

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Implementación de un protocolo de maduración *in vitro* de
ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*)**

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

Autores:

Andrea Belén Zhinin Criollo

CI: 0106048291

Correo electrónico: www.zhininandrea@hotmail.com

Pedro Alexis Buñay Ortiz

CI: 0302945480

Correo electrónico: alexpb087@gmail.com

Director:

Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga Ph.D.

CI: 0102635463

Cuenca, Ecuador

17 de junio del 2022

Resumen:

Una de las estrategias que se utilizan a nivel mundial para la multiplicación y conservación del material de alto valor genético o en peligro de extinción es la producción de embriones *in vitro*. El objetivo fue evaluar un protocolo de maduración *in vitro* de complejos cúmulo-ovocitos (COC's) de cobayas (*Cavia porcellus*). Se obtuvieron 760 COC's correspondientes a 52 ovarios, mediante la técnica de Slicing. Los COC's fueron seleccionados de acuerdo a la metodología descrita por Hawk y Wall (1994) y modificada por Ayala et al. (2019) para COC's de bovinos (tipo A; B; C). Una vez obtenidos los COC's de cada tipo, el 20% fue utilizado para morfometría pre-maduración, otro 20% se utilizó como testigo y paso directamente al proceso de maduración *in vitro* (MIV) por 24 h. El restante 60% se aplicó la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) y se determinó el crecimiento (BCB+) y aquellos que aún estaban en crecimiento (BCB-), luego cada tipo y sus subgrupos (BCB+ y BCB-) fueron madurados *in vitro* durante 24 h. Finalmente se estableció el porcentaje de maduración y morfometría post-maduración. Los ovocitos recuperados fueron clasificados morfológicamente en un 35,8% de COC's de tipo A, un 30,9% B y el 33,3% de tipo C. Se determinó que el 71,6%, 60%, 63,5% de COC's tipo A, B y C respectivamente reaccionaron a la prueba BCB. Al realizar la morfometría se estableció que los COC's de Tipo A y B (aptos), fueron más grandes que los COC's no aptos (tipo C), con diferencia estadística. Los COC's del grupo testigo de tipo A, maduraron en un 40,4%, los tipos B 31,7% y tipo C un 18,2%. Sin embargo, el porcentaje de maduración nuclear se vio afectado cuando los COC's de los tipos A; B y C, fueron sometidos a la prueba del BCB y posteriormente colocados a madurar por 24 horas. En conclusión: el medio de maduración usado permitió que los ovocitos llegaran a metafase II; sin embargo, estos porcentajes están muy por debajo de lo esperado.

Palabras claves: Azul brillante de cresilo. Cobaya. Maduración *in vitro*. Morfometría. Ovocitos.

Abstract:

One of the strategies used worldwide for the multiplication and conservation of material of high genetic value or in danger of extinction is the production of *in vitro* embryos. The objective was to evaluate an *in vitro* maturation protocol for cumulus-oocyte complexes (COC's) from guinea pigs (*Cavia porcellus*). 760 COC's corresponding to 52 ovaries were obtained using the Slicing technique. The COCs were selected according to the methodology described by Hawk and Wall (1994) and modified by Ayala et al. (2019) for bovine COC's (type A; B; C). Once the COC's of each type were obtained, 20% was used for pre-maturation morphometry, another 20% was used as a control and went directly to the *in vitro* maturation process (IVM) for 24 h. The remaining 60% was applied the Brilliant Cresyl Blue (BCB) test and growth (BCB+) and those that were still growing (BCB-) were determined, then each type and its subgroups (BCB+ and BCB-) were matured. *in vitro* for 24 hours. Finally, the percentage of maturation and post-maturation morphometry were established. The recovered oocytes were morphologically classified as 35.8% type A COC's, 30.9% B and 33.3% type C. It was determined that 71.6%, 60%, 63.5% of COC's type A, B and C respectively reacted to the BCB test. When performing the morphometry, it was established that the COC's of Type A and B (suitable) were larger than the unsuitable COC's (type C), with a statistical difference. The COC's of the control group of type A, matured in 40.4%, types B 31.7% and type C 18.2%. However, the percentage of nuclear maturation was affected when COC's of types A; B and C, were subjected to the BCB test and subsequently matured for 24 hours. In conclusion: the maturation medium used allowed the oocytes to reach metaphase II; however, these percentages are much lower than expected.

Keywords: Cresyl brilliant blue. Guinea pig. *In vitro* maturation. Morphometry. Oocytes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen:	2
Abstract:.....	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tablas.....	8
Índice de Anexos	9
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo General	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	20
3.1 Morfofisiología del aparato reproductor del cobayo hembra	20
3.1.1 Ovarios.....	20
3.1.2 Oviductos.	20
3.1.3 Útero	20
3.1.4 Cuello uterino	20
3.1.5 Vagina.....	21
3.1.6 Vulva	21
3.2 Pubertad	21
3.3 Ciclo estral	21
3.3.1 Proestro.....	23
3.3.2 Estro.....	23
3.3.3 Metaestro	23
3.3.4 Diestro.....	23
3.4 Ovogénesis y foliculogénesis	23

3.5	Avances biotecnológicos <i>in vitro</i> en cobayos	25
3.5.1	Recolección de COC´s en mataderos	26
3.5.2	Recuperación del Complejo Cúmulus Ovocito (COC´s).....	27
3.5.3	Características morfológicas de COC´s.....	27
3.5.4	Clasificación morfológica de COC´s	28
3.5.5	Evaluación de la competencia ovocitaria mediante la tinción de Azul Brillante de Cresilo (BCB)	30
3.5.6	Medios de maduración	31
3.5.7	Maduración de los ovocitos	32
3.5.8	Prueba de Hoechst (fluorocromo).....	33
3.5.9	Morfometría ovocitaria.....	34
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1	Materiales.	36
4.1.1	Materiales físicos:.....	36
4.1.2	Materiales biológicos	36
4.1.3	Materiales químicos.....	36
4.1.4	Materiales de Laboratorio	37
4.2	Métodos	38
4.2.1	El área de estudio	38
4.2.2	Ubicación del lugar de la experimentación	38
4.3	Metodología del estudio	38
4.3.1	Recolección de ovarios para el estudio	38
4.3.2	Preparación de ovarios.....	39
4.3.3	Colecta de COC´s de los ovarios de cobaya mediante la técnica de cortes (Slicing).....	39
4.3.4	Unidad experimental.....	40
4.3.5	Clasificación de COC´s	40
4.3.6	Caracterización morfométrica de COC´s	41

UCUENCA

4.3.7	Prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB)	42
4.3.8	Maduración de ovocitos	42
4.3.9	Determinación de la morfometría de los ovocitos post-maduración	43
4.3.10	Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la maduración <i>in vitro</i>	43
4.4	Análisis estadístico	44
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1	Recuperación de COC's de los ovarios de cobaya mediante la técnica de cortes	45
5.2	Clasificación morfológica de los COC's	45
5.3	Prueba del Azul Brillante de Cresilo	45
5.4	Morfometría del ovocito en cada uno de los tipos de COC's	47
5.5	Maduración de ovocitos	48
5.6	Morfometría de los ovocitos post-maduración <i>in vitro</i>	49
5.6.1	Diámetro total de ovocito (DT)	49
5.6.2	Espesor de la zona pelúcida (ZP)	50
5.6.3	Diámetro del citoplasma del ovocito (Cit)	50
5.6.4	Tamaño de espacio perivitelino (EP)	51
5.6.5	Volumen del ovocito	51
6.	CONCLUSIONES	52
7.	Bibliografía	53
8.	Anexos	63

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo estral del conejillo de indias. CL: Cuerpo lúteo; FSH: Hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante (Gregoire, 2012)	22
Figura 2. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.....	38
Figura 3: Mesa de trabajo para la obtención de COC's de cobaya.....	39
Figura 4: Valoración de la clasificación morfológica de los complejos cúmulus ovocitos (Tipo: A, B y C) mediante la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB+ y BCB-). Letras diferentes=indican diferencia estadística entre columnas (BCB+). Prueba de Chi cuadrado (a-b, $p < 0,05$).....	46
Figura 5: Porcentaje de maduración nuclear (GV=vesícula germinal; MII=metafase II), en el 20% de COC's tipo A, B y C que no recibieron la prueba del BCB (Testigo).....	48
Figura 6: Porcentaje de maduración nuclear (GV=vesícula germinal; MII=metafase II), en los diferentes tipos de COC's (A, B y C), que reaccionaron a la prueba del BCB (BCB+ y BCB-).	49

Índice de Tablas

Tabla 1. Metodología de valoración de COC's.....	40
Tabla 2. Media y desviación estándar de las variables morfométricas del ovocito de cobaya en los COC's de tipo A, B y C, premaduración.	47
Tabla 3: Media y desviación estándar de las variables morfo métricas del ovocito de la cobaya en los COC's de tipo A, B y C, pre y post-maduración.....	50

Índice de Anexos

Anexo 1: Ovarios de cobaya colectados en matadero.....	63
Anexo 2: Realizando la técnica de slicing.	63
Anexo 3: Denudado de ovocitos previo a la evaluación de morfometría.....	63
Anexo 4: Ovocitos aptos (categoría A y B) y no aptos (categoría C).	64
Anexo 5: Ovocitos BCB+ y BCB-	64
Anexo 6: Expansión de las células del cúmulus luego de la MIV.	64
Anexo 7: Ovocitos en estado de GV y MII teñidos con Hoechst, vistos con microscopio de fluorescencia.	65
Anexo 8: Ovocitos medidos antes y después de la MIV mediante software MShot.	65

Cláusula de Propiedad Intelectual

Andrea Belén Zhinin Criollo, autora del trabajo de titulación "Implementación de un protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*), certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de junio de 2022



Andrea Belén Zhinin Criollo

C.I: 0106048291

Cláusula de Propiedad Intelectual

Pedro Alexis Buñay Ortiz, autor del trabajo de titulación "Implementación de un protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*), certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 17 de junio de 2022



Pedro Alexis Buñay Ortiz

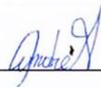
C.I: 0302945480

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Andrea Belén Zhinin Criollo en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Implementación de un protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de junio de 2022



Andrea Belén Zhinin Criollo

C.I: 0106048291

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Pedro Alexis Buñay Ortiz en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Implementación de un protocolo de maduración *in vitro* de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de junio de 2022



Pedro Alexis Buñay Ortiz

C.I: 0302945480

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis hermanos y hermanas por su apoyo incondicional a lo largo de estos años, que han sabido dirigir, apoyar y consolidar a su hermana la más pequeña que hoy encuentra en este medio la forma de hacer notar el increíble apoyo que han sido en esta vida que tengo el privilegio de compartir a su lado.

También debo dar cabida a quienes en el ámbito académico me han sabido brindar la mano amiga de apoyo donde mi colega en este trabajo Pedro ha sabido ser un amigo y pilar de desarrollo académico; y sobre todo a nuestro tutor el Dr. Luis Ayala sin el cual no hubiésemos encontrado el norte adecuado para plasmar este proyecto en nuestro trabajo de titulación.

Sin olvidar a los demás involucrados en este proyecto tanto amigos como colegas que han encontrado la forma de impulsarme hacia delante y no dejarme desfallecer.

Andrea Zhinin

Como no agradecer a las personas que contribuyeron al desarrollo del presente trabajo. Al Dr. Luis Ayala por su paciencia, por compartir sus conocimientos. Al Dr. Xavier Samaniego y aquellos técnicos del laboratorio quienes apoyaron el trabajo práctico.

Pedro Buñay

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado, en primer lugar, a Dios que me ha dado salud y fortaleza, guiándome a lo largo de mi vida, siendo el pilar fundamental de mis principios y valores; y permitiéndome culminar mi formación profesional.

A mi madre Leticia, pues sin ella este sueño no se hubiera hecho realidad por su cariño y apoyo incondicional, forjando en mí su amor, paciencia y sobre todo por creer en mi sin dudarle, siendo tu el motor que me impulsa cada mañana a seguir adelante por lo que haces por nosotros para dejarnos un futuro mejor, a pesar de los obstáculos de la vida, que alegría me da al saber que eres una excepcional mujer y mi madre. No tengo palabras para expresar lo que me sale del corazón gracias mami. Y a la memoria de mi hermana María que fue mi cómplice en su vida terrenal y un apoyo desmedido inculcó en mí un inigualable sentimiento que trascendió los planos de lo real, sintiendo desde el fondo de mi corazón estas dos grandes mujeres que han guiado mi vida en las diversas travesías que he emprendido son la razón y el motivo de mis objetivos de superación personal y espiritual.

Andrea Zhinin

Quiero dedicar a mi querida mami Teresa, valiente, padre y madre a la vez que admiro mucho, quien me ha dado la fuerza y aliento de seguir adelante.

Con mucho cariño para ti mamá.

Pedro Buñay

1. INTRODUCCIÓN

El cobayo (*Cavia porcellus*), roedor originario de la Cordillera de los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia ha sido utilizado como fuente de alimento de alto valor proteico y asociado a tradiciones folclóricas (Araníbar y Echevarría, 2014). Sin embargo, la crianza del cuy nativo es considerado como una línea de bajo nivel productivo y por consiguiente sustituido paulatinamente por líneas con mejores rendimientos que lo expresan en sistemas de crianzas comercial, (Avilés, 2016), lo cual ha generado una disminución drástica de la población del cuy autóctono, provocando la pérdida de este material genético único en el mundo (Avilés et al., 2014).

Una estrategia utilizada a nivel mundial para multiplicar y conservar material de alto valor genético o en peligro de extinción, es la producción *in vitro* de embriones (PIVE) (An et al., 2018); así, la PIVE elimina la necesidad de superovulación (Gregoire, 2012) y permite el uso de animales prepuberres (Wu et al., 2007), donantes seniles. Esto gracias a que el material genético (ovocitos) se pueden obtener de diferentes maneras: OPU, Slicing (Cañón y Córdova, 2012) o directamente de ovarios disponibles de animales post-mortem (Wu et al., 2007), para su posterior procesamiento a través de la maduración (MIV), fertilización (FIV) y el cultivo de embriones *in vitro* (CIV) (Dorsch et al., 2008).

En cobayas para la obtención de ovocitos se ha empleado la punción folicular en fase estrogénica (estro), es decir cuando los folículos presentaban tamaños mayores a 1mm (Yanagimachi 1974; Wang et al. 2019). Otro método reportado en cobayas fue el de Slicing (Beltrán y Rodríguez, 2012), ellos compararon las dos técnicas: cortes y punción, observando que no existía diferencia estadística en cuanto al número de ovocitos viables obtenidos, así como en el tiempo empleado en la recuperación de COC's. Sin embargo, a nuestro entender no existe más trabajos que describan la técnica cortes para la recuperación de COC's en la cobaya, que permita definir este método como confiable en la obtención de material genético para la producción de embriones *in vitro* en esta especie.

La competencia ovocitaria favorece el reinicio de la meiosis durante el proceso de maduración *in vitro*, pero seleccionar ovocitos competentes es complejo. La

UCUENCA

mayoría de laboratorios en el mundo escogen ovocitos competentes mediante las características morfológicas del citoplasma y de las células del cúmulus, actividad que se realiza en forma rápida y directa bajo un estereoscopio (Barba, 2016) sin embargo, con estas técnicas los resultados finales no han mejorado (Wu et al., 2007)

En los últimos años se han estudiado alternativas indirectas que permiten determinar competencia ovocitaria, mediante la utilización del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la especie bovina (Ayala et al., 2020) o el reinicio de la meiosis como indicador de maduración nuclear (Ayala et al., 2019), así como la morfología del ovocito. En roedores hay reportes del uso del BCB en la selección de ovocitos competentes (Wu et al., 2007). Sin embargo, en la cobaya a nuestro saber no se cuenta con información científica sobre el tema.

Otro factor importante en el proceso de maduración *in vitro*, es el medio de cultivo utilizado y si bien hay trabajos como el realizado por Yanagimachi (1974), que describen la utilización de un medio de maduración a base de una mezcla de ocho partes de TCM199 (base de solución de Hanks; Difco) y dos partes de suero fetal bovino inactivado por calor (56°C, 30 min; Gibco), suplementado con NaHCO₃ (2 mg/ml), y antibióticos, con resultados alentadores (65% de maduración), sin embargo, los ovocitos utilizados fueron obtenidos de folículos preovulatorios y no han demostrado su utilidad cuando los COC's provienen de ovarios en diversas fases del ciclo estral de ovarios de matadero.

Otro trabajo realizado por Wang et al., en el (2019) sobre maduración de ovocitos de cobayas describe la utilización del TCM 199 suplementado con 0,5 µg/ml de FSH; 0,5 µg/ml de LH ovina; 1,0 µg/ml de estradiol y antibióticos, sin embargo, existen lugares como el nuestro dónde la obtención de FSH y LH de origen ovino es complicada y su costo muy elevado ya que se usa con más frecuencia la FSH de origen porcino; además, en dicho estudio, valoran el proceso de maduración *in vitro* en forma tradicional (expansión de las células del cúmulus) y la maduración nuclear mediante epifluorescencia, pero no incursionan en la determinación de la morfología, tamaño del ovocito, así como en la selección de ovocitos mediante el Azul Brillante de Cresilo (BCB).

UCUENCA

Por lo tanto, se decidió utilizar en este experimento medios de maduración probados para la especie bovina utilizados en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca con el fin de establecer un punto de partida para en un futuro probar alternativas que mejoren los resultados de la MIV en cobayas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar un protocolo de maduración *in vitro* de complejos cúmulo-ovocitos de cobayas (*Cavia porcellus*).

2.2 Objetivos Específicos

- Describir la técnica de Slicing para la obtención de COC's de ovarios de cobayas procedentes de mataderos.
- Evaluar la efectividad del método de selección convencional de COC's para la maduración *in vitro* (morfología del citoplasma y células del cúmulus), mediante la prueba del Azul Brillante de Cresilo y morfometría ovocitaria.
- Valorar la efectividad de un protocolo de maduración *in vitro* descrito para ovocitos de bovino aplicado en cobayas, mediante la valoración morfométrica del ovocito y el estadio de desarrollo de su núcleo.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Morfofisiología del aparato reproductor del cobayo hembra

3.1.1 Ovarios.

Son órganos de color blanco amarillento, ovalado, se encuentran localizados en la cavidad abdominal, se hallan cranealmente a los cuernos uterinos, están cubiertos por una bolsa ovárica o membrana serosa, miden de 3 a 6 mm x 0,2 de largo y 4 mm de ancho. Pesa alrededor de 0,033 g (Aliaga et al., 2009). La irrigación proviene de la arteria ovárica y uterina (Almeida, 2016). La superficie es lisa excepto por los folículos maduros que se proyectan en el ciclo de la ovulación (Gregoire, 2012). Presentan una etapa dinámica que se inicia en la pubertad y continúa durante todos los ciclos reproductivos, dentro de sus funciones produce ovocitos y como glándula endocrina secreta estrógenos y progesterona (Pino, 2015).

3.1.2 Oviductos.

Los oviductos se encuentran ubicados lateralmente a la bolsa ovárica, miden 57 mm de largo por 1,5 mm de diámetro. Al corte transversal, presenta la mucosa compuesta por epitelio de tipo cilíndrico simple con proyecciones papilares y escasos cilios de las células epiteliales (Aliaga et al., 2009). El oviducto se divide en tres partes: infundíbulo, ampolla e istmo. Estas estructuras cumplen la función de transportar el ovulo hasta el cuerno uterino en donde se llevará a cabo la fecundación (Aucapiña y Marín, 2016).

3.1.3 Útero

El útero es bicornes en forma de Y, el cuerpo es corto y aplanado dorso ventralmente, llegando a medir 12 mm de largo por 7 mm de ancho (Fernandez et al., 2018). Disminuyendo su diámetro en dirección cráneo-caudal. El lado dorsal está en contacto con el recto y el lado ventral está contiguo a los intestinos (Cañón et al., 2015).

3.1.4 Cuello uterino

Tiene forma de Y, siendo una porción de útero conectada a la vagina. Consiste en una serie de engrosamientos (anillo) pequeños de la mucosa extendida caudo-medial sobre las paredes laterales para converger ventralmente en su centro (Cano, 2014). Llega a medir aproximadamente 25 mm (Gregoire, 2012)

3.1.5 Vagina

Está constituido por músculo fibroelástico y mide aproximadamente entre 3 cm de largo por 1 cm de ancho. Está ubicada en la cavidad pelviana relacionándose dorsalmente con el recto, ventralmente con el cuello y cuerpo de la vejiga. Se encuentra recubierto por epitelio secretorio y cilíndrico estratificado con abundantes glándulas secretoras de mucina, asentándose sobre una capa de tejido de colágeno ricamente vascularizado (Hargaden y Singer, 2012). Una característica distintiva a otro roedor es que posee una membrana epitelial que cubre el orificio vaginal excepto en la fase de estro y parto (Grégoire et al., 2012).

3.1.6 Vulva

Tiene una abertura externa en forma de Y invertida. Posee un diámetro exterior más pequeño que el cuello del útero, sus paredes son más delgadas. Se forma dos pequeños labios en cuyo fondo se halla el meato urinario similar al esfínter anal. En la porción dorsal encontramos al clítoris (Solís y Chávez, 2015).

3.2 Pubertad

En la cobaya los primeros celos no se manifiestan antes de los 30 días de edad. El promedio de inicio del primer celo es de 68 días. Sin embargo, el peso en la pubertad es un parámetro más constante que la edad, siendo esta última alrededor de 500-600 g. De acuerdo con Aliaga Rodríguez et al. (2009) se recomienda iniciar la etapa reproductiva cuando hayan alcanzado un peso de 800 g y no antes de la edad de dos meses. La primera gestación debe tener lugar antes de los seis meses de edad, para evitar la calcificación de la sínfisis púbica. El ciclo estral es de 16 días, la gestación de 68 días, 3,8 gazapos promedio por camada y el 70% de las hembras presenta celo a pocas horas del parto (Gregoire, 2012).

3.3 Ciclo estral

Los conejillos de indias son animales poliestríticos y ovulan espontáneamente. La hembra es sexualmente madura a los tres meses de edad (Gregoire, 2012). El ciclo estral tiene una duración media de 17 (rango 15-21 días). El desarrollo folicular comienza el día después de la ovulación (día 0) y consiste en dos ondas. Los folículos más grandes de la primera ola alcanzan su diámetro máximo (500-

UCUENCA

750 μm) en los días 10 -11 del ciclo, pero se vuelven atrésicos porque la progesterona (P4) está elevada y la retroalimentación negativa provoca la supresión de la hormona luteinizante (LH). Posteriormente la desaparición del cuerpo lúteo permite el desarrollo de la segunda cohorte folicular hasta la ovulación. Esta ola tarda unos 6 -7 días; en los cuales hay un reclutamiento de pequeños folículos y una selección de los 3 a 5 folículos más grandes en el día 10 (Garris y Foreman, 1984). Luego, las concentraciones de P4 disminuyen rápidamente después del día 12 y es un claro aumento en los niveles de LH entre 13 y 15 días, lo que estimulará la ovulación. Finalmente, la ovulación ocurre al final de la segunda ola (Día 17 del ciclo) (Logothetopoulos et al., 1995).

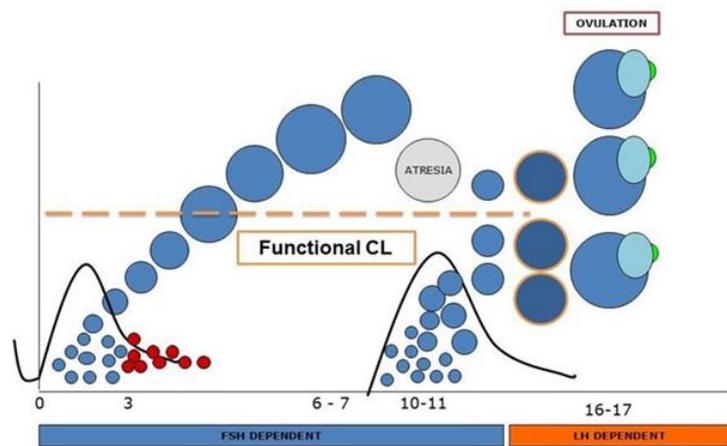


Figura 1: Ciclo estral del conejillo de indias. CL: Cuerpo lúteo; FSH: Hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante (Gregoire, 2012)

A decir de Gregoire, (2012) los estudios iniciales del ciclo estral en el conejillo de indias fue realizado por Stockard y Papanicolaou (1917). Las fases se pueden identificar fácilmente mediante estudio citológico para evaluar la etapa del ciclo.

En el celo presenta ciertos cambios como: lordosis en presencia del macho, ruptura de la membrana vaginal y secreción de moco. Existe la tendencia de presentar celo en la noche con una duración de seis a once horas, momento en que la hembra es receptiva al macho (Pignon y Mayer, 2020). La ovulación ocurre espontáneamente, aproximadamente 10 horas después del inicio del celo (Cano, 2014).

3.3.1 Proestro

La fase del proestro dura 1 a 1,5 días. Presenta cambios externos como congestión de los genitales y secreciones serosas, y se caracteriza por la presencia de gran cantidad de células intermedias (Araníbar y Echevarría, 2014).

3.3.2 Estro

El estro o calor en la cobaya dura 8 a 24 horas, presentando inquietud, estiramiento de la espalda, elevación de la pelvis, presencia de mucosidad vaginal y receptividad al macho. La ruptura de membrana vaginal es un indicativo poco fiable del estro ya que también puede ocurrir el rompimiento durante la cópula o de forma espontánea, permaneciendo abierta de 3 a 4 días. En esta etapa existe superioridad de células superficiales (Almeida, 2016).

3.3.3 Metaestro

El metaestro dura de 1 a 1,5 días, en donde la hembra ya no es receptiva al macho. Se puede observar un número regular de leucocitos con mayor predominancia de células intermedias en relación a las superficiales (Solorzano y Sarria, 2014).

3.3.4 Diestro

El diestro es de 13 a 15 días. Considerado como el lapso transcurrido entre dos celos consecutivos. En esta etapa se observa una gran cantidad de leucocitos con relación a las células intermedias (Villamarín, 2016).

3.4 Ovogénesis y foliculogénesis

El ovario es un órgano altamente organizado constituido por células germinales (ovocitos) y células somáticas (células granulosas, tecas y estromas). Las principales funciones comprenden la acción endocrina (biosíntesis de esteroides) y función reproductiva (foliculogénesis y producción de ovocitos). Las subunidades funcionales son los folículos que crecen desde el folículo primordial hasta el antral. La ovogénesis es la formación, desarrollo y maduración de gametos femeninos, que comienzan en las células germinales del ovario fetal (Findlay et al., 2015) Después de la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), dos ondas consecutivas de división meiótica, llamadas Meiosis I (MI) y Meiosis II (MII), comienzan y reducen los cromosomas para generar gametos haploides (Cohen y Holloway, 2015)

UCUENCA

En cobayas, una vez que se ha formado la gónada, las ovogonias experimentan una fase de multiplicación mitótica intersticial y se rodean de capas de células germinales desde las etapas embrionarias hasta la madurez sexual (Mauleon, 1967). Según Ioannou en (1964), quien evaluó el número de células germinales en el ovario de *Cavia porcellus* desde las etapas embrionarias hasta la madurez sexual. El número de células germinales por ovario aumenta de aproximadamente 27.000 a la mitad del período de gestación (30 días *post-coitum p.c.*) hasta un máximo de 105.000 a los 41 días p.c. Además, el stock inicial de células germinales sufre un fuerte agotamiento hasta alcanzar el número de 13.000 a los 12 meses después del parto (p.p.). Esta disminución se debe al proceso continuo de atresia que afecta a las células germinales desde las primeras etapas de desarrollo y que se hará referencia a continuación. Hay un gran número de ovocitos en la etapa de leptoteno a los 35 días p.c., cigoteno a unos 40 días p.c. y paquiteno a los 50 días p.c. El proceso de ovogénesis termina alrededor del día 50 p.c. Los ovocitos se encuentran en la etapa de diploteno al nacer. Esta fase de la meiosis se bloquea hasta la pubertad. En el conejillo de indias, el período de división gonadal y la entrada en meiosis tiene lugar antes del parto, fenómeno comparable a la mujer. El número de ovocitos en el ovario animal adulto depende en gran medida del reclutamiento inicial del grupo de folículos primordiales (McGee y Hsueh, 2000).

La foliculogénesis es el proceso de desarrollo folicular. Los tipos de células somáticas en el folículo interactúan por diferentes mecanismos que promueven el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos y la posterior formación del cuerpo lúteo (Sadeu et al., 2007). Los folículos del ovario se dividen en cuatro grupos en función de su tamaño y etapas de desarrollo: folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios o preantrales y folículos antrales (Cañón y Córdova, 2012).

El trabajo de Sadeu et al., en 2007 clasificó los folículos de cobaya por el diámetro como: folículos primarios a los de 67 μm y tamaño de los ovocitos de 44,8 μm . Los folículos secundarios se dividieron en pequeños, medianos y grandes. Los tamaños de los folículos secundarios pequeños midieron 96 μm y los ovocitos de 52,2 μm . Los folículos ováricos secundarios de tamaño mediano midieron 136 μm y 59 μm . Los folículos ováricos secundarios grandes tenían un

tamaño de 188 μm y 72 μm de tamaño de los ovocitos foliculares. El tamaño de los folículos ováricos terciarios era de 231 μm y el diámetro de los ovocitos era de 78 μm .

3.5 Avances biotecnológicos *in vitro* en cobayos

Los ovarios de los mamíferos contienen folículos que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo, de los cuáles solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos. Los métodos usados para la colección y la maduración de los ovocitos afectan la inducción de la meiosis, así como el potencial de desarrollo de los ovocitos (Fernandez et al., 2010)

En busca de aprovechar al máximo el potencial genético de esta especie se han trabajado para estimular la superovulación con gonadotropinas convencionales eCG (Kosaka y Takahashi, 1989), FSH (Suzuki et al., 2003) induciendo con éxito. El trabajo de Shi et al. en el (2000) también demostró que la vacunación con inhibina aumentó la tasa de ovulación, pero este método sigue siendo caro y demasiado aleatorio para considerar su uso en la rutina (Dorsch et al., 2008).

Según Jagiello, (1969) del 80 al 100% de los ovocitos de cobaya aislados de los ovarios de hembras adultas que estaban entre el día 5 a 8 de su ciclo estral reanudan la meiosis en el cultivo y pueden alcanzar la metafase II a las 14 h de cultivo. Sin embargo, no hay información detallada de las técnicas que se utilizó para el aislamiento y el cultivo de los ovocitos y no se determinó si los ovocitos madurados *in vitro* eran fertilizables. Yanagimachi, (1974) fue el primero en demostrar que ovocitos de cobaya podían fertilizarse *in vitro*. Sin embargo, las conclusiones anteriores se basaron únicamente en las observaciones de la extrusión del cuerpo polar, además debe ser objeto de más estudio si los ovocitos MIV son completamente capaces de una fertilización y desarrollo. Los ovocitos pueden madurar *in vitro* cuando se liberan de los folículos de Graaf y se colocan en medios de cultivo apropiados. El cobayo puede representar un modelo animal para la investigación sobre infertilidad ovárica y se necesita

mejorar las condiciones de maduración *in vitro* (MIV) en esta especie (Cañón et al., 2015).

Sin embargo, en comparación con los sistemas MIV relativamente bien establecidos para otros mamíferos, como en el ganado vacuno (An et al., 2017), la MIV de los ovocitos de los cobayas a menudo no ha tenido éxito, y pocos estudios informan de una eficiencia de maduración baja y variable. Esto se debe probablemente a que las características reproductivas de los cobayos obstaculizan la capacidad de sus ovocitos para someterse a una maduración nuclear y citoplasmática competente que permita la posterior fecundación y el cultivo de embriones *in vitro* (Yanagimachi, 1974). Las gonadotropinas como la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) promueven la maduración de los ovocitos en el ganado vacuno, caprino y ovino, mejoran la calidad, cantidad de los embriones después de la FIV. Sin embargo, aunque los ovocitos de la MIV suelen completar la maduración nuclear, se desconoce su estado de madurez citoplásmica, y su capacidad para exhibir el desarrollo embrionario después de la fecundación suele ser menor que la de los ovocitos madurados *in vivo* (Wang et al., 2019).

3.5.1 Recolección de COC's en mataderos

La obtención de ovocitos de animales en matadero constituye una de las formas más comunes de recolección de COC's. En el caso de bovinos los ovarios recolectados son transportados en termos que contienen solución salina (0,9% NaCl), o solución fosfato-tamponada salina (PBS) (Alvarado, 2017). Para el mantenimiento de los ovarios durante la recolección en el matadero y el transporte al laboratorio debe ser a una temperatura de 35° a 37°C, es importante ya que, por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración *in vitro* (Vargas, 2018). En un tiempo no mayor a 3 horas (Estrella y Suconota, 2018).

El trabajo de Calvo et al., (2015) recolectó ovarios de gatas obtenidos por ovariectomía y transportados al laboratorio en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) con gentamicina (100 µg/ml) y refrigerados a 4°C dentro de las dos horas posterior a su extracción.

Solís & Chávez, (2015) recolectaron ovocitos a partir de ovarios de cobayas posmortem en termo con solución fisiológica estéril adicionados agentes antimicrobianos a una temperatura de 20 - 25°C. A esta temperatura, los ovarios podrán permanecer en el termo hasta aproximadamente 6 - 7 horas sin afectar significativamente los resultados posteriores.

3.5.2 Recuperación del Complejo Cúmulo Ovocito (COC's)

Para la extracción de complejos cúmulo ovocitos (COC's) de los folículos en cobayos, Beltrán y Rodríguez, (2012) emplea la técnica de aspiración con jeringa, así como la técnica de corte (slicing) de folículos, sin presentar diferencias estadísticas significativas ni en el número de ovocitos viables obtenidos ni en el tiempo empleado en la recuperación en relación al método de extracción de ovocitos. La aspiración folicular permite punzar folículos claramente visibles en la superficie ovárica, en el proceso se pierden células del cúmulo. En cambio, con la técnica de slicing se recuperan mayor cantidad de COC's por ovario, pero la población resulta muy heterogénea, por tanto, debe hacerse una minuciosa selección de COC's. No obstante, la técnica de slicing es la más utilizada para recuperar ovocitos de ovarios pequeños, ya que en este caso el tamaño folicular dificulta la punción (Lorenzo et al., 2015).

Los ovarios deben ser acondicionados, separados de los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos y lavados tres veces en solución fisiológica estéril. Posteriormente cortados lo más fino posible aplicando la técnica slicing, por el tamaño de los ovarios (Solís y Chávez, 2015).

Wang et al. en (2019) recogieron los ovarios de cobayas y lavaron en una solución salina atemperada a 30°C. Los ovarios fueron cortados en pequeños trozos para exponer los folículos antrales al aspirado, con un medio PBS suplementado con 3 UI/ml de heparina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Posterior a eso los COC's se recuperaron mediante punción de folículos antrales con una aguja de 20 G bajo un estereomicroscopio.

3.5.3 Características morfológicas de COC's

En roedores silvestres como el coipo, el tamaño del ovocito varía dependiendo del estadio de desarrollo y la dimensión de los folículos. Los ovocitos pequeños, son aquellos que no superan las 37 µm, los ovocitos en crecimiento son los que

están en un diámetro entre 38 a 66 μm y los ovocitos grandes, son los tienen un diámetro igual o superior a 67 μm (Felipe y Masson, 2005). Similares dimensiones de ovocito fueron reportando en ratones ciervo americanos con un diámetro de 70 μm (Choi y He, 2015).

El diámetro de los ovocitos en cobayas de folículos terciarios es de aproximadamente 78 μm según Sadeu et al (2007). Fernandez et al. (2018), llega a medir 12 μm de zona pelúcida (zp) mientras que el diámetro de ovocito (sin zp) y volumen fueron de 75 μm y 234.003 μm^3 aproximadamente.

El porcentaje de recuperación de ovocitos en cobayos varía de un animal a otro, dependiendo del tipo de crianza, alimentación, peso, edad y etapa del ciclo reproductivo (Wang et al., 2019). En cobayos pueden ser recuperado de 20 a 30 ovocitos de los ovarios de una cobaya (Toyoda y Chang, 1974). (Solís y Chávez en (2015) recolectaron con la técnica slicing 180 ovocitos de 60 ovarios es decir 3 ovocitos por ovario. En donde 120 ovocitos son de categoría A (66,66%) considerados aptos para maduración *in vitro*; 24 de categoría B (13,33%) con desperfectos que pueden ser usados en el protocolo de maduración, 36 de categoría C (20%) que no son aptos para maduración *in vitro*.

3.5.4 Clasificación morfológica de COC's

Una fase crítica en el procedimiento de fertilización *in vitro*, es la selección de ovocitos de buena calidad para poder avalar un óptimo desarrollo, los aspectos más relevantes que evalúan la calidad del ovocito son: estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cúmulus, así como el diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar (Thomas y Vanderhyden, 2006).

La morfología del citoplasma y las células del cúmulus son los principales criterios para discriminar entre ovocitos competentes o incompetentes para el desarrollo embrionario, la calidad de las células que rodean el ovocito y la apariencia homogénea de citoplasma son las mejores guías para determinación si el ovocito tiene potencial para madurar y fecundar *in vitro*, las células del cúmulus son subpoblaciones de células de la granulosa que brindan los nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que

juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Gonzales y Gonzales, 2005).

La clasificación es en base a características morfológicas de las células del cúmulus así como del citoplasma del ovocito, aunque la categorización varían en número según los autores con importancia científica y para controlar la calidad de la producción y recolección de los ovocitos. Hawk y Wall en (1994), categorizaron en tipo A los ovocitos con apariencia compacta, múltiples capas de células (mayor a 4), citoplasma homogéneo, denso y finamente granulado, el tipo B con cúmulo compacto con pocas capas (1 a 3), cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida, citoplasma irregular en la periferia, denso y granulado y tipo C caracterizado por el cúmulo parcial o completamente expandido y disperso, presencia de material extracelular, cúmulo descolorido, corona radiata desnuda, granulado grueso, áreas claras y oscuras muy acentuadas, citoplasma descolorido y deforme). Los COC's pueden ser agrupados en aptos (categorías A+B) y no aptos (categoría C) (Ayala et al., 2019).

Otros estudios de cuatro categorías, por características morfológicas son a nivel ultraestructural y por su capacidad de desarrollo en un sistema de maduración *in vitro*, en la categoría 1 y 2 los orgánulos son distribuidos de manera uniforme. Mientras que en la 3 y 4 los orgánulos imitaban las características de los ovocitos durante la maduración final, en la categoría 1 las células del cúmulus penetraban el córtex del ovocito o se encontraban superficiales al mismo, mientras que en la categoría 4 en la mayoría no penetraba. Después de la maduración *in vitro* sólo la categoría 4 mostraba una disminución de la capacidad de desarrollo, mientras que la categoría 1 y 3 mostraron semejante capacidad de desarrollo en la maduración *in vitro* (Matorras y Hernández, 2007).

Existe una correlación directa entre el desarrollo del ovocito y el número de células que lo rodean. Ovocitos desnudos extraídos de folículos antrales y cultivados solos o sobre monocapa de células de la granulosa tienen un desarrollo deficiente o se degeneran después de la fertilización, otros estudios manifestaron que los ovocitos desnudos aún pueden conservar la capacidad de desarrollo normal. Se observaron que ovocitos con 3 capas, se desarrollaron significativamente, menos al estadio de blastocisto (23%) que los que poseían

mayor número de capas (40%), estos resultados son todos obtenidos en laboratorio tras punción de ovarios *post-mortem*. A nivel práctico se deberá cultivar solo ovocitos que contenga un cúmulus denso, con un mínimo de 5 capas que cubran toda la superficie del ovocito, que su citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y sin manchas (Khurana y Niemann, 2000).

3.5.5 Evaluación de la competencia ovocitaria mediante la tinción de Azul Brillante de Cresilo (BCB)

El azul brillante de cresilo como tinción vital permite clasificar morfológicamente aquellos ovocitos inmaduros que son competentes y que están listos para pasar al proceso de maduración. Este método no invasivo está basado en la determinación de la actividad enzimática de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PHD) (Duma, 2019). Esta cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato y es la reacción limitante de esta, en ovocitos está activa cuando hay procesos de biosíntesis y crecimiento celular, disminuyendo su actividad cuando el ovocito termina su fase del crecimiento (Catalá et al., 2011). Tomando ese principio los ovocitos que retienen la tinción son aquellos que terminaron su crecimiento (BCB+) y los ovocitos incoloros son aquellos que se encuentran en crecimiento, por lo que son considerados BCB negativos (Ayala et al., 2018).

El uso de la prueba del BCB como única, no es determinante para seleccionar ovocitos competentes (Karami et al., 2014). También se valora la capacidad de reinicio de la meiosis que poseen los ovocitos provenientes de folículos de tamaños diferentes, deben ser seleccionados tomando en cuenta la técnica tradicional (morfología de las células de cúmulus y el citoplasma), más el test del Azul Brillante de Cresilo (BCB) y su relación con la morfometría (diámetro) del ovocito (Ayala et al., 2019).

El trabajo de Mangia y Epstein en (1975) determinaron que la actividad de G6PDH es mayor en ovocitos en ratones que están entre 40 a 80 μm de diámetro. Sin embargo, esta actividad disminuye en ovocitos con diámetros mayores a las 80 μm . Los ovocitos de ratón BCB+ alcanzan una mejor madurez citoplásmica y un mayor potencial de desarrollo después de la MIV que los ovocitos BCB-. Demostrando que la mejor madurez citoplásmica y el mayor

potencial de desarrollo de los ovocitos BCB+ se correlacionaron con sus tamaños más grandes (Wu et al., 2007).

Estudios realizados por Wu et al. en el (2007) con Azul Brillante de Cresilo en ovocitos de ratón, clasificaron en teñidos y no teñidos (BCB+, BCB-) según su coloración citoplasmática.

En resumen, investigaciones realizadas en distintas especies como: rumiantes, caballos, porcinos, perros y roedores, indican que la tinción con BCB puede usarse como un método eficaz para la selección de ovocitos, pero la competencia de los ovocitos seleccionados con BCB puede variar con el diámetro de los ovocitos, la madurez sexual del animal y la estimulación de gonadotropinas (Estrella y Suconota, 2018).

3.5.6 Medios de maduración

Se han elaborado distintos medios desde soluciones simples de sales balanceadas hasta medios complejos para la maduración de ovocitos, tomando como referencia los componentes que están presentes *in vivo*, para proporcionar las condiciones ideales, con el fin de lograr el mayor porcentaje de ovocitos madurados (Vargas, 2018).

Algunos factores para tener en cuenta en el proceso de maduración son: osmolaridad, pH y hormonas: Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), estrógenos (estradiol), células somáticas para co-cultivo (células del cúmulo, granulosa, teca interna, oviducto, útero, células del hígado de rata búfalo), aminoácidos, factores de crecimiento, suero de vaca en estro, suero fetal bovino (BFS), y seroalbumina bovina (BSA). El medio TCM-199 es utilizado generalmente en la maduración de ovocitos, usualmente es suplementado con gonadotropinas, estradiol, suero sanguíneo y piruvato, mismo que proporciona elevadas frecuencias de maduración nuclear y expansión del cúmulus cuando se agrega FSH (Martínez, 2013), además el piruvato sódico es esencial y permite prescindir de las células del cúmulus durante la maduración (Kim et al., 2011).

Las gonadotropinas son necesarias para la maduración y desarrollo de los ovocitos. La LH afecta a la maduración del ovocito, altera la concentración de calcio en el interior del ovocito, aumenta la glucólisis y la oxidación mitocondrial

de la glucosa dentro del ovocito. La FSH estimula la actividad enzimática de las células de la granulosa, haciendo el ambiente folicular androgénico a estrogénico. Además, la FSH acrecienta la expansión de las células del cúmulus (Rizos et al., 2002).

El suero de vaca en estro, el BFS y la BSA son fuentes proteicas, de aminoácidos y también contienen hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y otras sustancias que el ovocito y el embrión necesitan para su desarrollo, Se sabe que las células somáticas utilizadas para co-cultivo secretan ciertos factores que favorecen la maduración normal del ovocito, aumentan la fertilización y el desarrollo embrionario (Yamasaki et al., 2015).

De igual manera es necesario aportar un ambiente lo más similar al de forma natural. Para ello hay tener en cuenta, la concentración de oxígeno en el ambiente, CO₂ 5%, humedad relativa de 95-100%, la osmolaridad de los medios utilizados de 290 mOsm, pH de 7,4 de los medios, temperatura de 37,5 ° C. Tras la maduración *in vitro*, alrededor del 60 a 75% por ciento de los ovocitos cultivados, llegan a metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre 17-24 horas de comenzar la maduración (Cañón y Córdova, 2012; Wang et al., 2019).

3.5.7 Maduración de los ovocitos

El proceso de maduración ovocitaria, se presenta con cambios a nivel del núcleo y la organización del citoplasma, los mismo que producen un reinicio del ciclo meiótico, permitiendo que los ovocitos tengan la capacidad de alcanzar el desarrollo. Para que la maduración *in vitro* sea exitosa dependerá de la calidad de ovocitos teniendo en cuenta sus 4 categorías, han de ser seleccionados los aptos que son A y B (Nadri et al., 2009).

Existen bajas tasas en el proceso de maduración debido a factores como: especies reactivas de oxígeno, alteración en el metabolismo, heterogeneidad ovocitaria dependiendo del método de extracción de estos. Este proceso está íntimamente relacionado con la competencia folicular en donde se identifica aquellos embriones que pueden ser transferibles y viables.

Según Jagiello (1969), del 80 al 100% de los ovocitos de cobaya aislados de los ovarios de hembras adultas en la mitad (días 5 a 8) de su ciclo estral reanudan la meiosis tras el cultivo y pueden alcanzar la metafase II a las 14 h de cultivo.

Desafortunadamente, Jagiello no proporcionó información detallada sobre las técnicas que utilizó para el aislamiento y cultivo de los ovocitos. Posteriormente Yanagimachi (1974) cultivó ovocitos de cobaya empleando TCM-199 (solución base de Hanks; Difco) y suero fetal bovino inactivado por calor en una porción de 8 a 2 respectivamente, suplementado con NaHCO_3 (2 mg/ml), K-penicilina G (100 UI/ml) y sulfato de estreptomicina (50 $\mu\text{g/ml}$). Con un pH de 7,4 a 7,5 a una temperatura de 37°C en una atmosfera con 5% de CO_2 en aire.

Cañón et al., (2015) Cultivó a 37 °C en CO_2 al 5% durante 17 h con TCM-199 suplementado con glutamina, piruvato, albumina sérica bovina (BSA), suero fetal bovino al 10% y diferentes concentraciones de EGF (Sigma) siendo la más apropiada 50 ng/ml.

En el (2019) Wang y sus colaboradores empleó medio de maduración basal M199 suplementado con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de FSH ovina (NIDDK), 5,0 $\mu\text{g/ml}$ de LH ovina (NIDDK), 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de estradiol (E-8875) y antibióticos. El tratamiento más adecuado resultó la combinación de Cisteína (Cys)100 μM (M9768), Factor inhibidor de leucemia (LIF) 1000 UI / ml (Invitrogen, Grand Island, NY). Se incubó de 20 a 25 ovocitos en gotitas de 75 μl con medio de maduración durante 24h. En condiciones de 5% de CO_2 en aire humidificado a 37,5 °C. Reportando una tasa de MII de 61,8%.

3.5.8 Prueba de Hoechst (fluorocromo)

El primer signo de reanudación de la meiosis es la disolución de la membrana nuclear. El ovocito que tenga citoplasma homogéneo y primer corpúsculo polar extruido indica que se encuentra en metafase II. La extrusión del corpúsculo polar en cobayos se da desde las 17 a 24 horas y como no es visible se necesita de un medio de tinción con fluorocromo específico para ADN como es el Hoechst 33342.

El colorante fluorescente Hoechst 33342 tiene la capacidad de adherirse a las moléculas de ADN, que permite la identificación del estado de maduración nuclear de los ovocitos después de su exposición al microscopio de epifluorescencia. El colorante es activado por la luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a 350 nm y emiten fluorescencia azul/cian de 461 nm. Esta tinción fluorescente permite diferenciar los estadios de maduración nuclear del

ovocito: vesícula germinal (GV), ruptura de vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI) y metafase II (MII) (Duma, 2019).

3.5.9 Morfometría ovocitaria

El ovocito es la célula más grande del cuerpo y es sustancialmente esférico con una relación superficie-volumen de aproximadamente tres cuartos del radio, es decir, cuanto mayor es el radio, menor es la relación entre la superficie de la membrana y su volumen. La célula con mayor volumen contiene más agua y proporcionalmente menos superficie de membrana para la salida del agua y la entrada de sustancias crioprotectoras penetrantes (Calvo et al., 2015).

Los ovocitos de roedor silvestre como el coipo presentan forma esférica, con un núcleo redondo de $28,0 \pm 3,1 \mu\text{m}$ de diámetro. El citoplasma de los ovocitos mostró un aspecto translúcido y una acumulación de gránulos o gotas de material refringente localizados excéntricamente hacia el área asumida como polo vegetativo. Los ovocitos presentaron una doble envoltura: células del cúmulus y la zona pelúcida. Las células de las capas más internas de las células del cúmulus, adyacentes a la zona pelúcida, presentaban forma ovoidal y disposición radial. Estas células mostraron proyecciones citoplasmáticas que atraviesan la zona pelúcida y entran en contacto con la superficie del gameto. Las capas más externas, consideradas como células del cúmulus, forman un área de células esferoides de apariencia general dispersa. El tamaño de las células de la granulosa puede ser de $10,9 \mu\text{m}$. La zona pelúcida como una envoltura translúcida y muy refringente, posee un espesor de $15,9 \mu\text{m}$, cuyo aspecto superficial no puede ser muy bien observado porque las células de la corona radiada lo enmascaran. Salvo el sector ocupado por el único corpúsculo polar, no se observa la existencia de un espacio perivitelino. El corpúsculo polar, de forma ovoide aplanada, presenta un diámetro medio de $20,6 \mu\text{m}$ (Felipe et al., 2001).

En ratones hembras adultas entre 25 y 30 semanas de edad. El espesor de la zona pelúcida (ZP) varía de $6,7$ y $7 \mu\text{m}$ en tanto el espacio perivitelino (PVS) va de $4,7$ a $6,6 \mu\text{m}$ y el diámetro de los ovocitos de 60 a $63,5 \mu\text{m}$. Las evaluaciones morfométricas de los diámetros de ZP y PVS, los cigotos de ratones más viejos mostraron un diámetro de PVS disminuido y una ZP más gruesa (Mohammadzadeh et al., 2018).

UCUENCA

Un estudio de caracterización morfométrica de útero, ovario y ovocitos en cobayos por Fernández et al., en (2018) reportó el espesor de la zona pelúcida en ovocitos de $12,1 \mu\text{m}$, mientras que su diámetro (sin zona pelúcida) de $75,6 \pm 8,2 \mu\text{m}$ y el volumen de $234.003,8 \pm 76.547,1 \mu\text{m}^3$ respectivamente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales.

4.1.1 Materiales físicos:

- Computadora
- Programas informáticos
- Esferos
- Calculadora
- Jeringas de 5-10 ml.
- Guantes nitrilo
- Cámara fotográfica
- Terno de transporte de ovarios
- Bisturí # 22

4.1.2 Materiales biológicos

- Ovarios
- Ovocitos

4.1.3 Materiales químicos

- Gel
- Alcohol 70%
- Medio de recolección (H-SOFT)
- Fluorocromo Hoechst (bisBenzimide H33342 trihydrochloride for fluorescence -Sigma®)
- Azul Brillante de Cresilo (Brilliant Cresyl Blue for clinical diagnosis: C.I. 51010)
- Medio TCM-199 Sigma®
- Suero fisiológico: Cloruro de sodio 0,9%

- Solución PBS
- Hialuronidasa (H3506-Sigma®)

4.1.4 Materiales de Laboratorio

- Pipetas automáticas
- Puntas desechables para macro y micro pipetas
- Placas petri de búsqueda cuadriculadas 95 mm³
- Tubos Falcón de 15 ml
- Tubos eppendorf de 1,5 ml
- Equipo de baño María
- Platina de calefacción
- Cámara de cultivo trigas
- Cámara de flujo laminar
- Estereomicroscopio Nikon
- Estereomicroscopio Canon
- Microscopio óptico Nikon Eclipse Ci Series H550S
- Iluminador de fibra de mercurio pre-centrado para epi-fluorescencia.
- Cámara microscópica digital MS60 P
- Vaso de precipitación
- Cajas de cultivo NUNC con pocillos (4 o 5)

4.2 Métodos

4.2.1 El área de estudio



Figura 2. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.

Fuente: Directorio cartográfico de (Google Maps, 2020).

4.2.2 Ubicación del lugar de la experimentación

El proyecto fue ejecutado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca provincia del Azuay, ubicado en la Granja de Irquis, parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, este lugar presenta clima templado y precipitaciones todo el año, con coordenadas latitud sur: 3° 4'48.34"S y altitud de 2671 m.s.n.m y temperaturas que oscilan entre 14 ° C.

4.3 Metodología del estudio

4.3.1 Recolección de ovarios para el estudio

Los ovarios fueron recolectados en el centro de faenamiento privado, ubicado en la ciudad de Cuenca, el cual se encuentra bajo inspección oficial de AGROCALIDAD.

Los ovarios fueron colectados una vez por semana y luego transportados en un termo con solución fisiológica a temperatura entre 35°- 37°C, hasta el laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal, en un tiempo no mayor a dos horas.

4.3.2 Preparación de ovarios

En el laboratorio, los ovarios fueron separados de restos de tejidos anexos (ligamentos, cuernos uterinos, envoltura ovárica) con una tijera quirúrgica, cuidando de no romper ningún folículo. Inmediatamente, los ovarios fueron lavados en cloruro de sodio al 0,9 % atemperada a 37°C por tres ocasiones hasta que el líquido del vaso de precipitación quedase completamente limpio. Posteriormente se colocó el vaso con los ovarios en la placa térmica a 37°C cubierto con papel aluminio.



Figura 3: Mesa de trabajo para la obtención de COC's de cobaya.

4.3.3 Colecta de COC's de los ovarios de cobaya mediante la técnica de cortes (Slicing)

Para la colecta de COC's se realizó el siguiente procedimiento:

- En una caja Petri de 90 x 15mm se colocó 200 µl de H-SOF y luego se ubicó en la platina térmica (37°C).
- Con una pinza se tomó un ovario y este fue colocado en caja Petri (antes preparada).
- Luego con una pinza se sujetó el ovario y se procedió a realizar cortes secuenciales en forma longitudinal y transversales de los ovarios con ayuda de un bisturí.
- Una vez terminado el procedimiento anterior los ovarios fueron lavados con 1.000 µl de H-SOF directamente en la placa de búsqueda.

4.3.4 Unidad experimental

Las unidades experimentales de este estudio fueron 52 ovarios de cobayos provenientes de mataderos, de los cuales se obtuvieron 760 complejos cumulus ovocitos (COC's) recuperados por la técnica de slicing.

Los complejos cumulus ovocitos seleccionados para el presente estudio, fueron clasificados según su morfología en categoría A, B y C de acuerdo a la técnica descrita por Hawk y Wall (1994) y modificada por Ayala et al. (2019) para COC's de bovinos.

4.3.5 Clasificación de COC's

Para la clasificación de los COC's se utilizó la metodología descrita por Hawk y Wall (1994) y que fue modificada por Ayala et al., (2019).

Tabla 1. Metodología de valoración de COC's

(Hawk y Wall, 1994)			(Ayala et al., 2019)
Tipo de ovocito	Características del cúmulo	Características del ovocito	Tipo de ovocito
Calidad buena (A)	Compacto, con varias capas de células con granulosas adherida; el citoplasma se ve claramente	Homogéneo denso y finamente granulado.	Aptos (Tipo A y B)
Calidad intermedia (B)	Cúmulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida.	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.	
Rechazados (C)	Células del cúmulo parcial o completamente expandido. O con Falta de células del cúmulo (ovocitos desnudos)	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.	No aptos (Tipo C)

Una vez transcurrido 5 minutos la caja Petri fue llevada al estereoscopio, donde se realizó la búsqueda y clasificación de los (COC's) en: aptos (Tipos A y B) y no aptos (Tipo C), (**Tabla 1**). Los COC's aptos fueron lavados tres veces en

gotas de 100 μ l de HEPES-Fluido oviductal sintético (H-SOF) con el fin de librarlos de detritos tisulares, coágulos, etc.

Del total de COC's (760) de cada tipo A (236); B (263) y C (261) obtenidos en cada maniobra (repetición), se tomó al azar un 20% de COC's de cada categoría (A, B y C) y luego colocados en el respectivo grupo de ensayo: testigo 1 (TA), testigo 2 (TB) y testigo 3 (TC). Por lo tanto, este 20% de cada maniobra fue el grupo testigo de cada tipo de COC's y estos no fueron sometidos a la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) y pasaron directamente a la fase de maduración *in vitro*.

Otro 20% de COC's de cada tipo (A, B y C) fueron utilizados para realizar morfometría de los ovocitos pre-maduración, identificándose en tipo A (M1pr); tipo B (M2pr) y tipo C (M3pr).

Al 60% de los COC's restantes de cada tipo (A, B y C) se aplicó la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB), para determinar la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Se identificó a los COC's de tipo A (G1); tipo B (G2) y tipo C (G3).

4.3.6 Caracterización morfométrica de COC's

El 20% de COC's asignados para morfometría, fueron colocados en microgotas de 100 μ l, que contenía Hialuronidasa (H3506-Sigma®) en concentración de 1mg/ml (p/v). Luego por acción mecánica (pipeteo continuo) se procedió a denudar los ovocitos. Una vez denudados, los ovocitos estos fueron colocados en microgotas de 50 μ l de PBS y llevadas al microscopio. Se determinaron 5 medidas morfométricas según la metodología descrita por Ueno y Niimura (2008).

- **Diámetro total del ovocito:** medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del ovocito incluida la zona pelúcida y expresada en micras (μ m).
- **Espesor de la zona pelúcida:** Grosor o ancho de la zona pelúcida expresada en micras (μ m).
- **Diámetro del citoplasma:** medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del citoplasma y expresada en micras (μ m).

- **Espacio perivitelino:** Determinado mediante la fórmula = $\text{diámetro del ovocito} - \text{diámetro del citoplasma} / 2$, expresada en micras (μm).
- **Volumen del ovocito:** Determinado mediante la fórmula = $4/3(\pi)(\text{radio del ovocito})^3$ y expresado en micras cúbicas (μm^3).

4.3.7 Prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB)

Previamente se preparó alícuotas de solución stock de BCB (26 μM del BCB), en tubos eppendorf de 1,5 ml y almacenado en refrigeración, 2 horas antes de cada maniobra se procedió a preparar la tinción final de BCB con 2,4 μl de la solución stock del BCB en 1.000 μl de medio mDPBS.

Procedimiento:

Los COC's fueron lavados 3 veces en una solución tampón de fosfato salino de Dulbecco en microgotas (100 μl), este procedimiento se realizó por separado para cada tipo de COC's (A, B y C).

A continuación, los COC's fueron depositados en microgotas de 50 μl de la solución final del BCB e inmediatamente llevados a la cámara de CO_2 por 90 minutos a 38,5°C de temperatura y una atmósfera humidificada.

Cumplido el tiempo de incubación, se extrajo la caja Petri de la cámara de CO_2 y los COC's fueron lavados tres veces en microgotas (100 μl) de HEPES-Fluido oviductal sintético (H-SOF), para luego ser llevados al estereoscopio para su valoración. Los ovocitos con citoplasma no teñido fueron considerados como BCB negativos (BCB-), y los teñidos como BCB positivos (BCB+), basado en la metodología descrita por Catalá et al., (2011).

4.3.8 Maduración de ovocitos

El 20% de COC's de cada tipo (A; B y C) que fueron destinados para los grupos: testigos 1 (TA), testigo 2 (TB) y testigo 3 (TC), fueron llevados directamente a la cámara de CO_2 por 24 h.

Sin embargo, el 60% de los COC's de cada grupo (A=G1; B=G2 y C=G3) que recibieron la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB), una vez valorada la respuesta a la prueba, fueron organizados en subgrupos de acuerdo con el

resultado obtenido en: G1=subgrupos (G1BCB+; G2BCB-); G2=subgrupos (G2BCB+; G2BCB-) y G3 subgrupos (G3BCB+; G3BCB-).

Cada subgrupo fue lavado dos veces en H-SOF por separado y luego colocados en medio de maduración, testeado para bovinos (microgotas de 50 μ l), que contenía: TCM 199 suplementado con 10% Albúmina Sérica Bovina (BSA), 100 μ g/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 μ g/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 μ g/ml de estradiol y 250 μ g/ml de gentamicina (Duma, 2019). Finalmente, fueron colocados en una estufa de CO₂ al 5%, Humedad del 90% y 38,5 °C de temperatura por 24 horas.

4.3.9 Determinación de la morfometría de los ovocitos post-maduración

Pasada las 24h de maduración se evaluó la morfometría del ovocito de cada grupo testigo 1 TA, testigo 2 TB, testigo 3 TC y subgrupo en estudio: G1=subgrupos (G1BCB+; G1BCB-); G2=subgrupos (G2BCB+; G2BCB-) y G3 subgrupos (G3BCB+; G3BCB-).

Los COC's se colocaron en microgotas (100 μ l) por separado, la cual contenían Hialuronidasa (Sigma®) en concentración 1 mg/ml (p/v) por dos minutos y se procedió a denudarlos, con el mismo procedimiento descrito anteriormente. Una vez denudados fueron evaluados como se describió anteriormente (en pre-maduración).

4.3.10 Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la maduración *in vitro*

Después de 24h de maduración en la cámara de CO₂, los COC's fueron llevados a un estereoscopio para evaluar el grado de maduración en base a la morfología (expansión) de las células del cúmulus.

Para la determinación del estado de maduración nuclear, se tomó los COC's de cada grupo y subgrupo en estudio y se colocó en microgotas (100 μ l) que contenía un compuesto por Hialuronidasa (Sigma®) en concentración 1 mg/ml (p/v) por dos minutos y se procedió a denudarlos, con el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Una vez desnudados los ovocitos fueron expuestos por 30 minutos a medio de fijación: 750 μ l de H-SOF y 250 μ l de Glutaraldehído al 2%; posteriormente estuvieron sometidos a fluorocromo Hoechst (33342, Sigma) en una concentración de 1 μ g/ml (p/v) por 15 minutos para luego ser depositados en gotas de medios de montaje: 1.000 μ l de H-SOF, 1.000 μ l de Glicerol y 1.000 μ l de Hoechst stock. Al final fueron evaluados en un microscopio de epifluorescencia marca Nikon9 Eclipse Ci Series H550S. El colorante fue excitado por la luz ultravioleta con una longitud de onda cercana a 350 nm, emitiendo una fluorescencia azul/cian de 461 nm (Long et al., 1994). Esta tinción fluorescente permitió determinar si los ovocitos llegaron a metafase II (Veshkini et al., 2016).

4.4 Análisis estadístico.

Los datos fueron tabulados en Excel y el análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 25 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU). Se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov de las variables en estudio.

Se establecieron estadígrafos principales de la obtención de COC's mediante la técnica de Slicing.

La evaluación de la clasificación morfológica de los COC's mediante el BCB, la determinación del número de ovocitos BCB+ y BCB- en cada uno de los tipos de COC's (A, B y C) fueron realizados mediante un ANOVA unidireccional y para comparar medias se realizó la prueba de Tukey, al igual que en la valoración de la morfometría de los ovocitos.

Para la valoración del porcentaje de maduración de los ovocitos se utilizó una prueba de Chi cuadrado al 5%.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Recuperación de COC's de los ovarios de cobaya mediante la técnica de cortes

La media de ovocitos por ovario fue de 14,6, llegando a procesarse 760 COC's provenientes de 52 ovarios. Estos resultados son similares a los reportados por Wang et al., (2019) quienes al utilizar la técnica de punción folicular obtuvieron 14 ovocitos. Estos resultados mantienen concordancia con la conclusión emitida por Beltrán y Rodríguez (2012) quienes indican que no existe diferencia estadística entre el número de ovocitos viables obtenidos, como el tiempo empleado en la recuperación COC's al utilizar en la técnica de aspiración o la de slicing.

5.2 Clasificación morfológica de los COC's

Los COC's recuperados fueron clasificados en forma A, B y C, se determinó que el 31,05% (236) correspondían a COC's de categoría A, un 34,61% (263) a categoría B y el 34,34% (261) a categoría C, considerándose un 65,66% (499) como aptos (A y B) y un 34,34% (261) de no aptos (C). El número medio de COC's en cada una de las categorías está muy por debajo de lo establecido por Wang et al. en el (2019) quienes obtuvieron 52,48% de COC's de tipo A, el 36,38% en B y el 9,8% como C, estimando un 88,5% de aptos. Esta diferencia podría ser explicado por la procedencia de los ovocitos, ya que Wang et al., en el (2019), obtuvo los COC's de folículos preovulatorios de cobayas sincronizadas y en nuestro estudio se obtuvieron COC's de ovarios de matadero que se encontraban en un momento desconocido del ciclo estral; además, la técnica utilizada para la colecta de COC's fue diferente (punción folicular vs cortes respectivamente)

5.3 Prueba del Azul Brillante de Cresilo

Se sabe que la tinción con el Azul Brillante de Cresilo (BCB) es una metodología no invasiva que permite la selección de ovocitos con diámetros mayores que proporcionan mejor desarrollo embrionario en bovinos (Blondin et al., 2002).

UCUENCA

Basados en estos principios y luego de aplicar la prueba del BCB por primera vez a COC's en cobaya se determinó que un 71,6% (101) de los COC's de tipo A fueron BCB+, que el 60% (87) del tipo B reaccionaron positivamente al BCB y que el 63,5% (94) de COC's tipo C marcaron BCB+. Observando diferencia estadística ($p < 0,05$) entre los BCB+ de los tipos A y B; sin embargo, los del tipo C presentaron valores similares al A y B (**Figura 4**).

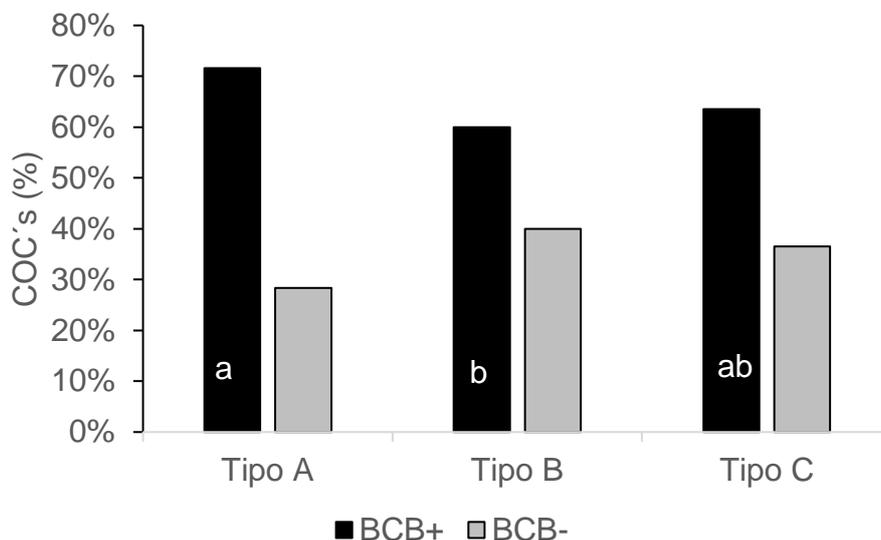


Figura 4: Valoración de la clasificación morfológica de los complejos cúmulus ovocitos (Tipo: A, B y C) mediante la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB+ y BCB-). Letras diferentes=indican diferencia estadística entre columnas (BCB+). Prueba de Chi cuadrado ($a-b=p < 0,05$).

5.4 Morfometría del ovocito en cada uno de los tipos de COC's

Al evaluar la morfometría del 20% de ovocito de tipo A; B y C (premaduración), se estableció que los COC's de Tipo A y B (aptos), fueron más grandes que los COC's no aptos (tipo C), con diferencia estadística (**Tabla 2**).

Tabla 2. Media y desviación estándar de las variables morfométricas del ovocito de cobaya en los COC's de tipo A, B y C, premaduración.

	Tipo A	Tipo B	Tipo C
Diámetro total del ovocito (µm)	122,6±12,36 ^b	116,9±13,23 ^b	111,6±13,43 ^a
Zona pelúcida (µm)	13,5±2,95 ^a	13,4±2,65 ^a	13,3±2,59 ^a
Diámetro interno (µm)	109,2±11,28 ^b	103,6±12,41 ^a	98,3±12,89 ^a
Citoplasma (µm)	106,5±10,96 ^b	100,9±12,53 ^a	95,7±12,72 ^a
Espacio perivitelino (µm)	2,6±1,14 ^a	2,7±1,06 ^a	2,5±1,19 ^a
Volumen (µm)	995002,9±290575,55 ^b	868934,8±293557,20 ^{ab}	758162,3±261961,29 ^a

Letras diferentes=diferencia estadística entre columnas. Prueba de Tukey al 5%.
Clasificación de COC's (Tipo A; B y C) $p < 0,05$.

Investigaciones realizadas por Anguita et al., (2007) demostraron que la técnica de cortes permite recolectar más COC's que con la técnica de aspiración folicular, esto basado en que con la técnica de cortes se colectan ovocitos provenientes de folículos antrales y pre-antrales, en cambio con la técnica de aspiración únicamente se aspiran folículos grandes ($\geq 1\text{mm}$). Esta gran heterogeneidad en el proceso de colecta de COC's lleva a tener ovocitos con tamaños muy variables.

Si bien no existen estudios que relacionen las características morfométricas con la morfología tradicional (Tipo A; B y C) del ovocito en la cobaya, en otros roedores si existen trabajos que establecen que ovocitos con tamaños $>70\ \mu\text{m}$ son significativamente más grandes y con mayor funcionalidad comparados con los ovocitos medianos (60-70 μm) y pequeños ($<60\ \mu\text{m}$) (Wu et al., 2007), datos similares a los encontrados en el presente trabajo.

5.5 Maduración de ovocitos

Al valorar los ovocitos del grupo testigo (20% que no recibieron la prueba del BCB y pasaron directamente a la MIV) y que fueron clasificados como tipo A, se observó que estos presentaron reanudación meiótica y llegando a metafase II (MII) en un 40,4%, a su vez los tipos B presentaron un porcentaje de maduración del 31,7% sin diferencia estadística entre estos dos grupos ($p > 0,05$) y en el tipo C un 18,2%, el cual difiere ($p < 0,05$) con los de tipo A y B (**Figura 5**).

El porcentaje de maduración obtenido en el presente trabajo fue similar al observado ($41,4 \pm 3,7\%$) en los COC's de tipo A, que maduraron en un medio a base de M199 suplementado con $0,5 \mu\text{g/ml}$ de FSH ovina (NIDDK), $5,0 \mu\text{g/ml}$ de LH ovina (NIDDK), $1,0 \mu\text{g/ml}$ de estradiol (E-8875), y antibióticos (Wang et al., 2019).

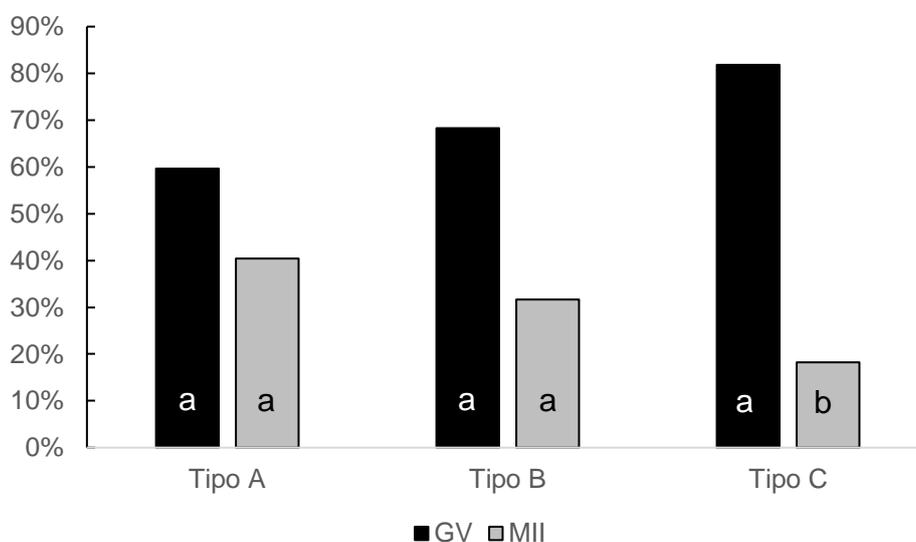


Figura 5: Porcentaje de maduración nuclear (GV=vesícula germinal; MII=metafase II), en el 20% de COC's tipo A, B y C que no recibieron la prueba del BCB (Testigo) $p < 0,05$.

Sin embargo, el porcentaje de maduración nuclear se vio afectado cuando los COC's de los tipos A; B y C, pasaron por la prueba del BCB para ser clasificados como BCB+ o BCB- y colocados a madurar por 24 horas.

Luego de la MIV se determinó que los COC's de tipo A clasificados como BCB+ llegaron a madurar en un 21,8%, es decir que el paso por el BCB reduje a la

mitad el porcentaje de maduración observado en el grupo testigo del tipo A (40,4%). La tendencia a disminuir el porcentaje de maduración fue observada en los tipos B y C de los grupos BCB+ y BCB- (**Figura 6**).

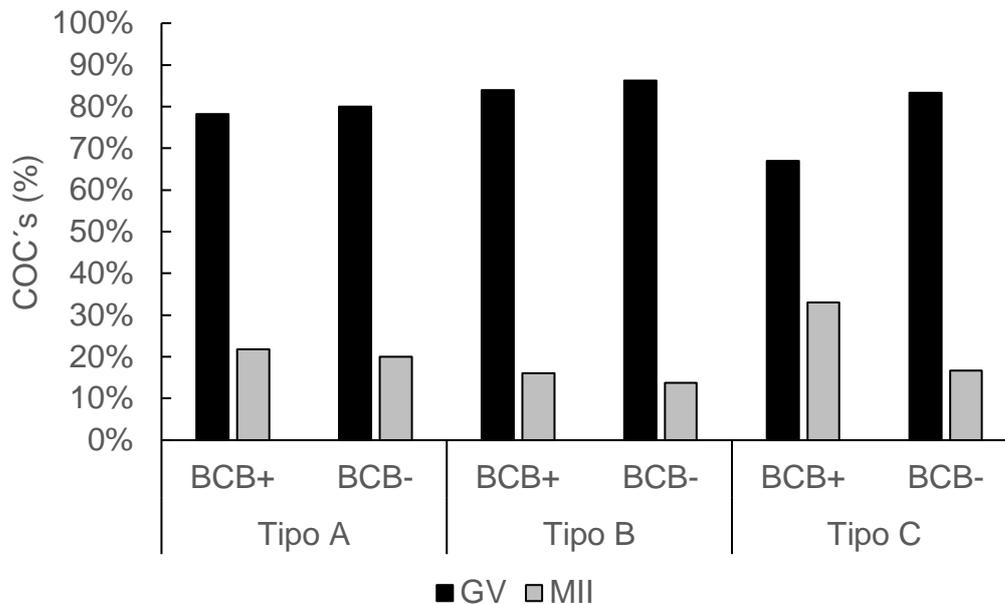


Figura 6: Porcentaje de maduración nuclear (GV=vesícula germinal; MII=metafase II), en los diferentes tipos de COC's (A, B y C), que reaccionaron a la prueba del BCB (BCB+ y BCB-) $p < 0,05$.

Un dato interesante que se observado en nuestro estudio fue que los ovocitos de la categoría C mostraron un porcentaje similar (estadísticamente) de maduración en comparación con A y B. Consideramos que se debe a que en los ovocitos de tipo C se encuentran los COC's maduros (Wang et al., 2019).

5.6 Morfometría de los ovocitos post-maduración *in vitro*

5.6.1 Diámetro total de ovocito (DT)

El diámetro total del ovocito promedio incluido la zona pelúcida (ZP) de los ovocitos de tipo A; B y C valorados pre-maduración (DT Pre) fue estadísticamente similar al del ovocito de tipo A; B y C evaluados post-maduración (**Tabla 3**).

Si bien existen trabajos relacionados con el tamaño del ovocito que determinan valores menores ($78,9 \mu\text{m} \pm 9,3 \mu\text{m}$) al del presente trabajo, estas fueron realizadas en cobayas de otra raza Dunkin-Hartley, animales con pesos

corporales de media de 628 gramos, y para la medición utilizaron un microscopio de luz equipado con una cámara Olympus DP11 en el cual observaron cortes histológicos de los folículos y los ovocitos y en base a esto realizaron la medición (Sadeu et al., 2007).

Tabla 3: Media y desviación estándar de las variables morfo métricas del ovocito de la cobaya en los COC´s de tipo A, B y C, pre y post-maduración.

	Tipo A		Tipo B		Tipo C	
	Pre-mad	Post-mad	Pre-mad	Post-mad	Pre-mad	Post-mad
DT	122,6±12,36 ^{ba}	119,2±7,87 ^A	116,9±13,23 ^{ba}	110,0±11,02 ^A	111,6±13,43 ^{ba}	107,5±16,90 ^A
ZP	13,5±2,95 ^{aA}	14,6±2,82 ^A	13,4±2,65 ^{aA}	14,2±3,19 ^A	13,3±2,59 ^{aA}	13,0±2,85 ^A
DI	109,2±11,28 ^{ba}	104,6±6,79 ^A	103,6±12,41 ^{ab}	95,8±10,66 ^A	98,3±12,89 ^{ab}	94,4±16,00 ^A
Cit	106,5±10,96 ^{ba}	102,0±15,91 ^A	100,9±12,53 ^{ab}	93,4±10,51 ^A	95,7±12,72 ^{ab}	92,0±15,91 ^A
EP	2,6±1,14 ^{aA}	2,6±0,98 ^A	2,7±1,06 ^{aA}	2,4±0,98 ^A	2,5±1,19 ^{aA}	2,3±1,20 ^A
Vol	995002,9±290575,55 ^{ba}	897631,9±293557,20 ^A	868934,8±293557,20 ^{abA}	718477,6±213538,64 ^A	758162,3±261961,29 ^{aA}	698336,1±343543,93 ^A

ab=diferencia estadística entre columnas. AB=diferencia estadística entre pre y post-maduración. Prueba de Tukey al 5%. Clasificación de COC´s (Tipo A; B y C) $p < 0,05$.

5.6.2 Espesor de la zona pelúcida (ZP)

A su vez las medias del espesor de la ZP en los ovocitos de tipo A, B y C fueron similares o los observados post-maduración en cada una de estas categorías. Los resultados muestran que el espesor de la zona pelúcida tiene una medida similar entre grupos ($p > 0,05$), considerándose no significativas la diferencia (**Tabla 3**), resultados similar al trabajo de Fernández et al., en (2018) que llega a determinar 12 μm de ZP. Se considera que en la mayoría de las especies mamíferas los ovocitos se fertilizan mejor *in vitro* cuando el grosor de la ZP es inferior a 18,6 μm (Lasiene et al., 2009).

5.6.3 Diámetro del citoplasma del ovocito (Cit)

Al comparar los valores medios de la morfología del ovocito, se observó que el diámetro interno del ovocito de Tipo B y C evaluados pre-maduración (DI Pre) fue más grandes comparados con el diámetro interno del ovocito post-maduración (**Tabla 3**), con diferencia estadística entre grupos ($p < 0,05$). De igual manera el diámetro del citoplasma de los ovocitos tipo B y C se vieron reducidos luego del proceso de maduración *in vitro* (**Tabla 3**). Sin embargo, los ovocitos de tipo A, no redujeron sus medidas morfométricas post-maduración.

Las medidas obtenidas en el presente estudio son superiores al trabajo de Sadeu et al., (2007) que obtuvo 78 μm aproximadamente diámetro ovocitario. Estas diferencias pueden explicarse debido a que el estudio de Sadeu et al., en el (2007) fue en cortes histológicos de folículos de cobaya.

Un reporte en ratas (75,9 μm y 67.7 μm) antes y después de la MIV (Ueno y Niimura, 2008); que mantiene la tendencia de la disminución del citoplasma, tendencia similar a la observada en nuestro trabajo, en otras especies como la bovina se menciona que esto puede estar relacionado con el aumento del espacio perivitelino (Duma, 2019), sin embargo en nuestro estudio no se observó una disminución del espacio perivitelino.

5.6.4 Tamaño de espacio perivitelino (EP)

La comparación de las medias del tamaño del EP antes y después de la maduración *in vitro* entre los tipos A, B y C pre maduración y pos maduración no difieren significativamente ($p > 0,05$) (**Tabla 3**).

Algunas investigaciones han determinado en animales de laboratorio como las ratas tamaño de EP antes de la MIV de 0,28 μm y luego de 14 h de MIV de 5,40 μm (Ueno y Niimura, 2008); en conejas 0,12 \pm 0,07 μm y 9,68 \pm 0,44 μm antes y post MIV (Yoshida y Niimura, 2011). Esta tendencia del aumento del espacio perivitelino se debe a los glucosaminoglucanos, incluidos el ácido hialurónico (HA), que ocupan el espacio perivitelino y que es sintetizado por las células de cúmulus y atraviesan la ZP por canales de transporte. El HA es una molécula que tiene la capacidad de retener grandes volúmenes de agua, y cuando se acumula aumenta el espacio al absorber moléculas de H_2O , deshidratando el citoplasma del ovocito (Inoue et al., 2007). Probablemente en nuestro estudio no se da esta tendencia debido al porcentaje bajo de maduración mediante la MIV obtenido.

5.6.5 Volumen del ovocito

El volumen del ovocito físicamente tiene comportamientos similares en los tres tipos de ovocitos pre y post-maduración (**Tabla 3**). Resultados superiores a los determinados por de Fernández et al., en (2018).

6. CONCLUSIONES

El medio de maduración *in vitro* a base de TCM 199 testado para bovinos en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, y utilizado en el presente trabajo permitió que los COC's reanuden su meiosis llegando a metafase II; sin embargo, los porcentajes no fueron los esperados.

7. Bibliografía

- Aliaga, L., Moncayo, R., Rico, E., y Caycedo, A. (2009). Pubertad. En *Producción de cuyes*. Universidad Católica Sedes Sapientiae.
- Almeida, A. (2016). Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho [Universidad de Cuenca]. En *Universidad de Cuenca*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24954/1/tesis.pdf>
- Alvarado, J. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero. *Universidad de Cuenca, 1*, 13–55. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26216/1/Tesis.pdf.pdf>
- An, L., Chaubal, S., Liu, Y., Chen, Y., Nedambale, T., Xu, J., Xue, F., Moreno, J., Tao, S., Presicce, G., y Du, F. (2017). Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Development, 63*(2), 175–183. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-142>
- An, L., Liu, J., Du, Y., Liu, Z., Zhang, F., Liu, Y., Zhu, X., Ling, P., Chang, S., Hu, Y., Li, Y., Xu, Yang, L., Xue, F., Presicce, G., y Du, F. (2018). Synergistic effect of cysteamine, leukemia inhibitory factor, and Y27632 on goat oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology, 108*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.028>
- Anguita, B., Jimenez-Macedo, A. R., Izquierdo, D., Mogas, T., y Paramio, M. T. (2007). Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology, 67*(3), 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.003>
- Araníbar, E., y Echevarría, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 25*(1), 29–36. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i1.8465>

- Aucapiña, C., y Marín, Á. (2016). Efecto de la extirpación de las espículas del glánde del cuy como técnica de esterilización reproductiva y su influencia en agresividad y ganancia de peso en comparación con un método químico (alcohol yodado 2%). *Universidad de Cuenca*, 12–17. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24782/3/1.TESIS CUYES.pdf>
- Avilés, D. F., Martínez, A. M., Landi, V., y Delgado, J. V. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*): un recurso andino de interés agroalimentario The guinea pig (*Cavia porcellus*): An Andean resource of interest as an agricultural food source. *Animal Genetic Resources/Ressources génétiques animales/Recursos genéticos animales*, 55, 87–91. <https://doi.org/10.1017/S2078633614000368>
- Avilés Esquivel, D. (2016). Caracterización genética del cuy doméstico de América del Sur mediante marcadores moleculares. *Universidad de Córdoba*. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/13382>
- Ayala, L., Palacios C., T., Nieto E., P., Calle O., G., Rodas C., R., Dután S., J., Murrillo, Y., y Samaniego C., J. (2019). Capacidad de reinicio de la meiosis de ovocitos provenientes de folículos de varios tamaños obtenidos de ovarios de camal. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(3), 1164–1174. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.15437>
- Ayala, L., Samaniego Campoverde, J., Argudo Garzón, D., Perea Brugal, M., Perea Ganchou, F., Rodas Carpio, E., Nieto Escandón, P., Ayala Guanga, L., Samaniego Campoverde, J., Argudo Garzón, D., Perea Brugal, M., Perea Ganchou, F., Rodas Carpio, E., y Nieto Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1), 17571. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I1.17571>
- Ayala, L., Samaniego, J., Nieto, P., Rodas, R., Dután, J., Calle, G., Murrillo, Y., Vázquez, J., Daniel, A. G., y Perea, F. (2018). Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Rev Inv Vet Perú*, 29(2), 552–558.

<https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.13816>

- Barba, E. (2016). Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos. *Universidad de Cuenca*, 79. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26153>
- Blondin, P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., y Sirard, M. A. (2002). Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 66(1), 38–43. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.38>
- Calvo, J., Robert, D., Viqueira, M., y Lombide, P. (2015). Viabilidad de ovocitos vitrificados y madurados in vitro de gata doméstica adulta (*Felis catus*) en estación reproductiva. *International Journal of Morphology*, 33(4), 1242–1247. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022015000400008>
- Cano, D. (2014). Efecto de los minerales Ca, Mg, Na y K en la predeterminación del sexo de las crías de cuy (*Cavia porcellus*). *Universidad Nacional del Centro del Perú*, 85. <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1824/TesisCano.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cañón, K., Cajas, Y., Garcia, R., Lorenzo, P., Carrera, R., Rebollar, P., y Arias, M. (2015). Effect of epidermal growth factor on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of guinea pig oocytes. *Developmental Biology and Physiology of Reproduction*, 12(3), 793.
- Cañón, K., y Córdova, X. (2012). Evaluación de la maduración in vitro de oocitos de cobaya (*Cavia porcellus*) en Ecuador: resultados preliminares. *REDUCA*, 4(15). <http://www.revistareduca.es/index.php/reduca/article/view/1422>
- Catalá, M. G., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaguera, R., Papillier, P., y Paramio, M. T. (2011). Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, 142(4), 517–527. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0528>
- Choi, J. K., y He, X. (2015). Improved Oocyte Isolation and Embryonic Development of Outbred Deer Mice. *Scientific Reports*, 5(1), 12232.

<https://doi.org/10.1038/srep12232>

- Cohen, P. E., y Holloway, J. K. (2015). Mammalian Meiosis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set*, 1, 5–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00001-6>
- Dorsch, M. M., Glage, S., y 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>
- Duma, M. (2019). “Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero”. *Universidad de Cuenca*, 1–78. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31787/1/Trabajo-de-titulación.pdf>
- Estrella, C., y Suconota, A. (2018). Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular. *Universidad de Cuenca*, 23–25. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/30082/1/Trabajo-de-titulacion.pdf>
- Felipe, A., y Masson, P. (2005). Un modelo descriptivo del sistema reproductor hembra del coipo (*Myocastor coypus*) I: el ovario. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VI(12), 1–22. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617178009>
- Felipe, A., Teruel, M., Callejas, S., y Cabodevila, J. (2001). Description of the characteristics of oocytes and zygotes of Coypu (*Myocastor coypus*). *Revista chilena de anatomía*, 19(2), 161–165. <https://doi.org/10.4067/s0716-98682001000200007>
- Fernández, A., Encalada, T., Guaman, A., Ayala, L., Argudo, D., Rosales, C., y Perea, F. (2018, mayo). Caracterización morfométrica de útero, ovarios y ovocitos de cobayas criollas (*Cavia porcellus*) de la sierra sur de Ecuador. *XXVI Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal V Simposio Internacional de Producción Animal*, 149. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30751/1/documento.pdf>

- Fernandez, F., Hernández, J., y Reyes, M. (2010). Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 78–83. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2010000200002
- Findlay, J. K., Hutt, K. J., Hickey, M., y Anderson, R. A. (2015). How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? *Biology of Reproduction*, 93(5), 111–112. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.115.133652/2434274>
- Garris, D. R., y Foreman, D. (1984). Follicular Growth and Atresia during the Last Half of the Luteal Phase of the Guinea Pig Estrous Cycle: Relation to Serum Progesterone and Estradiol Levels and Utero-Ovarian Blood Flow. *Endocrinology*, 115(1), 73–77. <https://doi.org/10.1210/ENDO-115-1-73>
- Gonzales, H., y Gonzales, H. (2005). Maturation of pig oocytes in vitro in a medium with pyruvate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(6), 869–872. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000600008>
- Gregoire, A. (2012). Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*): production et congélation des embryons. *Université Claude Bernard - Lyon I*, 111. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00981743>
- 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*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Hargaden, M., y Singer, L. (2012). Anatomy, Physiology, and Behavior. En *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (1st ed., pp. 575–602). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1>
- Hawk, H. W., y Wall, R. J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 41(8), 1571–1583. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90822-Z](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90822-Z)

- Inoue, A., Akiyama, T., Nagata, M., y Aoki, F. (2007). The Perivitelline Space-Forming Capacity of Mouse Oocytes is Associated with Meiotic Competence. *Journal of Reproduction and Development*, 53(5), 1043–1052. <https://doi.org/10.1262/JRD.19064>
- Ioannou, J. M. (1964). Oögenesis in the guinea-pig. *Development*, 12(4), 673–691. <https://doi.org/10.1242/DEV.12.4.673>
- Jagiello, G. M. (1969). Some cytologic aspects of meiosis in female guinea pig. *Chromosoma*, 27(1), 95–101. <https://doi.org/10.1007/BF00326113>
- Karami, H., Azimi, G., y Torki, M. (2014). Developmental competence of bovine oocytes selected based on follicle size and using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12(11), 771–778. [/pmc/articles/PMC4330657/](https://doi.org/10.1007/BF00326113)
- Khurana, N. K., y Niemann, H. (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54(5), 741–756. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00387-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00387-3)
- Kim, M., Hong, S. J., Lee, J. H., Min, C. K., Hwang, K. J., y Park, R. W. (2011). Comparación de medios de maduración in vitro de ovocitos inmaduros: La efectividad del medio de cultivo para blastocitos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproduccion Humana*, 28(1), 9.
- Kosaka, T., y Takahashi, K. W. (1989). Effect of pregnant mare's serum gonadotropin on increased ovulation in guinea pigs with synchronized estrous cycle. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, 38(1), 81–83. https://doi.org/10.1538/EXPANIM1978.38.1_81
- Lasiene, K., Vitkus, A., Valančiute, A., y Lasys, V. (2009). Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina 2009, Vol. 45, Page 509*, 45(7), 509. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA45070067>
- Logothetopoulos, J., Dorrington, J., Bailey, D., y Stratis, M. (1995). Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: Fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *The Anatomical Record*, 243(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/ar.1092430106>

- Long, C., Damiani, P., Pinto, C., MacLean, R. A., Duby, R. T., y Robl, J. M. (1994). Matured in vitro under various conditions of fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 169, 361–369.
- Lorenzo, M., Tello, M., Fischman, M., Claver, J., y Lombardo, D. (2015). Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. *InVet*, 17(1), 25–34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179144263003>
- Mangia, F., y Epstein, C. (1975). Biochemical studies of growing mouse oocytes: Preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Developmental Biology*, 45(2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90061-5)
- Martínez, Y. (2013). Análisis De La Morfología Ovocitaria En Bovina Previa a Fecundación in Vitro. *Universidad de Oviedo*, 36. http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM_Yaiza_Martinez.pdf
- Matorras, R., y Hernández, J. (2007). Clasificación y cultivo de los ovocitos. En *Estudio y tratamiento de la pareja estéril* (1era ed., pp. 263–268). Adalia farma. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=562165>
- Mauleon, P. (1967). Cinétique de l'ovogenèse chez les mammifères. *Archives d'Anatomie microscopique* 56 (3-4) Supplément, 125–150. http://wcentre.tours.inra.fr/prc/internet/historique/cv/mauleon/Mauleon_Arch AnatMicros-1967_3-4_125.pdf
- McGee, E. A., y Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles*. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- Mohammadzadeh, M., Fesahat, F., Khoradmehr, A., y Khalili, M. A. (2018). Influential effect of age on oocyte morphometry, fertilization rate and embryo development following IVF in mice. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(2), 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2017.09.006>
- Nadri, B., Zeinoaldini, S., y Kohram, H. (2009). Ascorbic acid effects on in vitro maturation of mouse oocyte with or without cumulus cell. *African Journal of*

Biotechnology, 8(20), 5616–5620. <https://doi.org/10.5897/AJB09.909>

Pignon, C., y Mayer, J. (2020). Guinea Pigs. En *Ferrets, Rabbits, and Rodents* (4th ed., pp. 270–297). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-48435-0.00021-6>

Pino, T. (2015). Descripción histológica de ovarios y testículos de cuyes (*cavia porcellus*) a los dos meses de edad, suplementados con nucleótidos. *Universidad Católica de Santa María*, 63. <https://core.ac.uk/download/pdf/198133271.pdf>

Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M. P., y Lonergan, P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 62(3), 320–327. <https://doi.org/10.1002/mrd.10138>

Sadeu, J. C., Adriaens, I., Cortvrindt, R., y Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, 68(9), 1228–1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.028>

Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., Watanabe, G., Tsonis, C., Suzuki, A., y Taya, K. (2000). Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *Reproduction*, 118(1), 1–7. <https://doi.org/10.1530/reprod/118.1.1>

Solís, R., y 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*, 87. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2895>

Solorzano, J., y Sarria, J. (2014). Ciclo estral. En *Crianza, producción y comercialización de cuyes* (1era ed., p. 44). Editorial Macro.

Stockard, C. R., y Papanicolaou, G. N. (1917). The existence of a typical oestrous cycle in the guinea-pig—with a study of its histological and physiological changes. *American Journal of Anatomy*, 22(2), 225–283. <https://doi.org/10.1002/AJA.1000220204>

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 Reproduction and Development*, 64(2), 219–225. <https://doi.org/10.1002/mrd.10242>
- Thomas, F., y Vanderhyden, B. (2006). Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: Regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. En *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 4, Número 1, p. 19). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-19>
- Toyoda, Y., y Chang, M. C. (1974). Fertilization Of Rat Eggs In Vitro By Epididymal Spermatozoa And The Development Of Eggs Following Transfer. *Reproduction*, 36(1), 9–22. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0360009>
- Ueno, S., y Niimura, S. (2008). Size of Perivitelline Space and Incidence of Polyspermy in Mouse Oocytes Matured In Vivo and In Vitro. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(1), 44–49. <https://doi.org/10.1274/jmor.25.44>
- Vargas, P. (2018). Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes. *Universidad Politécnica Salesiana*, 1–114. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>
- Veshkini, A., Khadem, A. A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Alamouti, A. A., Soleimani, M., y Gastal, E. L. (2016). Linolenic acid improves oocyte developmental competence and decreases apoptosis of in vitro-produced blastocysts in goat. *Zygote*, 24(4), 537–548. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000507>
- 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*, 82. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/3296/1/T-UTC-00563.pdf>
- 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 promotes guinea pig oocyte meiosis in vitro. *American*

journal of translational research, 11(12), 7479–7491.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31934295>

Wu, Y. G., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G. C., Han, D., Miao, D. Q., y Tan, J. H. (2007). Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: A study using the mouse model. *Cell Research*, 17(8), 722–731. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.66>

Yamasaki, L., Yamasaki, A., Yong, G., De la Tore, J., Fernández, A., Güiris, D., Lau, A., León, H., Ibarra, C., Ocampo, P., Macias, G., Peralta, M., Reyes, M., Ruiz, H., Ruiz, A., Sánchez, H., Melgar, F., González, A., Bautista, G., ... Oliva, A. (2015). Producción in vitro de embriones de vacas sacrificadas. En *Reproducción animal: Temas selectos sobre biotecnología de la reproducción* (1 ed, pp. 1–6). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNACH. <https://books.google.com.ec/books?id=FRqrCwAAQBAJ&pg=PT7&lpg=PT7&dq=El+siero+de+vaca+en+estro,+el+BFS+y+la+BSA+son+fuentes+prot+eicas,+de+aminoácidos+y+también+contienen+hormonas,+factores+de+cr+ecimiento,+vitaminas+y+otras+sustancias+que+el+ovocito+y+el+em>

Yanagimachi, R. (1974). Maturation and fertilization in vitro of guinea pig ovarian oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38(2), 485–488. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0380485>

Yoshida, N., y Niimura, S. (2011). Size of the perivitelline space and incidence of polyspermy in rabbit and hamster oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, 10(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/S12522-010-0067-0>

8. Anexos



Anexo 1: Ovarios de cobaya colectados en matadero.



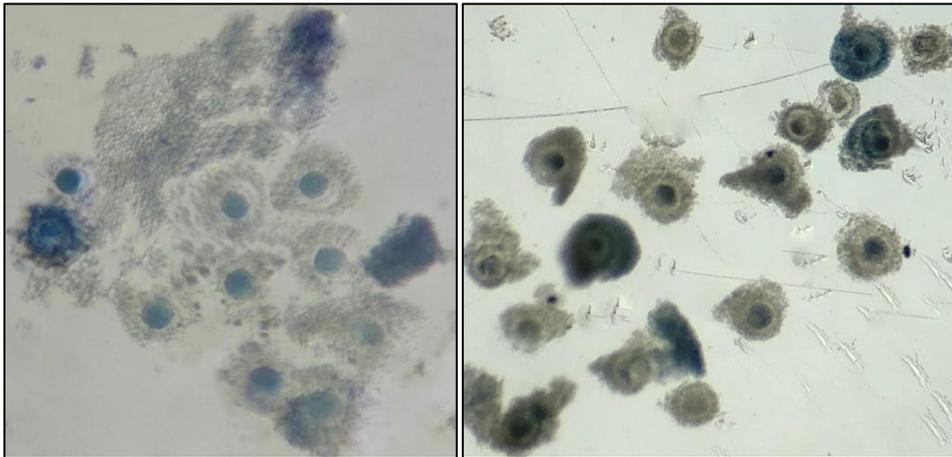
Anexo 2: Realizando la técnica de slicing.



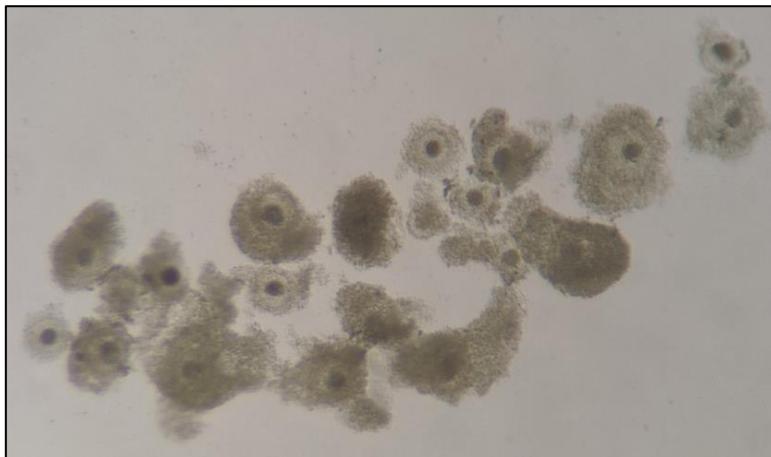
Anexo 3: Denudado de ovocitos previo a la evaluación de morfometría.



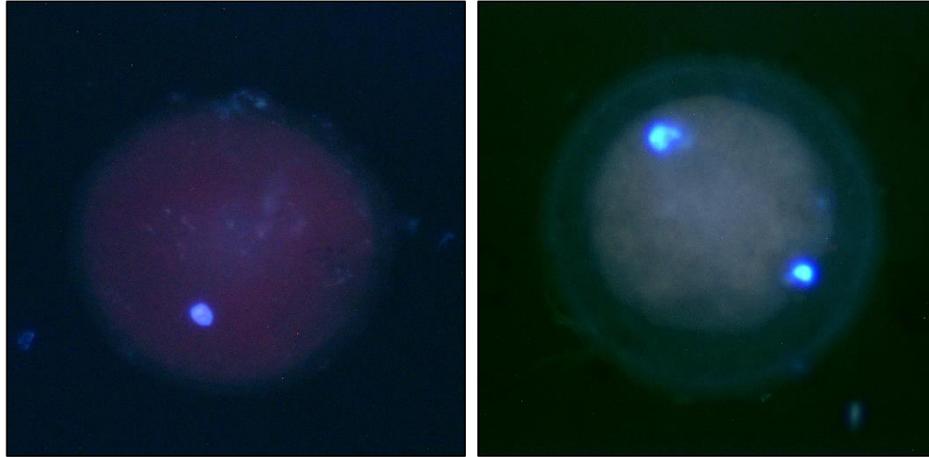
Anexo 4: Ovocitos aptos (categoría A y B) y no aptos (categoría C).



Anexo 5: Ovocitos BCB+ y BCB-



Anexo 6: Expansión de las células del cúmulus luego de la MIV.



Anexo 7: Ovocitos en estado de GV y MII teñidos con Hoechst, vistos con microscopio de fluorescencia.



Anexo 8: Ovocitos medidos antes y después de la MIV mediante software MShot.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

COC's= Complejos cúmulo ovocitos

Cys= Cisteína

LIF=Factor inhibidor de leucemia

G6PDH= Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

BCB= Azul brillante de cresilo

BSA= Seroalbumina bovina

BFS= Suero fetal bovino

H-SOF= Hepes-Fluido oviductal sintético

mDPBS= Solución buffer fosfato de Dulbecco