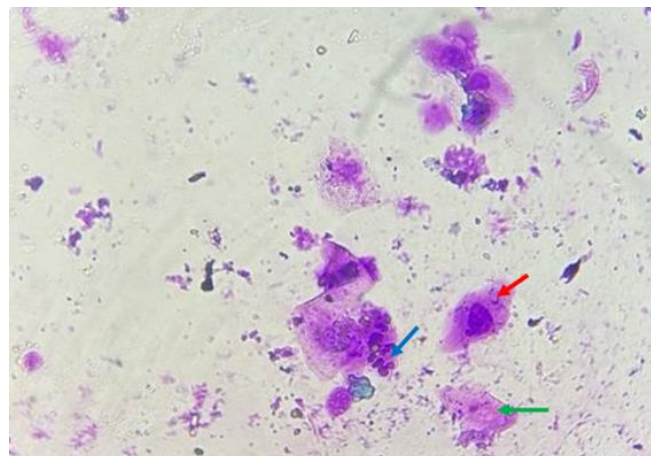
A diferencia de otros mamíferos, en las cobayas el estro puede presentarse inmediatamente después del parto, aproximadamente en 2 a 3 horas. Durante este periodo, la cobaya se muestra receptiva con el macho, se evidencia abundante mucosidad en la vagina, y tiene una duración aproximada de 8 a 24 horas (Chauca, 1997); las células escamosas superficiales anucleadas cornificadas (Figura 2) predominan en esta etapa y son un indicativo fidedigno del celo (Lilley y col., 1997).



**Figura 2.** 1) Predominio de células superficiales (flecha roja), 2) Presencia de espermatozoides (flecha azul), después de la tinción con HE, indicativo de estro. Fuente: autores.

### 3.3.3. Metaestro

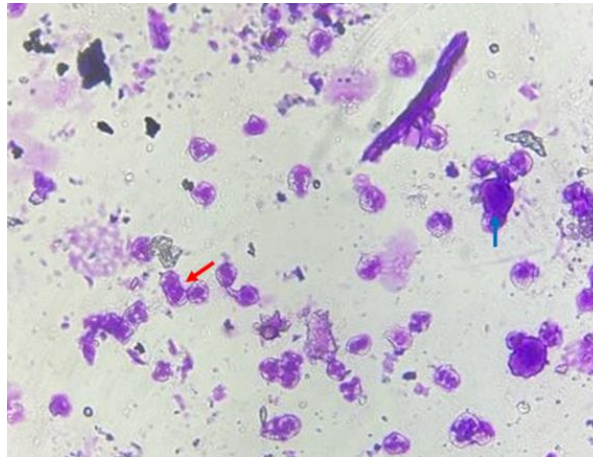
Esta etapa tiene una duración de 1-1,5 días, las cobayas no se muestran receptivas al macho; durante esta fase se inicia el crecimiento del cuerpo lúteo y el útero se prepara para la implantación del óvulo fertilizado; se caracteriza por la presencia de células parabasales, células escamosas superficiales nucleadas, anucleadas y afluencia de neutrófilos polimorfonucleares (Figura 3) (Chauca, 1997; Lilley y col., 1997).



**Figura 3.** Número regular de leucocitos (flecha azul) y mayor cantidad de células intermedias (flecha roja) en relación con las superficiales (flecha verde), después de la tinción con HE, indicativo de metaestro. Fuente: autores.

### 3.3.4. Diestro

Es la fase más larga del ciclo estral, dura 13-15 días, aquí el cuerpo lúteo alcanza su máximo crecimiento; en citología principalmente se observan células parabasales y neutrófilos polimorfonucleares (Figura 4) en mayor cantidad (Aliaga y col., 2009; Marcondes, Bianchi, y Tanno, 2002).



**Figura 4.** Gran cantidad de leucocitos (flecha roja) en relación con las células intermedias (flecha azul), después de la tinción con HE, indicativo de diestro. Fuente: autores.

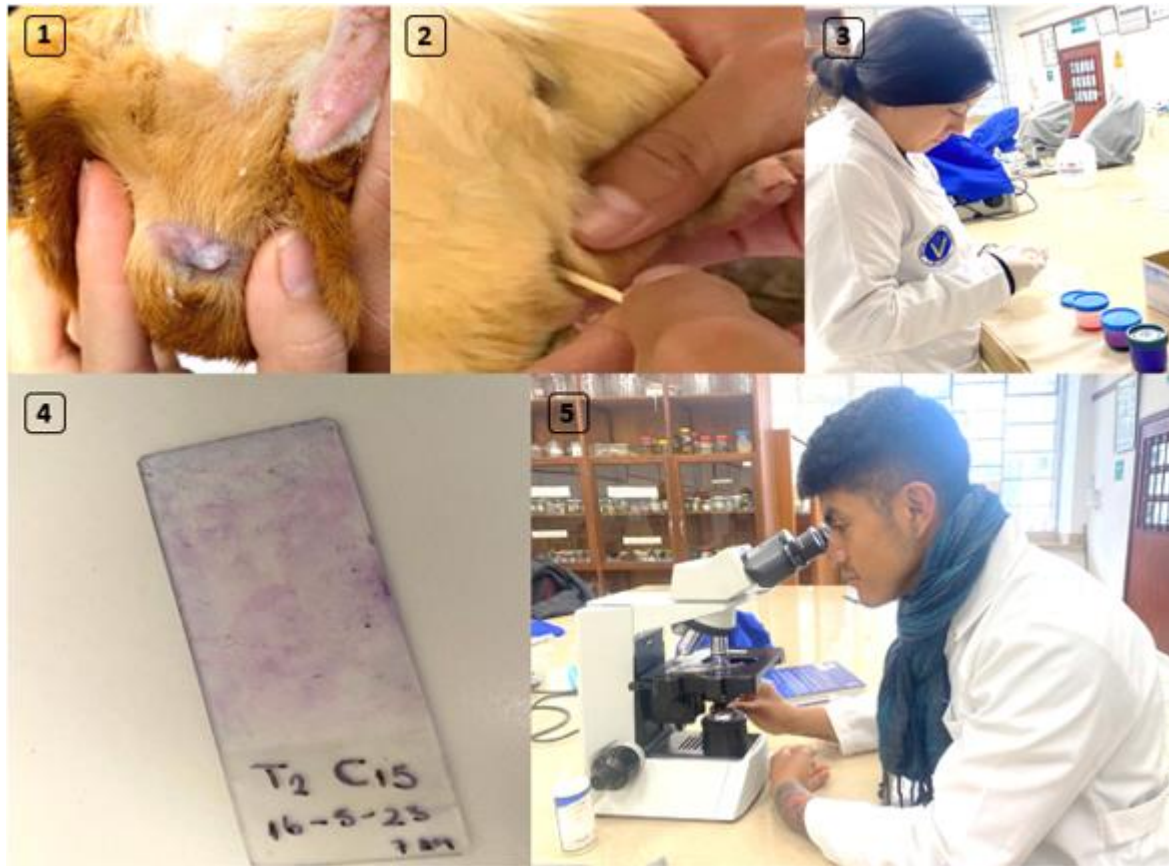
### 3.4. Membrana vaginal

El cobayo doméstico se caracteriza por la presencia de una membrana epitelial que cubre la abertura vaginal, excepto en el momento del celo y el parto, debido a la influencia hormonal (Grégoire y col., 2012); en las cobayas esta membrana se expone si se estira suavemente el área sobre los genitales presionando con el pulgar y el índice a cada lado (Noonan, 1994).

Aunando a lo anterior, la membrana vaginal en cobayas maduras permanece abierta de uno a tres días durante el celo, pero en cobayas jóvenes esta fase puede durar más tiempo (Silva de Matos y col., 2022).

### 3.5. Citología vaginal

La citología es una técnica rápida y confiable que permite determinar la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la cobaya, la muestra se toma del tercio proximal del epitelio vaginal, introduciendo un hisopo estéril aproximadamente 2cm en la vagina y realizando movimientos en contra de la pared vaginal para luego extenderlo en un portaobjetos y realizar la fijación y tinción correspondiente (Kühnel y Mendoza, 1992; Fernández, Suárez y Clapés, 2021).



**Figura 5.** Toma de muestra y procesamiento de citología vaginal. 1) apertura de la vagina, 2) toma de muestra con hisopo estéril, 3) extendido, fijación y tinción de muestra, 4) placa rotulada y fijada, 5) observación en microscopio. Fuente: autores.

### 3.6. Dinámica folicular

El desarrollo folicular en las cobayas ocurre en dos ondas, es decir, es bifásico, siendo similar a lo que ocurre en la vaca (Hutz y col., 1990). Los folículos de la primera onda alcanzan su mayor tamaño entre los días 10 – 11 del ciclo y después de este tiempo estos sufren atresia debido a la supresión de la LH por la retroalimentación negativa de la P4 proveniente del cuerpo lúteo. La segunda onda tiene una duración de 6 a 7 días, durante este periodo ocurre el reclutamiento de los folículos pequeños en el día 12, y en el día 13 la selección de los folículos más grandes; este proceso se produce debido a la disminución de los niveles plasmáticos de P4 y aumento de la concentración de LH entre los días 13 y 15. Generalmente dos a cinco folículos ovulatorios son seleccionados y se produce la ovulación al final de la segunda onda, en el día 17 del ciclo (Bland 1980; Hutz y col., 1990; Wisel, Datta, y Saxena, 1991; Sadeu y col., 2007).

### 3.7. Aspectos sobre la sincronización del ciclo estral en cobayas

La sincronización de celo es una técnica complementaria a la inseminación artificial, utilizada ampliamente en la especie bovina (Fesseha y Degu, 2020). El objetivo de la técnica es modificar el ciclo estral mediante el uso de hormonas exógenas, obteniendo un mayor número de cobayas en celo en un tiempo determinado (Shi y col, 1999). Las hormonas de mayor uso para sincronización de celo en ganadería son: PG, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y P4 (Fesseha y Degu, 2020); lo mismo sucede en cobayas, donde las hormonas más estudiadas son PG (Poyser, 1984) por su efecto luteolítico, GnRH (Shettigara y col., 1981) y P4 (Grégoire y col., 2012) mostrando esta última resultados favorables en la sincronización de celo.

### 3.8. Superovulación

Los estudios realizados para superovulación en cobayas han mostrado resultados inconsistentes con el uso de la FSH, eCG (Li, Wang, y Shi, 2015) y hCG (Peddie, 1980); sin embargo, al usar antisuero contra LH se obtuvieron resultados exitosos, debido a que produce reclutamiento de folículos de reserva y puede afectar la concentración de andrógenos previniendo la atresia folicular al final del ciclo estral, también se ha demostrado que induce la superovulación prolongando el ciclo normal de 4 a 5 días más en hámsteres cíclicos (Terranova y Greenwald, 1981). La vacuna contra inhibina aumenta la tasa de ovulación al inducir múltiples ovulaciones por un aumento de la concentración de FSH en el plasma, sin que se produzca el efecto de retroalimentación negativa en la regulación de FSH (Shi y col., 2000b), así como la hMG induce efectivamente la superovulación al ser administrada en la etapa preovulatoria (Grégoire y col., 2012; Dorsch y col., 2008; Suzuki y col., 2003), esta hormona actúa induciendo el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos (Norman y Henry, 2015), debido a la función de la FSH en el reclutamiento folicular en las primeras etapas de la foliculogénesis y a la acción de la LH en la esteroideogénesis ovárica y al estimular el crecimiento del folículo preovulatorio en las últimas etapas de la foliculogénesis (Alviggi y col., 2018).

### 3.9. Gonadotropina menopáusica humana (hMG)

La hMG tiene actividad FSH y LH en proporción 1:1, la actividad de la LH se deriva principalmente del componente hCG presente en la orina posmenopáusica que se concentra después de la purificación, además su efecto puede aumentarse con la adición de hCG (Alviggi y col., 2018).

La hormona hMG se obtiene a partir de la purificación de orina de mujeres menopaúsicas, el proceso de purificación elimina proteínas contaminantes, ya que las proteínas urinarias pueden tener efectos negativos sobre el reclutamiento y desarrollo folicular (NG y col., 2001).

Estudios en otras especies (vacas y ovejas) informan que la hMG produce una respuesta superovulatoria similar a la de la FSH, con la ventaja de que la vida media es más larga y su administración se reduce a una vez al día, convirtiéndola en una opción viable para el reemplazo de la FSH (Lauria y col., 1982; Sugano y col., 1995; Khodadadi y col., 2022; Zhang y col., 2023).

En este sentido, en cobayas Yao y col. (2023) evaluaron varios métodos de superovulación para maduración *in vitro* de ovocitos, y encontraron que las mejores tasas de maduración ovocitaria *in vitro* se obtuvieron con la superovulación inducida por la administración de hMG subcutánea a dosis de 5 UI/kg por 2-3 días consecutivos, en comparación con los recolectados de cobayas con ciclo natural.

En el mismo contexto, Grégoire y col. (2011) usaron dosis de 15 UI/kg de hMG en tres cobayas donantes como método de superovulación para transferencia de embriones, recolectando 38 embriones en etapa de mórula y blastocitos entre los días 3,5 y 4,5 después de la ovulación; asimismo, Dorsch y col. (2008) utilizaron dosis de 5 UI/kg de hMG intraperitoneal en los días 14, 15 y 16 después de la apertura vaginal como protocolo superovulatorio para criopreservación de embriones preimplantados, recolectando más embriones en el día 2,5 que en el día 4,5 tanto en cobayas superovuladas como con ciclo natural, no obstante, el total de embriones recolectados en los dos días fue mayor en las cobayas superovuladas.

Por otra parte, Suzuki y col. (2003) administraron dosis de 5UI/kg/día de hMG subcutáneo en los días 6, 7 y 8 (medio luteal) o 14,15 y 16 (preovulatorio) obteniendo significativamente más ovocitos ( $5,4 \pm 1,6$ ) en la etapa preovulatoria que en la ovulación espontánea ( $3,6 \pm 0,1$ ), mientras que en la etapa media luteal las cobayas no ovularon, concluyendo que se induce de manera efectiva la superovulación durante la fase preovulatoria.

### **3.10. Clasificación de ovocitos y embriones de cobaya**

Los ovocitos de cobaya se clasifican utilizando los criterios establecidos por Yao y col. (2023) en 3 categorías en base a las capas de células del *cúmulo oophorus* que poseen; siendo: Categoría A: ovocitos rodeados por varias capas de células del *cúmulo* y un

citoplasma con granulación fina claramente homogénea; Categoría B: ovocitos con dos o menos capas de *cúmulo* y una granulación citoplasmática no totalmente homogénea y

Categoría C: ovocitos parcial o totalmente desnudos (libres de células de la granulosa) y/o cuyas células del *cúmulo* se encuentran expandidas y/o tienen un citoplasma mayoritariamente heterogéneo.

El desarrollo de los embriones se identifica después de presentar 16 células, de acuerdo con su desarrollo morfológico; diferenciándose los siguientes estadios:

- Mórula temprana (estadio 3): las blastómeras individuales son difíciles de distinguir unas entre otras.
- Mórula compacta (estadio 4): las blastómeras se juntan y forman una masa celular sólida.
- Blastocisto temprano (estadio 5): se evidencia el blastocele y se puede diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno.
- Blastocisto (estadio 6): se diferencia del anterior por el tamaño de la cavidad, el blastocele es muy prominente y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.
- Blastocisto expandido (estadio 7): el grosor de la zona pelúcida disminuye un 60% en relación al estadio 4, debido a que el diámetro del embrión aumenta drásticamente.
- Blastocisto eclosionado (estadio 8): la masa celular se encuentra fuera de la zona pelúcida (Bó y Mapletoft, 2013; Ferré y col., 2019).

De acuerdo con las características que presente cada embrión se puede realizar una subclasificación en embriones aptos o no aptos, lo cual va a depender de si se los puede o no utilizar para transferencia (Grégoire, 2012); es así que, Shi y col. (2000) mencionan los siguientes criterios de clasificación de embriones:

- Embrión normal: mórula o blastocisto según etapa de desarrollo.
- Embrión anormal: embrión fragmentado.
- Embrión con capacidad de desarrollo normal: trofoblasto con crecimiento vigoroso después de la eclosión del blastocisto.



## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Físicos

- Jeringas
- Guantes de nitrilo
- Bisturí N° 22G
- Equipo de disección
- Catéter N° 16G
- Aguja hipodérmica N° 24G
- Tubos de microcentrífuga (Eppendorf®microtubes 3810X, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Toallas desechables
- Recipientes ámbar estéril 30ml
- Cooler
- Gel refrigerante
- Estereomicroscopio (Olympus CX31, Japón)
- Cajas petri de inspección cuadrículada
- Platina de calefacción
- Gradilla de laboratorio
- Puntas para pipeta
- Pipetas automáticas

#### 4.1.2. Químicos

- Progesterona (Altrenogest, Regumate®, MSD, España)
- Gonadotropina menopáusica humana (Merional® Menotropina 150 UI, IBSA, Suiza)
- Solución jabonosa de yodo
- Solución salina taponada de fosfato (PBS, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Suero fetal bovino (FBS, MERCK, Estados Unidos)
- Pentobarbital sódico (Penta-Hypnol®, Agrovvetmarket, Perú)
- Alcohol 70%

#### 4.1.3. Biológicos

- Cobayas

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Área de estudio

La presente investigación se realizó de manera simultánea en la unidad de producción de cuyes Yanahuaira ubicada en la provincia del Azuay, cantón Paute, sector Tuntag, cuyo clima es cálido templado, con una temperatura anual promedio de 15°C, y una precipitación de 1045 mm al año, y en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Cuenca, localizado en el Km 23 de la vía Cuenca-Girón, en la parroquia Victoria del Portete, latitud -3°4'48" y longitud -79°4'31" y a una altitud de 2.663 m s.n.m. La precipitación media anual es de 789 mm y la temperatura media oscila entre 10 y 15 °C.

### 4.2.2. Diseño y preparación de las unidades experimentales

Se utilizó un diseño completamente aleatorio, se emplearon 18 cobayas nulíparas con edad media de  $80 \pm 15$  días, con un peso medio de  $1080,33 \pm 75,63$  (987 -1219) gramos, provenientes de un mismo núcleo de cobayos de diferentes cruces entre las líneas Perú, Inti y Andina, que fueron distribuidas en tres tratamientos. Los animales fueron sometidos a un proceso de adaptación de 10 días, durante los cuales recibieron una alimentación mixta a base de alfalfa (*Medicago sativa*) y con un concentrado formulado para cumplir con el 100% de los requerimientos nutricionales de esta especie según la NRC (1995).

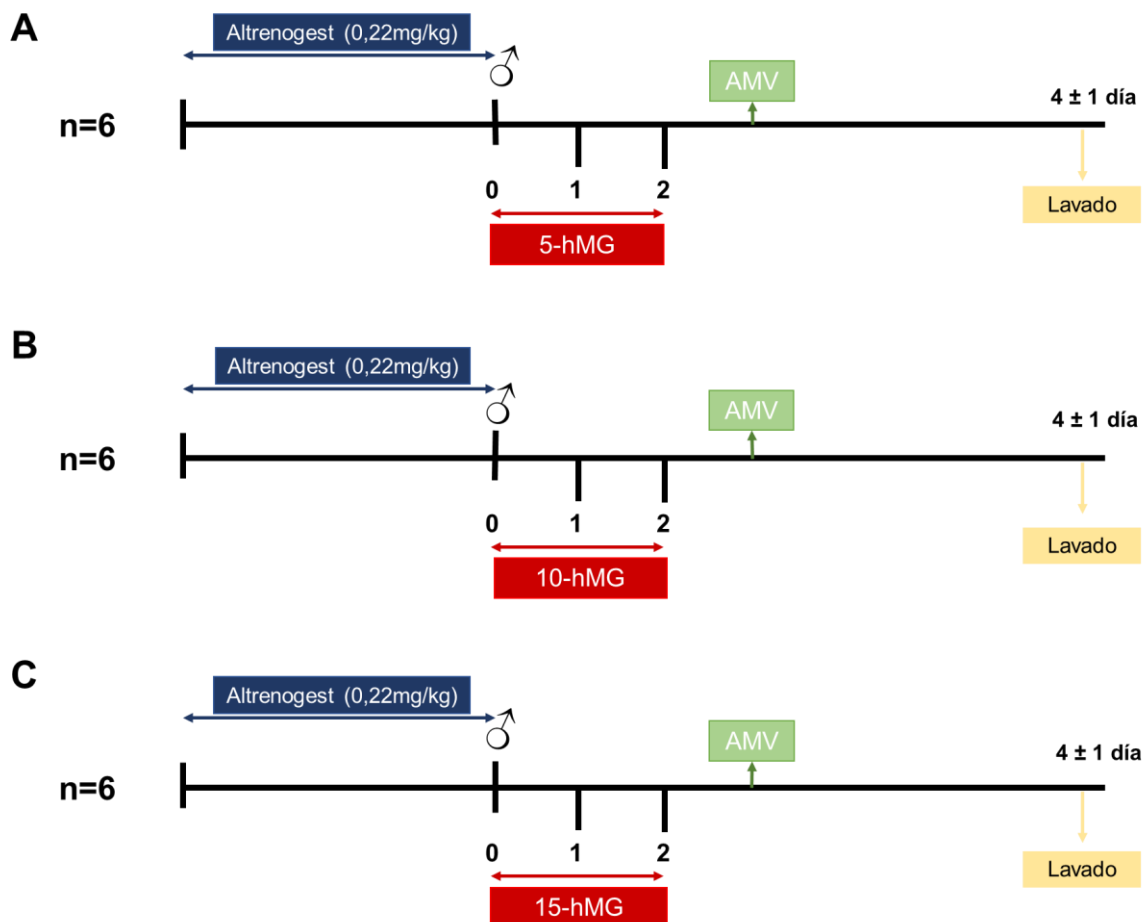
Durante este periodo, todas las cobayas fueron alojadas en una misma poza de 3,0 x 2,5 m. Asimismo, las cobayas de cada grupo experimental recibieron un protocolo de sincronización que consistió en la administración oral de Altrenogest (P4) a una dosis de 0,22 mg/kg durante 15 días (día 0). Después sincronizadas, las cobayas fueron distribuidas de manera aleatoria en una poza dividida en tres secciones, una para cada grupo experimental, y cada sección permitió albergar a 2 animales; también, el último día de la administración de P4 a las cobayas se les administró vía intraperitoneal la hormona hMG a diferentes dosis por 3 días consecutivos, a continuación, se describe los tres grupos experimentales:

- 5-hMG (n=6): 5 UI/kg/día los días 0, 1 y 2 (Figura 6A).
- 10-hMG (n=6): 10 UI/kg/día los días 0, 1 y 2 (Figura 6B).
- 15-hMG (n=6): 15 UI/kg/día los días 0, 1 y 2 (Figura 6C)

Se tomó como referencia para un grupo testigo los datos reportados por Lituma y tapia (2023) en su estudio efecto de la aplicación de un tratamiento a base de hormona gonadotropina menopáusica humana (hMG) en diferentes tiempos, sobre la respuesta ovárica de cobayas sincronizadas.

El último día de la administración de P4 (día 0) se introdujo un macho por cada sección de dos hembras (relación de 1:2) para favorecer la monta. Además, a todas las cobayas se les revisó diariamente (am y pm) la apertura de la membrana vaginal (AMV) desde el momento de ingreso del macho, lo cual sirvió de referencia para determinar el día de inicio del celo, adicionalmente se realizó una citología vaginal el día de la AMV.

A los  $4 \pm 1$  días después del apareamiento (AMV), se procedió al sacrificio de las cobayas para recolectar las estructuras a través del lavado de oviductos y útero, para luego ser clasificadas. Además, se valoraron los diámetros mayor y menor de cada ovario para determinar el volumen ovárico (VO), también se valoró el número y diámetro de los cuerpos lúteos y folículos visualizados.

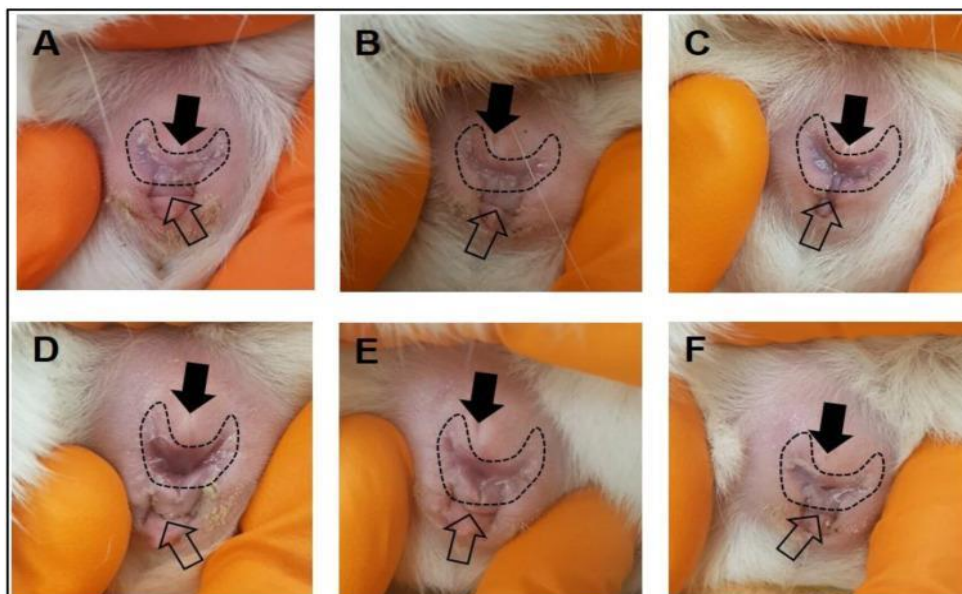


**Figura 6.** Protocolos de sincronización de los grupos experimentales. 5-hMG, administración de 5 UI/kg/día hMG (panel A). 10-hMG, administración 10 UI/kg/día de hMG (panel B). 15-hMG, administración de 15 UI/kg/día hMG (panel C). Fuente: autores.

### 4.2.3. Revisión de apertura vaginal

El monitoreo de la membrana vaginal se realizó dos veces al día: la primera se realizó en horas de la mañana (7 am) y la segunda, en horas de la tarde (7 pm). Para este procedimiento se siguió la metodología propuesta por Wilson y col. (2020), que consistió en sujetar a la cobaya de forma segura usando el pulgar y el dedo índice para manipular suavemente la abertura vaginal; luego se registró si la membrana está “cerrada” o “abierta” (Figura 7); al visualizar la apertura de la membrana vaginal se registró la fecha y la hora.

Además, se procedió a realizar un frotis de la mucosa vaginal siguiendo la metodología descrita por Fernández y col. (2021), que consistió en tomar una muestra del tercio proximal del epitelio vaginal, introduciendo un hisopo estéril aproximadamente 2 cm en la vagina y realizando movimientos en contra de la pared vaginal, posteriormente se realizó el extendido, fijación y tinción correspondiente. En el extendido citológico se visualizaron diferentes tipos de células dependiendo el estadio del ciclo estral de la cobaya. En el proestro se observaron células intermedias nucleadas con escasos neutrófilos; en el estro hubo abundantes células anucleadas; en el metaestro se observaron células nucleadas y anucleadas, con neutrófilos en moderada cantidad; y el diestro se caracterizó por presentar abundantes neutrófilos.



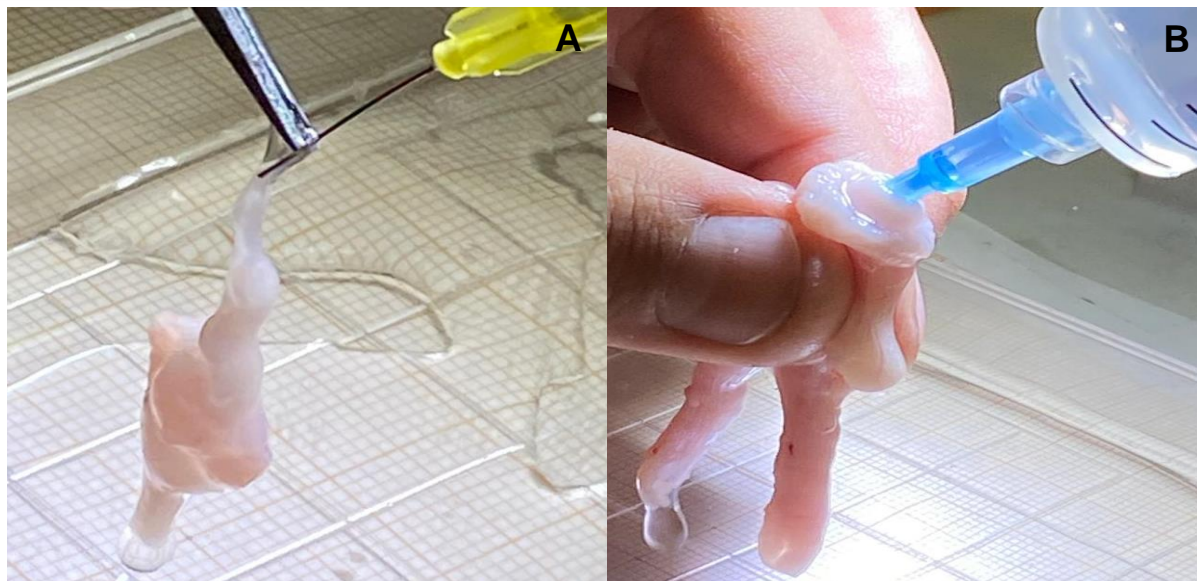
**Figura 7.** Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal. Durante el período de latencia del ciclo estral, la membrana se ve cerrada (A, B). Cuatro a cinco días antes de la ovulación, cambia la coloración de la membrana vaginal, signo de una posible perforación de esta (C). Al momento de la ovulación, se perfora la membrana vaginal y aumentan las secreciones vaginales (D). Tras la ovulación, la membrana vaginal comienza a cerrarse (E, F). Tomado de Wilson et al., (2021).

#### 4.2.4. Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras

Todas las cobayas fueron sacrificadas en el día  $4 \pm 1$  día después de la comprobación de la apertura de la membrana vaginal, siguiendo los lineamientos aprobados por la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de animales de investigación (Close y col., 1996), mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 150 mg/kg.

Para el lavado del tracto reproductor de la cobaya se siguió la metodología descrita por Suzuki y col. (2000); que consistió en: 1) rasurar la zona del abdomen y desinfectarla con una solución jabonosa de yodo, 2) colocar las cobayas en decúbito dorsal y realizar una incisión de 4 cm a lo largo de la línea alba, 3) localizar el tracto reproductivo de la cobaya incluyendo los ovarios y 4) extraer el útero y ovarios. El útero y los ovarios fueron colocados en una solución salina buffer de fosfato (PBS) a 37 °C y enriquecida con suero fetal bovino hasta llegar al laboratorio.

Para el lavado de los oviductos y útero se utilizó la misma solución buferada de fosfato. Las estructuras se recolectaron mediante un *flushing* de los oviductos y cuernos uterinos. Este procedimiento consistió en localizar la zona del infundíbulo, abrirlo e introducir una aguja hipodérmica 30 G (0,30 mm de diámetro), fijar la aguja y acoplarla a una jeringa, y lavar por tres ocasiones (Figura 8A) este mismo procedimiento se realizó en los cuernos uterinos (Figura 8B)



**Figura 8.** Proceso de lavado de los oviductos (panel A) y cuernos uterinos (panel B).  
Fuente: autores.

#### **4.2.5. Evaluación del desarrollo morfológico y calidad de estructuras colectadas**

La valoración y clasificación morfológica de las estructuras se realizó siguiendo la metodología descrita por Shi y col. (2000) y Suzuki y col. (2000) que consistió en evaluar las estructuras bajo la luz de un estereomicroscopio con un objetivo 100x, y clasificarlas en primera instancia en ovocitos sin fecundar y embriones; luego de la primera clasificación, se visualizó la morfología del embrión, misma que se evaluó a través de su etapa de desarrollo en relación con el día de la cópula (Shi y col., 2000).

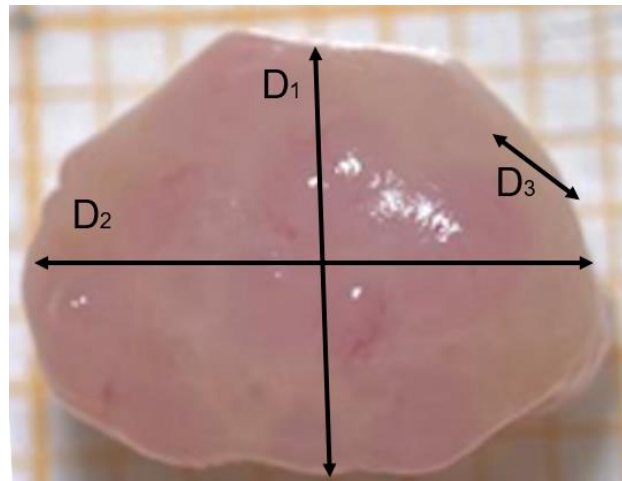
La calidad de los embriones se evaluó siguiendo la clasificación recomendada por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (*IETS, por sus siglas en inglés*) (Stringfellow, 1998; Lonergan y col., 2011), y adaptándolo a nuestro estudio, según las indicaciones de Suzuki y col. (2000) y Suzuki y col. (1993) en estructuras aptas y no aptas.

#### **4.2.6. Volumen ovárico, número y diámetro de cuerpos lúteos y folículos**

Los ovarios recuperados fueron colocados sobre un papel milimétrico y medidos bajo el lente de un estereomicroscopio. Se tomaron fotografías de estos para posteriormente medirlos con el programa informático ImageJ, Java (Figura 9).

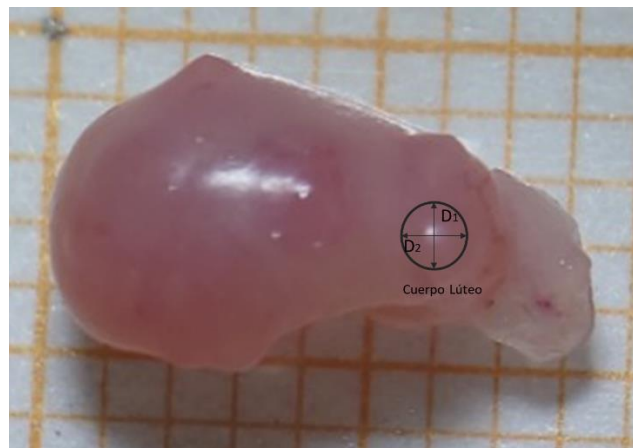
En la superficie ovárica se procedió a cuantificar el número de cuerpos lúteos (CLs), folículos que ovularon y el diámetro de estos para valorar la respuesta al tratamiento superovulatorio.

En este mismo sentido, se calculó el volumen ovárico en  $\text{mm}^3$ , para ello se utilizó la metodología descrita por Penitente y col. (2015), que consistió en medir el ovario en tres planos (largo, ancho y profundidad) como se puede observar en la Figura 9 y posterior aplicar la siguiente formula: **Volumen ovárico ( $\text{mm}^3$ ) =  $0,5 \times D1 \times D2 \times D3$ .**



**Figura 9.** Esquematización de la medición del volumen ovárico.

Finalmente, para determinar el diámetro de los cuerpos lúteos (CL) y folículos, estos se midieron utilizando dos planos: largo x ancho (Figura 10), y se obtuvo la media de las dos dimensiones (**diámetro (mm) =  $(D1+D2) / 2$** ), que se expresó en unidades de mm.



**Figura 10.** Representación de la medición del diámetro del CL.

### 4.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente se analizaron mediante el paquete estadístico STATISTICA® 12.0 (StatSolf, Tulsa, Oklahoma, EE. UU.).

Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos numéricos de todas las variables (muestra menor a 50), como en este caso los datos numéricos no siguieron la distribución normal, fueron transformados a base *Log-10* antes del análisis estadístico paramétrico.

Los efectos de la administración de hMG a diferentes dosis (5,10 y 15 UI/kg/día) sobre la respuesta (número de cuerpos lúteos, folículos y estructuras recolectadas) y características morfométricas ováricas (diámetro de cuerpos lúteos, folículos y volumen ovárico) se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), y para determinar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba Post-Hoc de Diferencia Mínima Significativa (DMS). Los datos presentados en las figuras se expresaron como valores medios  $\pm$  error estándar de la media y los datos presentados en tablas se expresaron como valores medios  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de  $p < 0,05$  y los que estén entre 0,051 y 0,10 se consideraron como tendencia estadística.

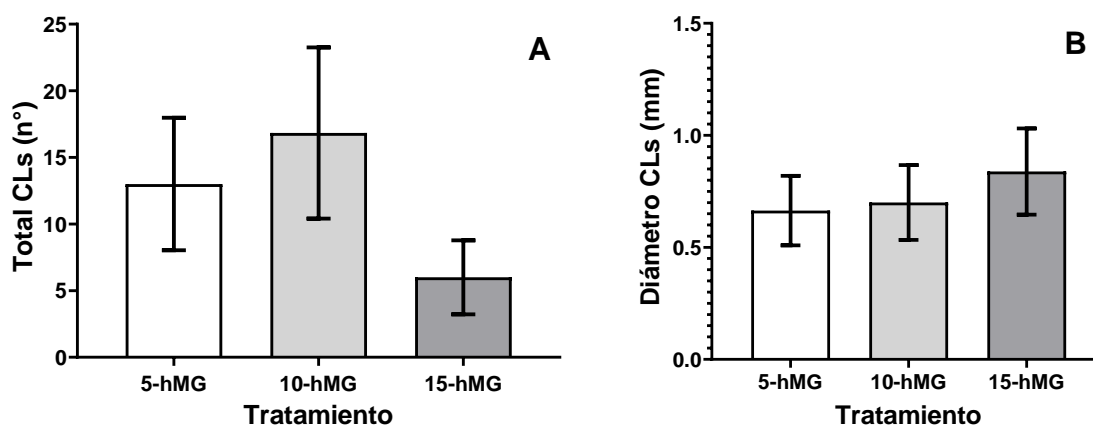


## 5. Resultados

### 5.1. Clasificación de estructuras recuperadas

La respuesta a la administración de la hormona hMG a dosis de 5, 10, 15 UI/kg/día a cobayas, no mostró diferencias estadísticas significativas en el número de CLs observados en la superficie del ovario, ( $13 \pm 4,9$ ;  $16,83 \pm 6,4$  y  $6 \pm 2,8$  Figura 11A;  $p > 0,05$ ) ni en el diámetro de estos (Figura 11B;  $p > 0,05$ ). Asimismo, el número total de estructuras recuperadas (embriones y ovocitos sin fecundar) en el día  $4 \pm 1$ ; no difirió entre grupos ( $7,66 \pm 3,46$ ;  $2,66 \pm 1,11$ ;  $4,33 \pm 2,45$  Tabla 1;  $p > 0,05$ ).

La calidad de las estructuras clasificadas como aptas fue mayor en todos los grupos vs estructuras no aptas (5-hMG:  $9 \pm 3,9$ ; 10-hMG:  $3,5 \pm 0,9$ ; 15-hMG:  $7,33 \pm 2,6$  vs. 5-hMG:  $1 \pm 1$ ; 10-hMG:  $1 \pm 1$ ; 15-hMG:  $2 \pm 1,4$ ) (Tabla1,  $p < 0,05$ ). Todos los grupos 5-hMG; 10-hMG y 15-hMG mostraron una mayor proporción de mórulas ( $5,6 \pm 3,3$ ;  $2,3 \pm 0,9$ ;  $3,5 \pm 1,9$ ) vs. la cantidad de blastocistos ( $1,8 \pm 0,98$ ; 0;  $0,1 \pm 0,1$ ) recolectados en el día del lavado; el total de blastocistos aptos difirió entre los grupos 5-hMG ( $1,83 \pm 0,98$ ) y 10-hMG (0) (Tabla 1;  $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Número de cuerpos lúteos (panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopáusica humana (hMG) a varias dosis.

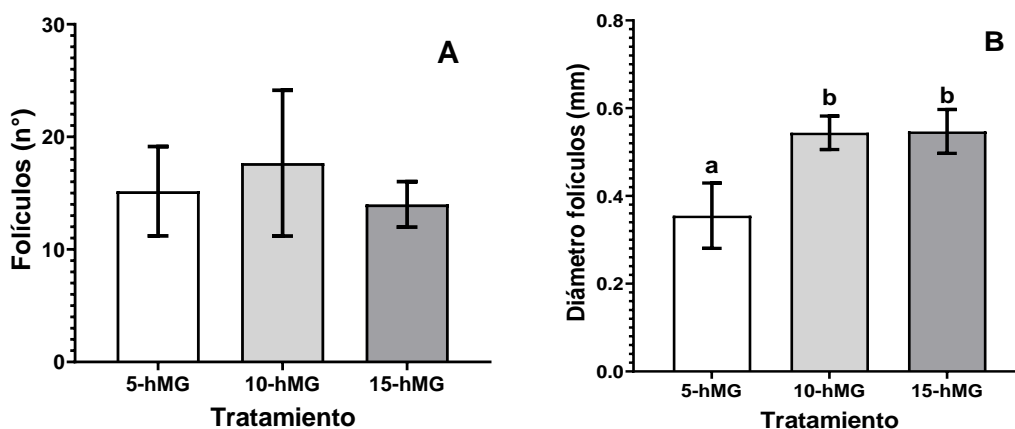
**Tabla 1.** Clasificación de estructuras de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de diferentes dosis de gonadotropina menopáusica humana (hMG).

Trat hMG	N	Est_T	Tipo Est		Cal Est	
			TMor_A	T_Blas	Aptos	No aptos
5UI	6	7,66±8,47 (46)	5,67±8,24 (34)	1,83±2,40 (11)a	9 ±8,68 (45)	1±1 (1)
10UI	6	2,66±2,73 (16)	2,33±2,34 (14)	0 b	3,50±1,91 (14)	1±1 (1)
15UI	6	4,33±6,02 (26)	3,50±4,72 (21)	0,17±0,41 (1)a,b	7,33±4,61 (20)	2±1,41 (4)

Trat hMG = tratamientos de hMG. N = número de cobayas. Est\_T= Estructuras totales. Tipo Est= Tipo de estructuras. TMor\_A = total de mórulas aptas. TBlas = total de blastocistos. Cal Est= Calidad de estructuras. Los valores entre paréntesis corresponden al número de estructuras recuperadas. Diferentes letras minúsculas en la misma columna expresan diferencias significativas (<sup>a-b</sup>, p <0,05).

**5.2. Efectos de la administración de hMG sobre el desarrollo folicular**

El número total de folículos observados en las cobayas el día del sacrificio no difirió entre tratamientos (Figura 12A; p>0,05). Sin embargo, el diámetro de los folículos fue afectado por la dosis administrada de hMG difiriendo significativamente entre grupos. Los grupos que recibieron una dosis más alta de hMG mostraron mayor diámetro folicular en comparación con el grupo de menor dosis (10-hMG: 0,54 ± 0,03; 15-hMG: 0,54 ± 0,05 vs. 5-hMG: 0,35 ± 0,07; Figura 12B; p<0,05).



**Figura 12.** Número de folículos (panel A) y diámetro de folículos (panel B) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de gonadotropina menopaúsica humana (hMG) a varias dosis. Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05).

**5.3. Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas**

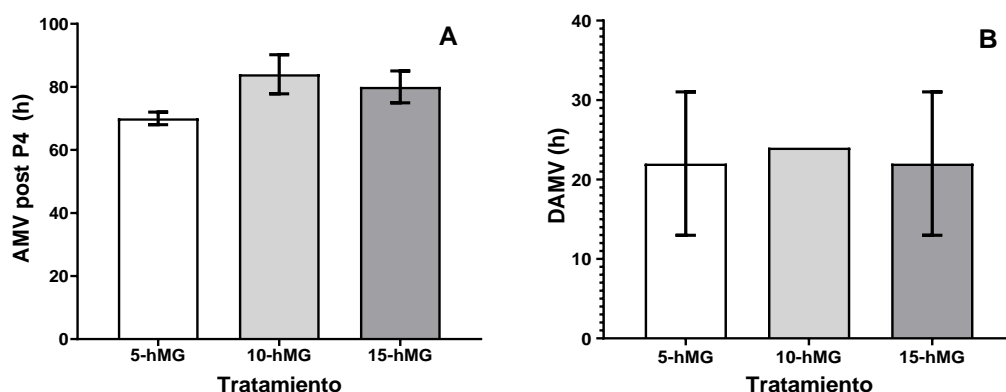
Las diferentes características morfométricas del ovario y de la conducta estral de la cobaya, en las que se incluyen las variables como AMV, número y diámetro de estructuras ováricas, se muestran en la Tabla 2. La apertura de la membrana vaginal (AMV post P<sub>4</sub>) de todas las cobayas incluidas en el estudio (18) después del retiro de la progesterona ocurrió a las 78 ± 12,51 horas (Tabla 5) y esta característica de celo no fue diferente entre los grupos de estudio (5-hMG 70 ± 2,0; 10-hMG 84 ± 6,19; 15-hMG 80 ± 5,06; Figura 13A; p>0,05). En este mismo sentido, la DAMV (h), que fue el tiempo que permaneció abierta la membrana vaginal (horas) desde la aplicación de hMG no difirió significativamente entre los grupos tratados (Figura 13B; p>0,05), por lo tanto, las cobayas demostraron conducta estral en un periodo de tiempo similar y la duración del celo no fue afectado por la dosis de hMG administrada.

**Tabla 2.** Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de diferentes dosis de gonadotropina menopaúsica humana (hMG).

	n	X ± DE	95% del intervalo de confianza para la media	
			Límite inferior	Límite superior
<b>AMV post P<sub>4</sub> (h)</b>	18	78,00±12,51	64,86	75,14
<b>DAMV (h)</b>	18	22,67 ± 6,99	19,19	26,15
<b>VO (mm<sup>3</sup>)</b>	18	70,22 ± 23,90	58,33	82,11
<b>CL (n)</b>	18	11,94 ± 12,30	5,83	18,06
<b>PTCL (mm)</b>	18	0,73 ± 0,40	0,53	0,94
<b>FOL (n)</b>	18	15,61 ± 10,56	10,36	20,86
<b>TFOL (mm)</b>	18	0,48 ± 0,16	0,40	0,56
<b>EST_T (n)</b>	18	4,89 ± 6,21	1,80	7,98

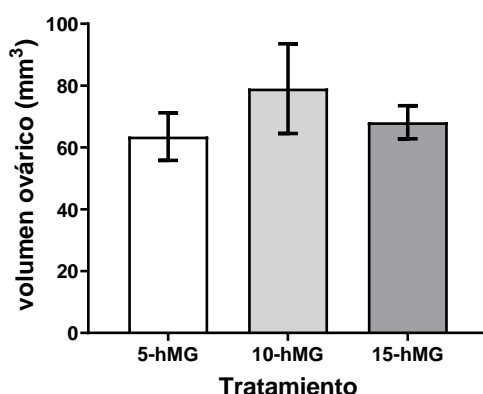
AMV post P<sub>4</sub> (h)= inicio de la apertura de la membrana vaginal (horas) después de la supresión de progesterona. AMV (h) = tiempo que permaneció abierta la membrana vaginal (horas) desde la aplicación de hMG. VO (mm<sup>3</sup>) = volumen ovárico. CL = número total de

cuerpos lúteos. PTCL (mm) = diámetro de cuerpo lúteo. FOL = número total de folículos. TFOL = diámetro de folículo. EST\_T = total de estructuras colectadas.



**Figura 13.** Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal (AMV) de cobayas desde el retiro de la fuente de P4 (Altrenogest) hasta la manifestación de celo (panel A), y tiempo que permaneció abierta la membrana vaginal de cobayas desde el inicio de la aplicación del tratamiento con diferentes dosis de gonadotropina menopáusica humana (hMG) (panel B). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05).

La evaluación de las características morfométricas del ovario demostró que el valor medio del volumen ovárico de todas las cobayas del estudio fue de  $70,22 \pm 5,63 \text{ mm}^3$ . No obstante, la aplicación de diferentes dosis de hMG no mostró un efecto sobre el volumen ovárico entre grupos (Figura 14;  $p > 0,05$ ).



**Figura 14.** Volumen ovárico (VO) de cobayas a las que se les aplicó un tratamiento de superovulación basado en la administración de diferentes dosis de gonadotropina menopáusica humana (hMG). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b p <0,05).

## 6. Discusión

Los hallazgos de este estudio indican que la administración intraperitoneal de hMG, en dosis de 5, 10 y 15 UI/kg/día durante tres días consecutivos, comenzando en el día en que se retiró la fuente de P4 como parte de un protocolo de superovulación, tuvo un impacto directo en la respuesta ovárica. En consecuencia, se observó un aumento en la cantidad de estructuras recuperadas, que incluyen embriones y ovocitos no fecundados en comparación con el grupo testigo de un estudio previo realizado por Lituma y Tapia (2023). Este aumento se asocia con un mayor número de cuerpos lúteos detectados en el día de la recolección ( $4 \pm 1$ , equivalente a  $78 \pm 12,51$  horas). Es relevante destacar que este aumento en la cantidad de estructuras y cuerpos lúteos no está vinculado a la dosis administrada (5-hMG, 10-hMG, 15-hMG) ya que se evidenció de manera uniforme en todos los grupos.

La respuesta superovulatoria en todos los tratamientos fue buena en relación a los datos obtenidos por Lituma y Tapia (2023), medido a través del total de CLs visualizados ( $13 \pm 4,97$ ;  $16,83 \pm 6,42$  y  $6 \pm 2,78$ ; Figura 11A) y al número de embriones recuperados en el día  $4 \pm 1$  que fue proporcional a la cantidad de estos ( $7,66 \pm 3,46$ ;  $2,66 \pm 1,11$ ;  $4,33 \pm 2,45$  Tabla 1), sin diferir entre tratamientos tanto para la cantidad de CLs como de embriones; asimismo, el porcentaje de recuperación de estructuras para los tratamientos 5, 10 y 15 hMG fue del 58,9; 15,8 y 72,1% respectivamente, el porcentaje de recuperación para los tratamientos de menor y mayor dosis esta concordancia con los resultados de otros trabajos (Grégoire y col., 2011; Suzuki y col., 2003; Dorsch y col., 2008); sin embargo, el porcentaje de recuperación de embriones del tratamiento con 10 unidades internacionales de hMG fue el menor de todos. Se ha reportado que en ocasiones el número de ovulaciones medido a través del total de cuerpos lúteos no siempre corresponde con el total de embriones implantados en el día 7 a 8 después de la ovulación, lo que permite sugerir que podría existir un alto porcentaje de óvulos que no lleguen a ser fecundados o que se pierdan después de la ovulación en esta especie por incapacidad del infundíbulo de capturar todos los ovocitos (Araníbar y Echevarría, 2014).

La administración de hMG aumentó la cantidad de embriones en todos los grupos independiente de la dosis suministrada, siendo la media de todos los grupos de  $4,89 \pm 6,21$  embriones vs los  $3 \pm 0,1$  observados en el estudio de Lituma y Tapia (2023), además, en el mismo estudio, encontraron una media de  $6,3 \pm 2,3$  embriones cuando la hormona hMG es administrada por tres días consecutivos iniciando en el día de la suspensión de P4, es decir obtuvieron 4 veces más embriones que cuando la hMG fue aplicada antes del retiro del progestágeno ( $1,6 \pm 1,1$ ).

Estos datos son similares a los reportados por Suzuki y col. (2003); Dorsch y col. (2009); Grégoire y col. (2011); Portelli (2013), quienes obtuvieron  $5,4 \pm 1,56$  oscilando entre 0 y 17;  $5,66 \pm 1,99$ ;  $4,75$ ; y  $5,2$  embriones respectivamente, usando protocolos de superovulación con hMG; siendo estos valores superiores a lo informado en cobayas con ovulación natural ( $3,6 \pm 0,1$ ;  $3,6 \pm 0,9$  para raza Andina y  $2,8 \pm 0,9$  para raza Perú), (Suzuki y col., 1993; Aranibar y Echevarría, 2014). Además, los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con los obtenidos con el uso de otras hormonas como LH ( $5,3 \pm 0,7$ ) (Garza y col., 1984) o antisuero contra LH ( $5,6 \pm 0,6$ ) (Terranova y Greenwald, 1981).

Se ha implementado el uso de hMG en protocolos de superovulación de cobayas, debido a que tiene una gran afinidad por los receptores de FSH de esta especie, además de acelerar la etapa ovulatoria y el crecimiento de los ovocitos si es aplicada durante el periodo preovulatorio (Dorsch y col., 2008). De la misma forma, presenta una gran similitud en sus receptores de FSH con los de la especie humana, en donde ha sido utilizada en tratamientos de infertilidad (Lehert y col., 2010; NG y col., 2021) obteniéndose buenos resultados. Se ha empleado también en protocolos de superovulación en bovinos dando excelentes resultados, debido a que la hMG induce un desarrollo gradual de numerosos folículos, seguido de una ovulación múltiple, con un rápido aumento de P4 y una respuesta equilibrada de la secreción de esteroides ováricos (Lauria y col., 1982). El uso de hMG se justifica por la similitud con la respuesta superovulatoria producida por la FSH, con la ventaja de que la vida media es más larga, por lo que se administra una vez al día. Zhang y col. (2023) encontraron que tanto la FSH como hMG usadas como protocolo superovulatorio en ovejas producen una respuesta similar evidenciándose en términos de estructuras recuperadas; de la misma manera, Khodadadi y col. (2022) obtuvieron resultados similares al realizar la misma evaluación en vacas, razones por las cuales la hMG se convierte en una opción eficiente para el reemplazo de la FSH.

La utilización de hMG ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la infertilidad en seres humanos, así como en la inducción de la superovulación en algunos roedores, entre ellos ratas (Dostal, Whitfield y Anderson, 1996) y ratones (Edirisinghe y col., 1986). Este enfoque busca obtener un mayor número de embriones que posteriormente se emplean en estudios de desarrollo embriológico en diferentes momentos antes de su implantación en el útero. Esto permite analizar las diversas interacciones moleculares y bioquímicas materno-fetales que tienen lugar en esta etapa (Chavatte, 2007). La hMG, al tener una actividad endocrinológica de FSH y LH, se espera que favorezca tanto el reclutamiento y la selección folicular como la ovulación de folículos preovulatorios.

En nuestro estudio, se observó una respuesta superovulatoria excelente vs el grupo testigo de Lituma y Tapia (2023), independientemente de la dosis administrada en cobayas al momento de la supresión del progestágeno. Este hallazgo es consistente con lo informado por estudios previos, como los de Suzuki y col. (2003), Dorsch y col. (2009), Grégoire y col. (2011), y Portelli (2013), quienes emplearon dosis de 5 UI/Kg/día y 15 UI/Kg/día de hMG.

Como se indicó anteriormente, la media de embriones no difirió entre grupos, sin embargo, se encontraron dos estadios de desarrollo embrionario, mórula y blastocisto, estos fueron encontrados en el día  $4 \pm 1$ , después de la apertura de la membrana vaginal (característica visual que es indicativo de celo y el día en el que ocurre la ovulación y fertilización), al evaluar la morfología se observó que la calidad de las estructuras clasificadas como aptas fue mayor en todos los grupos (5-hMG:  $9 \pm 8,6$ ; 10-hMG:  $3,5 \pm 1,9$ ; 15-hMG:  $7,33 \pm 4,6$  vs. 5-hMG:  $1 \pm 1$ ; 10-hMG:  $1 \pm 1$ ; 15-hMG:  $2 \pm 1,4$ ) en comparación con las estructuras no aptas, lo que sugiere que la hMG es una hormona adecuada para superovular cobayas, sin que su dosis o vía de administración tenga un efecto directo sobre la morfología de los embriones, nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Yao y col. (2023) quienes obtuvieron mayor cantidad de embriones aptos en comparación con cobayas superovuladas con FSH y PMSG, estos resultados son contradictorios a los reportados por nuestro grupo de investigación quienes reportaron una mayor cantidad de embriones no aptos (Lituma y Tapia, 2023), lo que podría atribuirse a las condiciones uterinas propias de cada animal.

En el día de la colecta se obtuvieron una mayor proporción de mórulas aptas que blastocistos en los tres grupos de estudio; existen otros trabajos que han reportado que la colecta de embriones de cobaya puede ser realizado entre el día 1 a 5 después de la comprobación de la apertura de la membrana vaginal (Takahashi y Division, 1999; Cañón, 2018), pero el estadio de desarrollo del embrión siempre concuerda con el día de la colecta, es así que en el estudio de Dorsch y col. (2008), pudieron recolectar embriones en los días 2,5; 4,5 y 6,5 después de administrar hMG a dosis de 5UI, y concluyeron que el mejor día para la colecta de embriones está entre los días 4 a 5, sin embargo, en el día 6,5 todavía se siguen encontrando mórulas y blastocistos antes de su implantación.

De la misma manera, los estadios de desarrollo embrionario de 16 a 32 y más de 32 células se los puede obtener cuando se realiza el *flushing* entre el día 4 y 5 (Takahashi y Division, 1999), los estadios de desarrollo previamente descritos concuerdan con los encontrados en nuestro estudio, lo que indica que el día que se realizó el lavado de oviductos y útero fue el adecuado para obtener estructuras de buena calidad antes de su implantación.

De acuerdo con Dorsch y col (2008), el uso de hMG puede acelerar de forma variable el desarrollo embrionario, razón por la cual se encontraron más mórulas en los días de colecta, lo cual supone que los embriones podrían transitar más rápido en los oviductos de cobayas sometidas a tratamientos superovulatorios.

El momento de la visualización de la AMV fue considerado como el día de inicio de celo, momento del apareamiento y la etapa que precedió a la ovulación. En nuestro estudio la AMV después del retiro de la fuente de P4 no difirió entre los grupos (5-hMG  $70\pm 2,0$ ; 10-hMG  $84\pm 6,19$ ; 15-hMG  $80\pm 5,06$ ), en este sentido, Wilson y col. (2020) demostraron que la AMV completa se produce dentro de las 24 a 72h luego de la revisión diaria de la membrana vaginal y está acompañada de secreciones vaginales; asimismo, Grégoire y col. (2012) llevaron a cabo la administración de un progestágeno sintético (Altrenogest), a una dosis de 0,22 mg/kg durante un período de 20 días. Como resultado, todas las cobayas exhibieron signos de celo aproximadamente 4 a 5 días después de retirar la fuente de progesterona, lo cual se confirmó mediante la observación del comportamiento de marcaje vaginal (AMV) y la receptividad hacia el macho. Por ende, a pesar de la falta de diferencias significativas en la AMV debido a la aplicación de hMG, se puede concluir que la administración diaria de progesterona por vía oral logró sincronizar el celo en las cobayas, independientemente de si se utiliza o no la hormona para inducir la superovulación. Además, se señala que la manifestación del celo está directamente vinculada al desarrollo de folículos y puede coincidir con los niveles elevados de P4, los cuales podrían influir en el retraso del desarrollo de los folículos (Grégoire y col., 2012; Wilson y col., 2020).

El diámetro de los folículos fue mayor en los tratamientos con dosis más altas de hMG (10-hMG  $0,54\pm 0,38$ ; 15-hMG  $0,54\pm 0,50$  vs. 5-hMG  $0,35\pm 0,74$ ), estos resultados guardan relación con lo obtenido por Iglesias y Guamán (2023), donde reportaron un tamaño de folículos antrales entre 0,5 – 1mm después del retiro de la fuente de progesterona.

La duración del celo no fue afectada por la administración de hMG; este efecto se ha visualizado con el uso de otros métodos de superovulación como la inmunización contra inhibina en donde se produce un efecto superovulatorio sin afectar la duración del ciclo estral (Shi y col., 2000b), asimismo con el uso de antisuero contra LH (Terranova y Greenwald, 1981).



## Conclusiones

La administración intraperitoneal de hMG a diferentes dosis (5, 10,15 UI/kg) durante tres días consecutivos, iniciando el día de la supresión de progesterona 0, y los días 1 y 2 después del retiro de P4; produjo un efecto en la respuesta superovulatoria, sin embargo, no se evidenció un efecto sobre el número y diámetro de cuerpos lúteos, entre los diferentes grupos.

El número de las estructuras clasificadas como aptas fue mayor en todos los grupos en relación con las no aptas, en el día de la colecta se encontró un mayor número de embriones en estadio de mórula.

No hubo efecto de la dosis administrada de hMG en las características morfológicas de los ovarios.

## Referencias

- Aliaga, L., Moncayo, R., Rico, E., y Caycedo, A. (2009). *Producción de cuyes*. Perú: Fondo Editorial UCSS.
- Alviggi, C., Alessandro C., Pasquale R., Raffaele R., Alessandra A., y Giuseppe De Placido. (2018). Drugs Used for Controlled Ovarian Stimulation. *Encyclop Reprod*, 9–15. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64819-5.
- Araníbar, E., y Echevarría, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Rev Investig Vet Perú*, 25(1). doi:<https://shorturl.at/jtvNQ>
- Avilés, D.F., Landi, V., Delgado, J.V., y Martínez, A.M. (2014). El pueblo ecuatoriano y su relación con el cuy. En: *Ecuadorian people and their relationship with the guinea pig*. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, 4:38-40. doi:[shorturl.at/iqw18](https://shorturl.at/iqw18)
- Bacha, W.J., y Bacha, L.M. (2012). *Color Atlas of Veterinary Histology*. 3rd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Banks, W. (1996). *Histología Veterinaria Aplicada*. 2da ed. México: El Manual Moderno.
- Bearden, J., y Fuquay, J.W. (1982). *Reproducción animal aplicación*. México: El Manual Moderno
- Bland, K. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrus cycle. *Reproduction*, 60(1): 73-76. doi:<https://shorturl.at/mtz11>
- Bó, G.A. y Mapletoft, R.J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reprod*, 10(3): 344-348. doi:<https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a604cf7783717068b46a2/pdf/animreprod-10-3-344.pdf>
- Carmo, M. T., Losinno, L., Aquilar, J. J., & Araujo, G. H. M. (2006). Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. *Animal Reprod Sci*, 94(1–4), 337–339. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.080>
- Chauca, L. (1997). Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). *FAO*, 138. doi:<http://www.fao.org/docrep/W6562S/W6562S00.htm>
- Chavatte, P. y Guillomot, M. (2007). Comparative implantation and placentation. *Gynecol Obst Inves*, 64(3): 166–174. doi:<https://doi.org/10.1159/000101742>

- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E., Bromage, N., Bunyan, J., Erhardt, W., Flecknell, P., Gregory, N., Hackbarth, H., Morton, D., y Warwick, C. (1996). Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte2. doi:<https://sea.umh.es/files/2011/07/eutanasia2.pdf>
- Dorsch, M., Glage, S., y Hedrich, H. (2008). Collection and cryopreservation of preimplantation embryos of *Cavia porcellus*. *Laboratory Animal*, 42 (4): 489–94. doi:10.1258/la.2007.007011
- Dostal, L.A., Whitfield, L.R., y Anderson, J.A. (1996). Fertility and General Reproduction Studies in Rats with the HMG-CoA Reductase Inhibitor, Atorvastatin. *Toxicol Sci*, 32(2): 285–92. doi:<https://doi.org/10.1006/faat.1996.0132>
- Edirisinghe, W.R., Law, H.Y., Ng, S.C., Chia, C.M., y Ratnam, S.S. (1986). Superovulation of mice with human menopausal gonadotropin or pure follicle-stimulating hormone in combination with human chorionic gonadotropin and the effects of oocyte aging on in vitro fertilization. *J Vitro Fertil Embryo Transf*, 3(5): 314–8. doi:<https://doi.org/10.1007/bf01133392>
- Felipe A.E., y Masson P.G. (2006). Un modelo descriptivo del sistema reproductor hembra coipo (*Myocastor coypus*) I: el ovario. *REDVET*. VI(12): 1-22. doi:<https://shorturl.at/gvIz8>
- Fernández, T., Suárez, G., y Clapés, S. (2021). Protocolo para la citología vaginal de ratas de laboratorio. *Rev Habanera Cienc Med*, 20(3). doi:<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7944264>
- Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strobec, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P., y Ross, P.J. (2019). Reviwe: recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5): 991-1004. doi:<https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Fesseha, H., y Degu, T. (2020). Estrus detection, estrus synchronization in cattle and it's economic importance. *Intern J Vet Res*, 3(1): doi:1001. <https://bit.ly/3Smv0fy>
- Garza, F., Shaban, M., y Terranova, P. (1984). Luteinizing hormone increases the number of ova shed in the cyclic hamster and guinea-pig. *J Endocr*, 101: 289-298. doi:10.1677/joe.0.1010289

- Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M., y Joly, T. (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenol*, 78(4): 842–847. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.034.
- Grégoire, A., Peredo, F., León, S., Huamán, E., Allard A., y Joly, T. (2011). First successful pregnancy after embryo transfer into synchronized females in Guinea pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Fertility and Development*, 24: 170. <https://doi.org/10.1071/RDv24n1Ab115>.
- Grégoirie, A. (2012). *Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (Cavia porcellus): production et congélation des embryons* [tesis de posgrado, Université de Lyon]. Repositorio digital <https://theses.hal.science/tel-00981743/document>
- Hargaden, M., y Singer, L. (2012). Anatomy, physiology, and behavior. En *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Academic Press, 575–602.
- Hasegawa, A., Mochida, K., Inoue, H., Noda, Y., Endo, T., Watanabe, G., y Ogura, A. (2016). High-yield superovulation in adult mice by anti-inhibin serum treatment combined with estrous cycle synchronization. *Biol Reprod*, 94(1): 1-8. doi:<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134023>
- Hasegawa, A., Mochida, K., Ogonuki, N., Hirose, M., Tomishima, T., Inoue, H., y Ogura, A. (2017). Efficient and scheduled production of pseudo pregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization. *J Reprod Develop*, 63(6): 539-545. doi:<https://doi.org/10.1262%2Fjrd.2017-068>
- Hutz, R., Bejvan, S.M., Durning, M., y Dierschke, D.J. (1990). Changes in follicular population, in serum estrogens and progesterone, and in ovarian steroid secretion in vitro during the guinea pig estrous cycle. *Biol Reprod*, 42: 266–72. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2110835/>
- Iglesias, K.P., y Guamán, P.M. (2023). *Características ováricas y hormonales de la cobaya en diferentes etapas del ciclo estral* [tesis de pregrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio digital <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/42911/1/Trabajo-de-Titulaci%c3%b3n.pdf>

- Khodadadi, A., Niasari-Naslaji, A., Nikjou, D., y Mohammadi, B. (2022). Superovulation of high-producing Holstein lactating dairy cows with human recombinant FSH and hMG. *Theriogenol*, 191: 239–44. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.08.010.
- Kosaka, T., y Takahashi., K. (1988). Effect of Pregnant Mare's Serum Gonadotropin on Increased Ovulation in Guinea Pigs with Synchronized Estrous Cycle. *Exp Animals*, 38 (1): 81-83. doi:10.1538/expanim1978.38.1\_81
- Kühnel, W., y Mendoza, A.S. (1992). Scanning electron microscope investigations on the vaginal epithelium of the guinea pig during the estrous cycle. *Arch Histol Cytol*, 55: 205–210. doi: 10.1679/aohc.55.suppl\_205.
- Lauria, A., Oliva, O., Genazzani, A.R., Cremonesi, F., Crotti, S., y Barbetti, M. (1982). Improved method to induce superovulation in cattle using Human Menopausal Gonadotropin (hMG). *Theriogenol*, 18(3): 357–64. doi: 10.1016/0093-691X(82)90013-9.
- Lehert, P., Schertz, J.C., y Ezcurra, D. (2010). Recombinant human follicle-stimulating hormone produces more oocytes with a lower total dose per cycle in assisted reproductive technologies compared with highly purified human menopausal gonadotrophin: A meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*, 8: 1–12. doi:https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-112
- Li, J., Wang, W., y Shi, F. (2015). Induction of follicular luteinization by equine chorionic gonadotropin in cyclic guinea pigs. *Journal of Zhejiang University: Sci B*, 16(12): 980–90. doi: 10.1631/jzus.B1500046.
- Lilley, K.G., Epping, R.J., y Hafner, L.M. (1997). The Guinea Pig Estrous Cycle: Correlation of Vaginal Impedance Measurements with Vaginal Cytologic Findings. *Laboratory Animal Sci*, 47(6):632–37. PMID: 9433700.
- Lituma, J.L., y Tapia, D.E. (2023). *Efecto de la aplicación de un tratamiento a base de hormona menopáusica humana (hMG) en diferentes tiempos, sobre la respuesta ovárica de cobayas sincronizadas* [tesis de pregrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio digital <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/42384>
- Lonergan P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenol*, 76(9): 1594–601. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.012>

- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., y Tanno, A.P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, 62(4A): 609–14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008
- Muñoz, I., Rodríguez de Sadia, C., Gutiérrez, A., Blánquez, M., y Pintado, B. (1994). Comparison of superovulatory response of mature outbred mice treated with FSH or PMSG and developmental potential of embryos produced. *Theriogenol*, 41(4): 907-914. 10.1016/0093-691x(94)90506-e
- NCR. (1995). Guinea Pig Diet 5025. St. Louis.
- Ng, E.H., Lau, E.Y., Yeung, W.S., y Ho, P.C. (2021). HMG is as good as recombinant human FSH in terms of oocyte and embryo quality: a prospective randomized trial. *Human Reprod*, 16(2): 319–325. doi:<https://doi.org/10.1093/humrep/16.2.319>
- Noonan, D. (1994). The Guinea Pig (*Cavia porcellus*). En *Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching News*. Vol. 7. doi:<https://bit.ly/47ekWcB>
- Norman, A.W., y Henry H.L. (2015). Hormones of Pregnancy, Parturition and Lactation. En *Hormones*, 297– 320 (Third Edition). doi:<https://bit.ly/3FZuM6N>
- Pallares, P., y Gonzalez, A. (2009). A new method for induction and synchronization of oestrus and fertile ovulations in mice by using exogenous hormones. *Laboratory Animal*, 43(3): 295–9. doi:10.1258/la.2008.008056
- Peddie, M.J. (1980). Follicular development in the adult guinea-pig and responses to human chorionic gonadotrophin. *J Endocrinol*, 85(1): 9–16. doi: 10.1677/joe.0.0850009
- Penitente, J., Jimenez, C., Zolini, A., Carrascal, E., Azevedo, J., y Silveira, C. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *J Animal Sci*, 86(2): 148–52. doi: 10.1111/asj.12261
- Portelli, C. (2013). *Superovulation and embryo recovery in the Guinea pig* [thesis, Universidad Szent Istvan]. Repositorio digital. <http://www.huveta.hu/handle/10832/973>
- Poyser, N.L. (1984). Prostaglandin production by the uterus of the non-pregnant and early pregnant guinea-pig. *Animal Reprod Sci*, 7(1–3): 1–30. doi: 10.1016/0378-4320(84)90026-5.

- Rood, J.P., y Weir, B.J. (1970). Reproduction in female wild guinea-pigs. *J Reprod Fertil*, 23(3): 393–409. DOI: 10.1530/jrf.0.0230393
- Sadeu, J.C., Adriaens, I., Cortvrindt, R., y Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenol*, 68(9): 1228–39. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.028.
- Salcedo, J. M. (2016). *Sicronización de celo en cuyes (Cavia porcellus) mediante el uso de hormonas y su efecto sobre la tasa reproductiva*, [tesis de pregrado, Universidad Alas Peruanas]. Repositorio digital. <https://hdl.handle.net/20.500.12990/1389>
- Salehnia, M., y Zavareh, S. (2013). The effects of progesterone on oocyte maturation and embryo development. *Int J Fertil Steril*, 7(2): 74–81. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24520467>
- Shettigara, P.T., Murphy, B.D., Humphrey, W.D., Fraser, A.F., y Mapletoft, R.J. (1981). Effects of active immunization against gonadotropin releasing hormone on serum luteinizing hormone, progesterone levels and estrous cycles in the guinea pig. *Animal Reprod Sci*, 4: 73–81. :doi:[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(81\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(81)90022-1)
- Shi, F., Mochida, K., Suzuki, O., y Matsuda, Ju. (2000a). Development of Embryos in Superovulated Guinea Pigs following Active Immunization against the Inhibin a-Subunit. *Endocrine J*, 47(4): 451–459. doi:10.1507/endocrj.47.451
- Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., Watanabe, G., Tsonis, C., Suzuki A., y Taya, K. (2000b). Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *J Reprod Fertil*, 118: 1-7. doi:10.1530/jrf.0.1180001
- Shi, F., Ozawa, M., Yang, K.P., Trewin A.L., Hutz, R., Watanabe, G., y Taya, K. (1999). Secretion of ovarian inhibin and its physiologic roles in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion during the estrous cycle of the female guinea pig. *Biol Reprod*, 60(1): 78–84. doi: 10.1095/biolreprod60.1.78.
- Silva de Matos, A., Kugelmeier, T., de Araújo Guimarães, D.A., y Marruaz da Silva, K.S. (2022). Early puberty in short-haired Guinea pigs kept in laboratory animal facilities. *Animal Reproduction*, 19(1): 1–10. doi: 10.1590/1984-3143-AR2021-0068.
- Stringfellow D.A. (1998). Recommendations for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos. In: Stringfellow D.A and Seidel S.M eds. *Manual for the International Embryo Transfer Society*. 3rd edition. Savoy, IL, 79-84.

- Sugano, M., Takano, T., Sato, N., Ohsaki, J., y Watanabe, S. (1995). Effects of Human Menopausal Gonadotrophin (hMG) for superovulation in Japanese Black Cattle. *J Vet Med Sci*, 57(6): 1113–15. doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.57.1113>.
- Suzuki, O., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y., y Matsuda, J. (2003). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Molecular Reprod Develop*, 64(2): 219–225. doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.10242>
- Suzuki, O., Ogura, A., Asano, T., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., y Oike, M. (1993). Development of preimplantation guinea-pig embryos in serum-free media. *Reprod Fertil Develop*, 5(4): 425–432. doi: <https://doi.org/10.1071/RD9930425>
- Takahashi, W. y Division, T. (1999). Conception rate with and embryo development in guinea pigs with synchronized estrus induced by progesterone implant. *Jikken Dobutsu*, 43(1): 95–99. doi: [https://doi.org/10.1538/expanim1978.43.1\\_95](https://doi.org/10.1538/expanim1978.43.1_95)
- Taylor, D., y Lee V. (2012). Guinea Pigs as Experimental Models. En *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*: 705–744. doi:10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0
- Terranova, P.F., y Greenwald, G.S. (1981). Increased ovulation rate in the cyclic guinea-pig after a single injection of an antiserum to LH. *J Reprod Fertil*, 61(1): 37–42. doi: 10.1530/jrf.0.0610037.
- Ueda, H., Kosaka, T., y Takahashi, K. (1998). Intraperitoneal Insemination of the Guinea Pig with Synchronized Estrus Induced by Progesterone Implant. *Experimental Animals*, 47(4): 271-275. <https://bit.ly/3seso8G>
- Wang, J., Liu, Z., Sun, Q., Xia, S., Cui, J., Yang, L., An, L., Zhang, J., Su, L., Su, Y., y Du, F. (2019). Combined treatment with cysteamine and leukemia inhibitory factor prootes guinea pig oocyte meiosis in vitro. *American J Translational Res*, 11(12): 7479-7491. doi: <https://bit.ly/46SvQFf>
- Wang, S., Han, L., Ahmad, S., Cao, S.X., Xue, L.Q., Xing, Z.F., Feng, J.Z., Liang, A.X., y Yang, L.G. (2012). Effect of a DNA vaccine harboring two copies of inhibin  $\alpha$  (1-32) fragments on immune response, hormone concentrations and reproductive performance in rats. *Theriogenol*, 78(2): 393–401. doi: <https://bit.ly/46Us3XN>



- Wilson, R.L., Lampe, K., Matuszewski, B.J., Regnault, T.R.H., y Jones, H.N. (2020). Time mating guinea pigs by monitoring changes to the vaginal membrane throughout the estrus cycle and with ultrasound confirmation. *Methods Protocols*, 4(3). doi: 10.3390/mps4030058.
- Wisel, M.S., Datta J.K., y Saxena, R.N. (1991). Changes in the levels of protein and steroid hormones in the plasma and steroid hormone receptors in the uterus of normal cycling guinea pigs. *Steroids*, 56: 148–53. doi: 10.1016/0039-128x(91)90065-4
- Yao, M., Gong, Z., Xu, W., Shi, X., Liu, X., Tang, Y., Xuan, S., Su, Y., Xu, X., Luo, M., y Sui, H. (2023). Establishment and optimization of an in vitro guinea pig oocyte maturation system. *PLoS ONE*, 18: 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0285016.
- Yuan, S., Wang, Z., Peng, H., Ward, S.M., Hennig, G.W., Zheng, H., y Yan, W. (2021). Oviductal motile cilia are essential for oocyte pickup but dispensable for sperm and embryo transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118(22): 1–11. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.2102940118>
- Zhang, J., Lu, X., Liu, Y., Wu, X., Yu, Y., y Li, X. (2023). Potential role for human menopausal gonadotropin in ovine superovulatory regimens during the breeding season. *Reprod Domestic Animals*, 58: 726–33. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.14342>.

## 9. Anexos

Anexo A. Cobayas (*cavia porcellus*) en el protocolo de adaptación a lo largo de 10 días.



Anexo B. División de los grupos experimentales.



Anexo C. Administración de progesterona 0,22mg/kg a las cobayas durante 15 días.



Anexo D. Adecuación de jaulas individuales e introducción del macho relación 2:1.



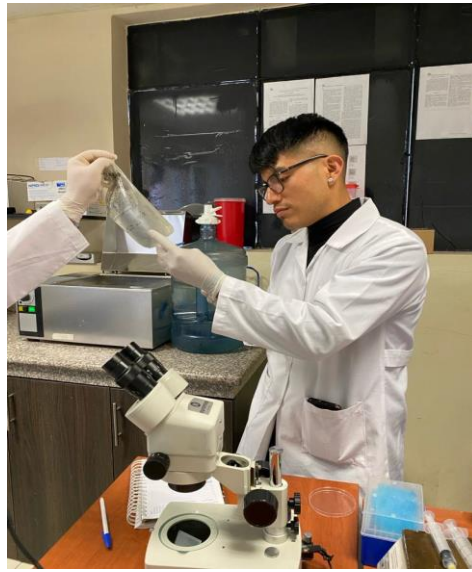
Anexo E. Verificación de la membrana vaginal cerrada



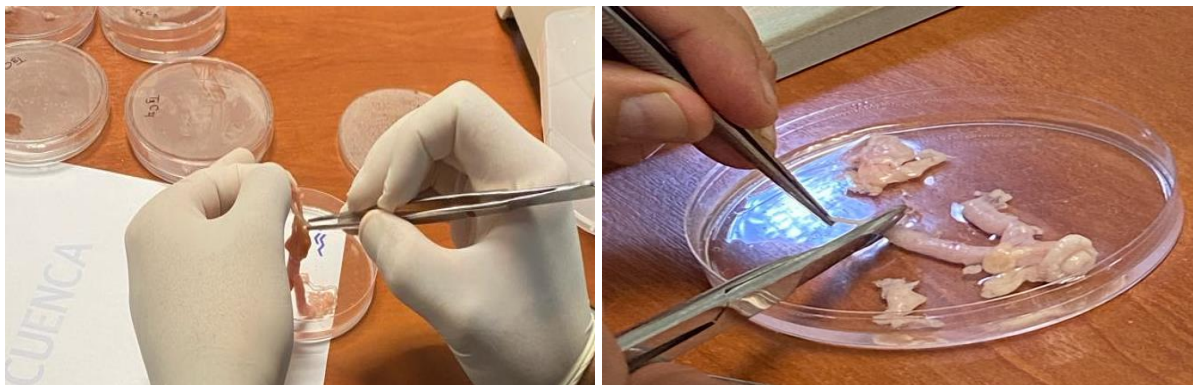
Anexo F. Revisión de la membrana vaginal abierta



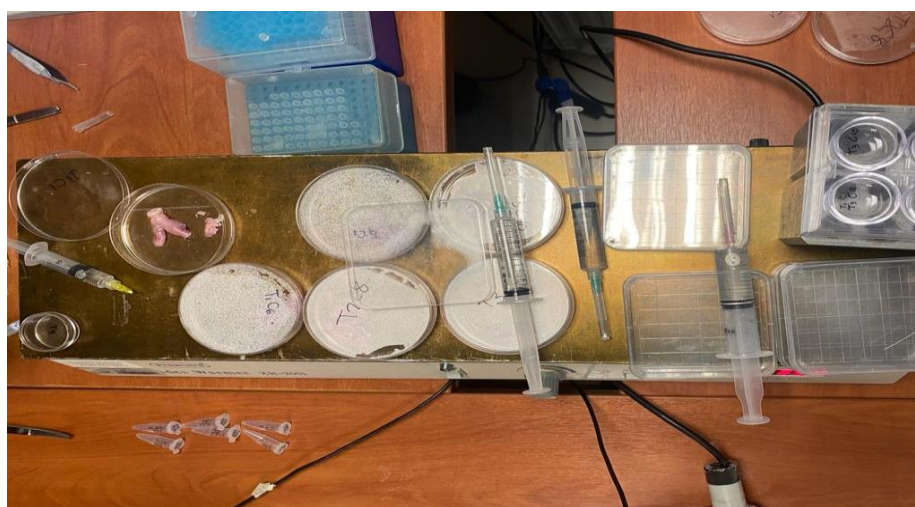
## Anexo G. Preparación del suplemento para mantenimiento de útero, oviductos y ovarios



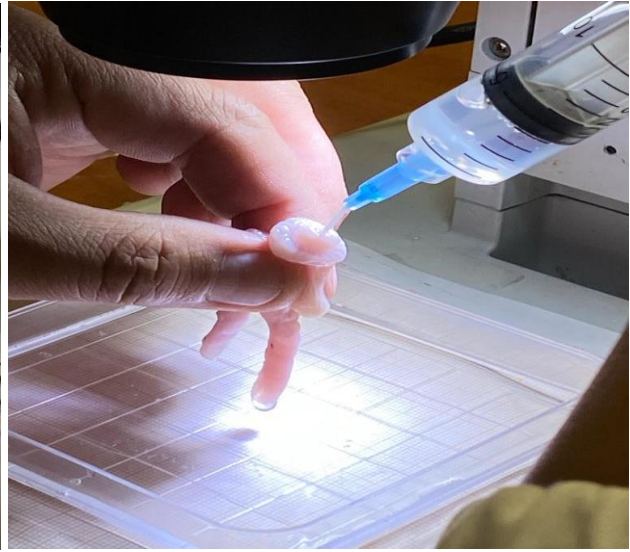
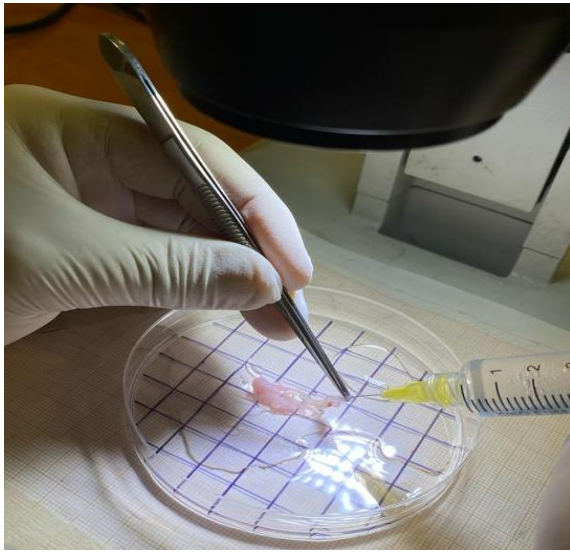
## Anexo H. Limpieza de oviductos



## Anexo I. Conservación de temperatura en placa térmica para el lavado.



## Anexo J. Lavado de oviductos y útero

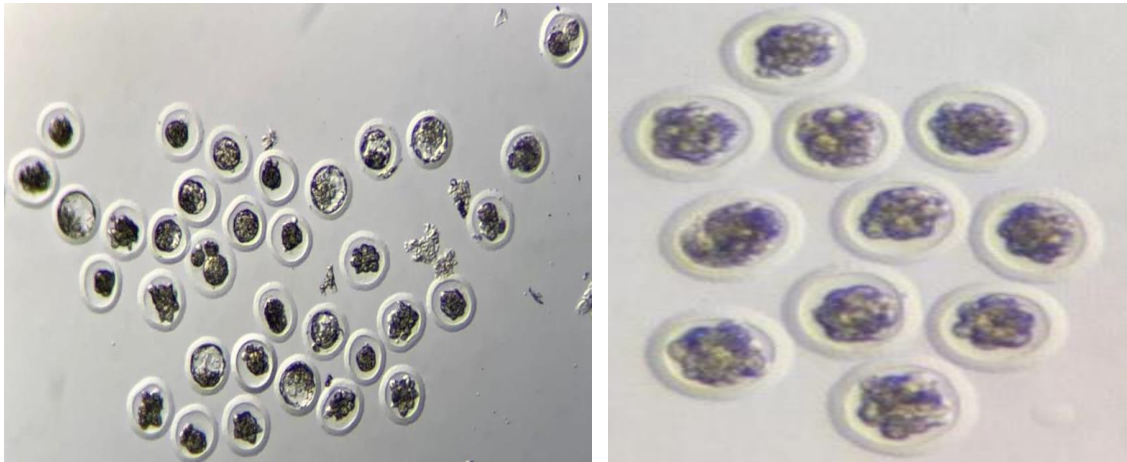


## Anexo K. Conteo de cuerpos lúteos y folículos



## Anexo L. Recuperación de estructuras





Anexo M. Medida del diámetro de folículos, cuerpos lúteos y ovarios mediante el software ImageJ.

