

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Respuesta ovárica en cobayas (*Cavia porcellus*) a un protocolo de superovulación con diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina**

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


**Autoras:**

Gabriela Elizabeth Camisán Rosales

Karen Tamara Córdova Ávila

**Director:**

José Luis Pesántez Pacheco

ORCID:  0000-0002-5669-6014

**Cuenca, Ecuador**

2023-05-08

## Resumen

Se evaluó la respuesta ovárica en cobayas (*Cavia porcellus*) presincronizadas por 15 días con progesterona previo al protocolo de superovulación con diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG): 100 UI y 150 UI, aplicadas 24 horas antes y al momento (0 horas) de la supresión de progesterona. Veinte y seis cobayas multíparas, de  $100 \pm 5$  días, peso entre 800 a 1150 gramos fueron asignadas aleatoriamente a 5 grupos: 100 UI A, 150 UI A, 100 UI D, 150 UI D y control. El número, tipo y calidad de estructuras no fue afectado al administrar eCG, pero si indujo cambios sobre las características ováricas; los grupos tratados con eCG presentaron mayor volumen ovárico (100 UI A  $77,3 \pm 22,9$ ; 150 UI A  $52,2 \pm 19$ ; 100 UI D  $88,2 \pm 60,4$ ; 150 UI D  $71,1 \pm 44,4$  mm<sup>3</sup> vs. control  $21,7 \pm 5,28$  mm<sup>3</sup>), mayor número de folículos (100 UI A  $10 \pm 8$ ; 100 UI D  $10,4 \pm 9$ ; 150 UI D  $15,8 \pm 7,2$ ) y mayor diámetro folicular (100 UI A  $0,8 \pm 0,5$ ; 150 UI A  $1,2 \pm 0,7$ ; 100 UI D  $0,5 \pm 0,3$ ; 150 UI D  $0,4 \pm 0,2$ ). Mientras que, el diámetro de los cuerpos lúteos de 150 UI A y 150 UI D fue menor (150 UI A  $0,4 \pm 0,4$  y 150 UI D  $0,4 \pm 0,4$  vs 100 UI A  $0,7 \pm 0,2$  y 100 UI D  $0,9 \pm 0,1$ ). Asimismo, la aplicación de eCG promueve la luteinización folicular. En conclusión, administrar eCG antes o el día de supresión de progesterona, no afecta el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas, pero si tiene efecto sobre las características morfológicas del ovario.

*Palabras clave:* progesterona, eCG, cobayas, sincronización, superovulación

### Abstract

Ovarian response was evaluated in guinea pigs (*Cavia porcellus*) presynchronized for 15 days with progesterone prior to the superovulation protocol with different doses of equine chorionic gonadotropin (eCG): 100 IU and 150 IU, applied 24 hours before and at the time (0 hours) of progesterone suppression. Twenty-six multiparous guinea pigs,  $100 \pm 5$  days old, weighing between 800 to 1150 grams were randomly assigned to 5 groups: 100 IU A, 150 IU A, 100 IU D, 150 IU D and control. The number, type and quality of structures were not affected by administering eCG, but it did induce changes on ovarian characteristics; the groups treated with eCG presented greater ovarian volume (100 IU A  $77.3 \pm 22.9$ ; 150 IU A  $52.2 \pm 19$ ; 100 IU D  $88.2 \pm 60.4$ ; 150 IU D  $71.1 \pm 44.4$  mm<sup>3</sup> vs. control  $21.7 \pm 5.28$  mm<sup>3</sup>), higher number of follicles (100 IU A  $10 \pm 8$ ; 100 IU D  $10.4 \pm 9$ ; 150 IU D  $15.8 \pm 7.2$ ) and larger follicular diameter (100 IU A  $0.8 \pm 0.5$ ; 150 IU A  $1.2 \pm 0.7$ ; 100 IU D  $0.5 \pm 0.3$ ; 150 IU D  $0.4 \pm 0.2$ ). Whereas, the diameter of the corpora lutea of 150 IU A and 150 IU D was smaller (150 IU A  $0.4 \pm 0.4$  and 150 IU D  $0.4 \pm 0.4$  vs 100 IU A  $0.7 \pm 0.2$  and 100 IU D  $0.9 \pm 0.1$ ). Also, application of eCG promotes follicular luteinization. In conclusion, administering eCG before or on the day of progesterone suppression does not affect the number, type and quality of recovered structures, but it does have an effect on the morphological characteristics of the ovary.

*Keywords:* progesterone, eCG, guinea pigs, synchronization, superovulation

**Índice de contenido**

Introducción .....	12
2. Objetivos.....	15
2.1.    Objetivo general .....	15
2.2.    Objetivos específicos .....	15
3. Revisión de literatura .....	16
3.1.    Aparato reproductor de la hembra.....	16
3.1.1. Ovarios y oviductos .....	16
3.1.2. Útero .....	16
3.1.3. Cuernos uterinos y cuerpo uterino .....	16
3.1.4. Vagina y vulva .....	17
3.1.5. Glándulas mamarias.....	17
3.2.    Ciclo estral de la cobaya .....	17
3.3.    Membrana vaginal.....	18
3.4.    Dinámica folicular de la cobaya .....	18
3.5.    Sincronización del ciclo estral en las cobayas .....	19
3.6.    Superovulación y hormonas gonadotrópicas .....	20
3.7.    Ovocitos y embriones.....	21
3.8.    Sistemas de clasificación de ovocitos y embriones .....	22
4. Materiales y métodos .....	24
4.1.    Materiales .....	24
4.2.    Metodología .....	24
4.2.1. Área de estudio .....	24
4.2.2. Diseño y preparación de las unidades experimentales .....	25
4.2.3. Revisión de apertura vaginal .....	30
4.2.4. Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras .....	31
4.2.5. Evaluación del desarrollo y calidad de estructuras colectadas.....	32
4.2.6. Volumen ovárico, número y diámetro de cuerpos lúteos y folículos .....	33
4.2.7. Procesado y análisis estadístico .....	34
5. Resultados.....	35
6. Discusión .....	43
Conclusiones .....	46
Referencias.....	47
9. Anexos.....	55

**Índice de figuras**

Figura 1. Dinámica folicular de la cobaya.....	19
Figura 2. Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. ....	25
Figura 3. Representación histológica de estructuras recuperadas en ovarios de cobayas. ....	27
Figura 4. Cuerpo lúteo de cobayas sacrificadas después de la inyección de eCG.....	28
Figura 5. Folículo normal de cobayas sacrificadas después de la inyección de eCG.....	28
Figura 6. Folículo luteinizado de cobayas después de la inyección de eCG.....	28
Figura 8. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal.....	31
Figura 9. Lavado de oviductos (A) y útero (B). ....	32
Figura 10. Esquemático de la medición del volumen ovárico .....	33
Figura 11. Esquemático de la medición del diámetro del cuerpo lúteo. ....	34
Figura 12: Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal de cobayas desde la aplicación de eCG hasta el inicio de celo.....	38
Figura 13. Volumen ovárico de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG. ....	39
Figura 14: Total de folículos normales (Panel A) y diámetro de folículos normales (Panel B) de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG .	40
Figura 15. Total de folículos luteinizados (Panel A) y diámetro de folículos luteinizados (Panel B) de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG .....	41
Figura 16. Total de cuerpos lúteos (Panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (Panel B) de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG. ....	42

**Índice de tablas**

Tabla 1. Características del ciclo estral.....	18
Tabla 2. Clasificación según la calidad y morfología de las estructuras embrionarias.....	22
Tabla 3. Clasificación de estructuras recuperadas.....	35
Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de cobayas sincronizadas.....	36

### Agradecimiento

Al Doctor José Luis Pesántez director de esta tesis quien nos dio la oportunidad de trabajar junto a él y desde el primer momento nos brindó todo su apoyo para poder concluir este trabajo. Gracias por darnos su tiempo y por todos sus consejos.

A los docentes y técnicos docentes del laboratorio de biotecnología de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia quienes a lo largo de estos años colaboraron en mi formación como profesional y persona.

A mis padres y hermanos que siempre han estado brindándome su apoyo, amor y confianza desde que empecé con este sueño, el camino no ha sido fácil, pero ustedes han hecho que todo valga la pena. Gracias también a quien ha sido mi compañero y amigo en esta aventura, a pesar de la distancia supiste siempre estar. Gracias por tu amor, por creer en mí, por apoyarme y sostenerme, gracias por tu paciencia y por quedarte todo este tiempo.

A mis amigos y amigas, a ustedes que siempre se alegraron por cada logro conseguido, gracias por regalarme su amistad y por su cariño sincero.

A mi compañera de tesis Tamara, gracias por tu compromiso, paciencia y determinación para concluir este proyecto, gracias también por regalarme lo más bonito, tu amistad, que esto sea el punto de partida para un futuro próspero y lleno de éxito.

Gabriela Camisán

**Agradecimiento**

Agradezco a mis padres y a mi hermana por el apoyo que me han dado en este trayecto de mi vida universitaria.

Al Dr. José Luis Pesantez por brindarme el conocimiento, herramientas y apoyo para ejecutar este trabajo de titulación.

A los Doctores Xavier Samaniego y Mauricio Dumas por apoyarnos en el trabajo de campo.

A Diego por permanecer siempre presente durante todo el trayecto de mi titulación.

A todas las amistades que de una u otra manera estuvieron y me brindaron una mano en este trabajo.

A todos ustedes, muchísimas gracias...

Karen Córdova



**Dedicatoria**

Con amor a mis padres Efrén y Agripina, quienes me inculcaron los valores más importantes de la vida, ustedes son mi tesoro y mi ejemplo de vida, mi motor y mi mayor orgullo.

A mis hermanos; Rocío con un océano de distancia y muchas horas de diferencia has estado siempre para mí me has apoyado, motivado y has sacado siempre una sonrisa. Elvis, con tu compañía, tus actos y palabras de cariño siempre me animaste, gracias a los dos por saber estar en la distancia, por sus llamadas, mensajes y sus muestras diarias de amor. A mi hermana Carmen, tú que has vivido conmigo cada momento desde que todo esto empezó sea bueno o malo, siempre admiraré tu forma de encontrarle solución a las cosas, gracias por creer en mí, por encaminarme, motivarme y levantarme todos los días. Finalmente, a mi sobrino Mati, aunque estes lejos el solo escuchar y ver tu sonrisa siempre será motivo de mi alegría.

Esto es tan mío como suyo, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, gracias por creer en mí, en este sueño que gracias a ustedes he logrado cumplir, los amo.

Gabriela Camisán

**Dedicatoria**

Dedico esta tesis a mi madre María del Pilar por apoyarme en mi formación académica, a enseñarme el valor de ser una profesional, pero sobre todo una buena persona, a mi padre Luis (+) que, aunque ya no está presente sé que está orgulloso de su hija. A mi hermana Erika por estar acompañándome tanto en los buenos como en los malos momentos. A mi amado Diego por ser un apoyo incondicional al momento de ejecutar este trabajo. A mi compañera de tesis Gabriela por ser ese brazo derecho. A Ariel por apoyarme a seguir adelante en mi carrera. A mis amigos con los que formé grandes amistades y que estuvieron ahí. A mis abuelos Luis y Zoila que me dieron palabras de aliento.

Karen Córdova

**Abreviaturas utilizadas**

**AMV:** apertura de la membrana vaginal.

**CL:** cuerpo lúteo.

**FN:** folículo normal.

**FL:** folículo luteinizado.

**eCG:** gonadotropina coriónica equina.

**FSH:** hormona foliculoestimulante.

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropinas.

**hCG:** gonadotropina coriónica humana.

**LH:** hormona luteinizante

**P<sub>4</sub>:** progesterona.

**PBS:** solución salina taponada de fosfato.

**SOV:** superovulación.

**UI:** unidades internacionales.

**VO:** volumen ovárico.

**H&E:** hematoxilina y eosina.

## Introducción

La producción de cobayos (*Cavia porcellus*) juega un rol importante en la población indígena debido a la composición de su carne como una de las principales fuentes de proteína (Grégoire et al., 2012). La población de cobayos en el Ecuador registrada en el año 2000 fue de 5 millones; sin embargo, existe un constante incremento de la crianza de esta especie dado que la tasa de crecimiento anual estimada es de 14,29% (INEC, 2000).

Asimismo, este roedor también ha sido utilizado de manera habitual desde el siglo XVIII dentro del campo de la biomedicina como un animal de laboratorio (Taylor & Lee, 2012), empleado principalmente para el estudio de enfermedades infecciosas que afectan a la especie humana (Guerrini, 2003; Südmersen & Glennly, 1911). Sin embargo, desde hace más una década su uso como animal de laboratorio ha disminuido, siendo desplazado por otras especies de roedores como ratas y ratones, (Guerrini, 2003), principalmente por su largo periodo de gestación y reducido número de camada en comparación con otras especies de roedores (Portelli, 2013). Además, el mantenimiento del cobayo resulta más costoso que otras especies de animales pequeños; y, los reactivos inmunológicos del cobayo son insuficientes y su genoma no se ha dilucidado por completo (Padilla-Carlin et al., 2008).

Por otro lado, el cobayo es buen modelo para el estudio de la reproducción en humanos debido a que tienen el mismo tipo de placentación (hemocorial), ovulación espontánea, fase folicular y luteal completa, características morfofisiológicas del cuerpo lúteo y tamaño de camada parecidas (Roa et al., 2012; Suzuki et al., 1993). Con respecto al periodo de gestación de la cobaya viene siendo relativamente larga lo que permite estudiar con mayor detalle el desarrollo e implantación embrionaria (Morrison et al., 2018). De modo que, los trabajos que se han realizado hasta ahora se enfocan en mejorar los métodos de control del ciclo estral y respuestas a la superovulación (SOV) con miras a recolectar una mayor cantidad de ovocitos o embriones para futuros estudios (Sharp, 2017; Suzuki et al., 1993) pues, es un animal que solo tiene 3,8 ovulaciones por ciclo estral (Aranibar & Echevarría, 2014; Noonan, 1994) y la mayoría de los folículos se pierden por atresia (Hermreck & Greenwald, 1964).

Los principales tratamientos para el control del ciclo estral en roedores y en especial en el cobayo, se basan en la utilización de hormonas exógenas como progestágenos ( $P_4$ ) y/o prostaglandinas (PG). El uso de progestágenos en cobayos se basa en la administración oral diaria de una dosis durante un tiempo determinado, logrando tener una tasa de sincronización del celo de hasta un

87,5% (Grégoire et al., 2012). Mientras que, entre los principales tratamientos para promover el aumento del número fisiológico de ovulaciones en esta especie, se desataca la administración de hormonas gonadotrópicas tales como: la hormona folículo estimulante (FSH) (Armstrong & Opavsky, 1988; Hamilton & Armstrong, 1991), la gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Fowler & Edwards, 1957) y la gonadotropina coriónica equina (eCG) (Li et al., 2015), así como el uso de inmunoneutralizantes como las vacunas contra inhibina (Wang et al., 2012). Sin embargo, hasta ahora existe mucha discrepancia en cuanto a resultados en esta especie.

La utilización de  $P_4$  como método de sincronización, reside en el hecho de que su uso inhibe la ovulación (Sprott et al., 2020). En cobayos, el uso de la  $P_4$  ha sido reportado por Dempsey, (1937), quien determinó que una dosis de progesterona inhibía la ovulación pero no disminuía el tamaño de los folículos grandes. Por otro lado, Deanesly, (1968), al utilizar implantes que liberaban 0,1 mg diarios de  $P_4$ , coincidió en que se lograba inhibir la ovulación de las cobayas, con un crecimiento folicular normal. Finalmente, en otro estudio, Labhsetwar & Diamond, (1970), observaron el efecto de la  $P_4$  durante la preñez y 3 días postparto a una dosis de 10 mg/día durante 16 días a partir del segundo día del ciclo, determinando también mediante histología el tamaño de los folículos preovulatorios y concluyen que, la administración de  $P_4$  si bien bloquea el desarrollo de los folículos preovulatorios y la ovulación, no disminuye el recuento folicular y en el caso del tamaño establecieron que, varios folículos logran alcanzar un tamaño preovulatorio de 700 micrómetros en el día 15 del ciclo y 66 de preñez.

La administración de FSH exógena incrementa la concentración endógena de esta, lo que favorece el crecimiento folicular, diferenciación, maduración y ovulación, siempre y cuando, al término del tratamiento con FSH, se administre una dosis de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de gonadotropina coriónica humana (hCG) que provoque la ovulación (Muñoz et al., 1995). Sin embargo, la característica de esta hormona es su vida media corta, por lo que debe ser inyectada en intervalos regulares de 12 horas o a través de una bomba de infusión continua (Charreau et al., 1996).

La eCG juega un papel similar al de la FSH, pero su característica principal es que tiene grandes cantidades de carbohidratos y ácido siálico, lo que le permite tener una vida media larga. Trabajos previos desarrollados por Kosaka & Takahashi, (1989), demostraron que la eCG a una dosis de 10 UI, induce el aumento del número de folículos en cobayos a los que se les aplicó una presincronización con un dispositivo liberador de  $P_4$  durante 21 días; asimismo, en este trabajo se reportó que la mejor respuesta superovulatoria y tasa ovulatoria se la obtiene en aquellos

animales a los que les inyecta eCG 8 horas antes del retiro del progestágeno, frente a los que se les inyecta eCG 6 días tras el retiro de P<sub>4</sub>, lo que sugiere que el uso de eCG en cobayos puede inducir una SOV, pero dependerá de condiciones como: tiempo de aplicación, dosis y tratamiento previo con P<sub>4</sub>. Sin embargo, a pesar de varios estudios no se ha logrado determinar con exactitud el lapso de tiempo y dosis adecuadas para la aplicación de eCG que induzca la SOV, tomando en cuenta un protocolo de sincronización con P<sub>4</sub>.

En ratones se lleva a cabo con éxito la SOV mediante inyecciones consecutivas de eCG y hCG; sin embargo, factores como la fase del ciclo estral, cepa y edad influyen en el rendimiento de los ovocitos maduros (Hasegawa et al., 2016). Como regla general la dosis de eCG que se administra en esta especie es de 5 UI sin embargo, la dosis puede variar de 2,5 a 10 UI (Nagy et al., 2010). Mientras que, en cobayas, Rawson et al., (1979) aplicaron sin previa sincronización con P<sub>4</sub> 10 UI de eCG los días 9 y 10 del ciclo tomando en cuenta la AMV como primer día del ciclo, y concluyeron que el tratamiento aplicado no fue eficaz para inducir la SOV en cobayas. Bajo influencia del estudio antes mencionado, Li et al., (2015) utilizaron dosis de 20 UI y 50 UI el día doce del ciclo, sin realizar un periodo de sincronización con P<sub>4</sub> obteniendo buenos resultados con el grupo de 20 UI ya que este presentó un mayor desarrollo folicular, mientras que el grupo de 50 UI, presentaba mayores proporciones de folículos atrésicos en comparación con el grupo de 20 UI. Otros estudios realizados por (Ishibashi, 1983; Li et al., 2015) no tuvieron éxito y reportan una menor tasa ovulatoria y un aumento de la luteinización de los folículos con desarrollo asincrónico de los embriones obtenidos, esto quizás se deba a otros factores tales como: la dosis, edad, peso, estado nutricional, de salud y condiciones propias de la dinámica folicular (Behringer et al., 2003; Daniel, 1971; Gates, 1971). Por lo antes expuesto, hemos considerado a los ratones como referencia para establecer una dosis de eCG que pueda estimular una respuesta superovulatoria en cobayas; ya que en ratones con un peso de 5,5 a 23,5 gramos la dosis óptima va de 2,5 a 5 UI (Behringer et al., 2018)

En cuanto al uso de hCG en los protocolos de SOV, esta hormona permite la maduración folicular y ovulación (Cole, 2010) ya que imita el pico preovulatorio (Segal et al., 2020). En base a esto, Rawson et al., (1979), comprobaron que la aplicación de 10 UI 12 días después de observarse los primeros signos de AMV, estimula de manera efectiva la ovulación en un tiempo estimado de 24 horas, permitiendo un tasa de recuperación de óvulos del 62,5 %. Debe haber un intervalo de tiempo de 48 horas entre la inyección de eCG y hCG ya que generalmente, la ovulación tiene lugar entre 10 y 13 horas después de la inyección de hCG (Portelli, 2013).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Evaluar un protocolo de superovulación mediante la aplicación de diferentes dosis de gonadotropina coriónica equina (eCG) en diferentes momentos, que permita valorar la respuesta ovárica en cobayas con previa sincronización de su ciclo estral.

### 2.2. Objetivos específicos

- Valorar el efecto de diferentes dosis de eCG distribuida en varios días sobre la respuesta ovárica de cobayas previamente con sincronización del ciclo estral, 100 y 150 UI de eCG aplicada 24 horas antes y en el momento de la supresión de P<sub>4</sub>.
- Valorar el efecto superovulatorio de la eCG sobre el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas después de un lavado uterino

### 3. Revisión de Literatura

#### 3.1. Aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra es un conjunto de órganos que comprende: ovarios, oviductos, útero, cuello uterino, vagina y genitales externos (Yllera et al., 2020).

##### 3.1.1. Ovarios y oviductos

Los ovarios son dos órganos ovoides, ubicados detrás de los riñones recubiertos por una membrana serosa. Miden aproximadamente 0,3-0,6 cm de largo y 0,2-0,4 cm de ancho. Su función es secretar hormonas como los estrógenos y progesterona, además intervienen en el desarrollo adecuado de los folículos, los cuales experimentan diversos cambios para el desarrollo de los ovocitos (Jiménez, 2005).

Por otro lado, los oviductos son órganos pares que comunican los ovarios con el útero, miden aproximadamente 57 mm de largo por 1,5 mm de ancho. Su función es el transporte de los gametos, capacitación espermática, segmentación embrionaria, así como ser el vehículo del embrión hacia el útero para la implantación (Solís & Chávez, 2015).

##### 3.1.2. Útero

Este órgano está estructurado por el cuerpo y cérvix uterino. El cuerpo es corto y de manera aplanada dorso-ventralmente, pero aumenta de tamaño y se dilata cuando está grávido (Almeida, 2016). Se encarga de la secreción de prostaglandina F<sub>2α</sub>, responsable de destruir al cuerpo lúteo, pero cuando la hembra se encuentra en el periodo de gestación y el cigoto se transforma en feto, la placenta produce progesterona (Villamarín, 2016).

##### 3.1.3. Cuernos uterinos y cuerpo uterino

Estas dos estructuras forman una “V” con la base posterior y extremos anterior, presentan una forma cónica. En su parte media miden aproximadamente 37 mm de largo por 6 mm de ancho, siendo más finos en la unión con sus respectivos oviductos. Su interior se encuentra recubierto por el endometrio, responsable de la nutrición inicial del cigoto hasta que se transforma en feto (Barahona & Quishpe, 2012; Herrera, 2007).

El cuello uterino se comunica con la vagina, presenta el orificio comunicante en el centro, tiene una consistencia dura y su estructura está formada por músculo grueso (Oñate, 2008).



#### **3.1.4. Vagina y vulva**

La vagina es cilíndrica y fibroelástica, se encuentra internamente recubierta por 3 pliegues: un pliegue transversal y 2 pliegues longitudinales. Su rol principal, es facilitar la cópula y funciona como canal de parto en la expulsión del feto (Vaca, 2017).

La vulva se encuentra ubicada en la parte externa de la vagina, presenta forma de “Y” y se encuentra recubierta por los labios mayores y menores, en su parte interna se encuentra el meato urinario y en su parte externa se halla el clítoris (Villamarín, 2016).

#### **3.1.5. Glándulas mamarias**

Las glándulas mamarias son dos pequeñas glándulas posicionadas en la zona inguinal de la cobaya, presentan pezones de forma cónica en el extremo anterior (Jiménez, 2005).

### **3.2. Ciclo estral de la cobaya**

La cobaya es una especie poliéstrica no estacional (Aguiló, 2018), de ovulación espontánea que sucede aproximadamente 10 horas después del inicio del estro. Esta especie cuenta con una escasa disponibilidad de ovocitos debido a que ovulan en un reducido número (Grégoire et al., 2012). La duración del ciclo estral es de 15 a 17 días (con un rango de 13 a 21 días) (Quesenberry et al., 2012) dividido en 4 fases (Tabla 2).

Tabla 1. Características del ciclo estral

Fase	Duración (horas)	Observaciones
Proestro	13,9	La vagina cambia de coloración y puede darse secreción sanguinolenta
Estro	24-48	Acepta al macho por un periodo de 6-11h. Celo posparto entre las primeras 2-3h. En esta etapa ocurre la ovulación.
Metaestro	20,4	Rechaza al macho a cada intento de monta
Diestro	14,7 (días)	Descanso reproductivo

Fuente: Adaptado de (Pignon & Mayer, 2021; Rico & Rivas, 2003)

### 3.3. Membrana vaginal

Es una estructura epitelial delgada y delicada ubicada en la periferia de los genitales de la hembra, que une los labios y cierra el orificio vaginal (Aranibar & Echevarría, 2014).

De acuerdo con la etapa reproductiva de la cobaya, puede o no tener dicha estructura; en el periodo infantil, juvenil y prepuberal el canal vaginal se encuentra cerrado por la membrana vaginal, y cuando esta se rompe por primera vez es indicador del primer estro, desde ese momento solo se abre subsecuentemente en el periodo del estro y en el parto (Mora, 2015).

### 3.4. Dinámica folicular de la cobaya

La cobaya tiene un crecimiento folicular bifásico durante su ciclo estral (Bland, 1980). Esto ocurre, primeramente, por un reclutamiento diario de folículos en crecimiento del grupo de folículos primordiales inactivos y segundo porque ocurre en dos momentos determinados: los días 1 a 3 y los días 6 a 9. Tomando en cuenta que aproximadamente la duración del ciclo estral son 16 días, la primera ola de crecimiento folicular inicia desde día 2 hasta el día 10, y termina en atresia de los folículos de la primera ola, mientras que la segunda ola que inicia a partir del día 10, termina con la ovulación al final del ciclo estral (Hamilton & Tam, 1990).

Por otro lado, es importante que al hablar de la dinámica folicular se conozca el mecanismo de secreción hormonal que se encuentra regulado por el sistema nervioso central, mediante la liberación de GnRH desde el hipotálamo (Franco & Uribe Velásquez, 2012). La liberación de esta hormona (GnRH) es pulsátil y su duración e intensidad depende tanto de la secreción de estradiol, como de la actividad de los neurotransmisores como: el glutamato, noradrenalina, ácido gamma-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés), dopamina y péptidos como el neuropéptido. Cuando el hipotálamo secreta GnRH hacia las células de la adenohipófisis, se activa la secreción pulsátil de FSH y LH, que estimulan la secreción de hormonas esteroideas (estradiol y progesterona) en los ovarios. El incremento del estradiol circulante en el plasma es responsable de la apertura vaginal en las cobayas indicativo del inicio del inicio del celo (Morales-Ledesma et al., 2015).

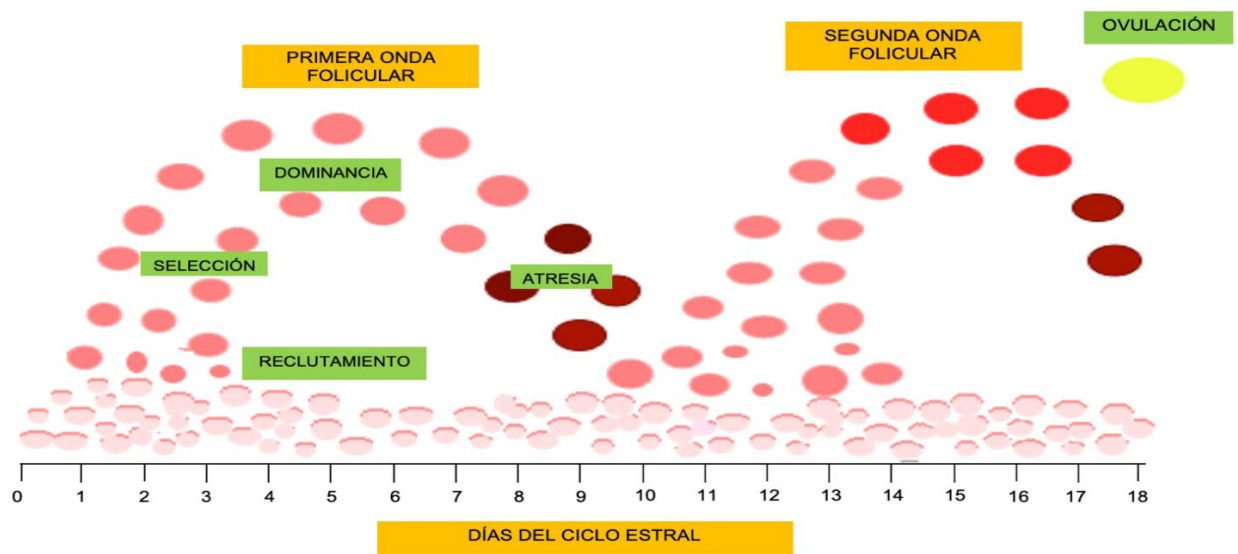


Figura 1. Dinámica folicular de la cobaya. Fuente: autoras

### 3.5. Sincronización del ciclo estral en las cobayas

Lograr recolectar suficientes ovocitos es un paso fundamental para el éxito de las biotecnologías de reproducción asistida en cobayas, por lo tanto, es necesario conocer y controlar su ciclo estral (Wang et al., 2019). Esto se logra mediante el uso de hormonas exógenas, las más comunes utilizadas para la sincronización, son los progestágenos. Otras hormonas consideradas como superovulatorias, son las hormonas gonadotrópicas tales como FSH, eCG y hMG que estimulan un mayor desarrollo folicular (Grégoire et al., 2012; Li et al., 2015).

La progesterona ( $P_4$ ) es la hormona de elección para la sincronización del celo en cobayas, puesto que es un animal con ciclos estrales completos con una fase lútea y folicular (Hasegawa et al., 2016). Además, dada su metodología de aplicación actual, respeta el bienestar animal pues, no es necesario anestesiarse a los animales para su administración, ya que se da por vía oral a razón de 0,1 ml (0,22 mg/kg) una vez al día durante 15 días (Grégoire et al., 2012). De tal forma, se logra bloquear las nuevas ondas de crecimiento folicular consecutivas a la regresión de los cuerpos lúteos, debido a que se mantienen los altos niveles plasmáticos de  $P_4$ . Una vez que se retira el tratamiento se consigue el crecimiento folicular, responsable de la manifestación de la conducta estral y al término de su crecimiento ovularán.

Tras la aplicación de un protocolo a base de  $P_4$  es importante evaluar la tasa de sincronización. En este sentido, un parámetro a considerar es la ruptura de la membrana vaginal, estructura que cubre el orificio vaginal durante todo el ciclo estral y se degenera espontáneamente en el estro (Wilson et al., 2021). La ovulación ocurre 1 a 1,5 días posteriores a la apertura de la membrana vaginal en la etapa de estro (Sadeu et al., 2007).

### **3.6. Superovulación y hormonas gonadotrópicas**

La superovulación es una técnica reproductiva en la cual se somete al animal a la estimulación hormonal con el propósito de formar y desarrollar varios folículos, y que estos ovulen en ambos ovarios en un momento establecido, para así maximizar el número de embriones fecundados para transferirlos y tener mayor probabilidad de producir preñeces (Mapletoft & Bó, 2014). Para inducir a la superovulación en los animales domésticos, usualmente se emplean hormonas foliculoestimulantes (Barahona & Quishpe, 2012). Sin embargo, las gonadotropinas no siempre son efectivas para inducir la superovulación (SOV) en cobayos, dado que su mecanismo de ovulación sigue siendo poco conocido (Suzuki et al., 2003).

#### **3.6.1. Gonadotropina coriónica equina**

En el caso de la eCG, es una glicoproteína secretada por las copas endometriales de la placenta equina (Palomino et al., 2017). Esta hormona cumple funciones biológicas similares a la FSH en mamíferos como bovinos (Alfurajji et al., 1993), ovejas (Cognie, 1999), cerdas (Manjarin et al., 2009), ratas (Popova et al., 2002), pero a diferencia de la FSH, la eCG tiene una vida media larga de aproximadamente 72 horas (Murphy & Martinuk, 1991; Zanetti et al., 2014). Esto es debido al elevado contenido de carbohidratos, mismos que están compuestos en un 10% por ácido siálico (Cole et al., 1967; Martinuk et al., 1991). El uso de eCG puede resultar en una excesiva o nula

respuesta ovárica que puede darse por factores relacionados al animal o a la dosis de eCG (Bó & Mapletoft, 2014; Gonzalez et al., 1994).

La administración vía subcutánea de eCG en cobayas, en dosis ya sea de 20 o de 50 UI, puede inducir la luteinización folicular sin que los folículos lleguen a ovular, ya que esta hormona funciona de manera similar a la LH, pero no a la FSH (Li et al., 2015). Esto se traduce en un mayor número de folículos en desarrollo, pero no en su maduración completa hasta la ovulación y tampoco en un aumento del número de cuerpos lúteos (Shi et al., 2000). Sin embargo, autores como Kosaka & Takahashi, (1989) mencionan que el uso de la eCG puede inducir a SOV, siempre y cuando el ciclo estral de las cobayas esté sincronizado con P<sub>4</sub> por un tiempo de 21 días y al término de este se le administre una hormona (hCG o GnRH) que provoque la ovulación de los folículos.

El uso de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en la fase preovulatoria, induce de manera efectiva la ovulación sincronizada en cobayas, mientras que, cuando se administra en la fase lútea media, no existe apertura vaginal ni ovulación (Suzuki et al., 2003). Por otra parte, Rawson et al., (1979) comprobaron que la administración de hCG (10 UI) 12 días después de los primeros signos de apertura de la membrana vaginal, estimula la ovulación en un plazo de 24 horas en todas las cobayas que fueron estudiadas.

### 3.7. Ovocitos y embriones

Tanto los ovocitos de cobaya que han sido madurados *in vitro*, así como los ovocitos ovulados naturalmente, pueden ser fecundados *in vitro* (Yanagimachi, 1974). Asimismo, es posible cultivar los embriones de cobaya hasta cierto punto en medios denominados semidefinidos; de igual forma, pueden observarse brotes de trofoblastos *in vitro* en medios sin suero (Suzuki et al., 1993).

La calidad de los ovocitos es un determinante importante en el éxito de los procedimientos de transferencia de embriones dependiendo, en gran medida, de la clasificación y selección de estos, dado que muchos presentan daños o anomalías que impiden su utilización. La homogeneidad y apariencia del citoplasma, la integridad de la zona pelúcida y el número de capas de las células del cúmulus, son los criterios principales que determinan si un ovocito es o no competente (Krisher, 2004). Sin embargo, las categorías de clasificación varían con el autor (Bouhier, 2016).

### 3.8. Sistemas de clasificación de ovocitos y embriones

Lonergan et al., (1991) establece una clasificación dividida en 4 tipos: el primero es el tipo A, que define a un ovocito que posee células del cúmulus con capas múltiples (mayor a 4) y compactas, citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B, con capas del cúmulo, pero en menor número (1 a 3) y citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C, presenta el complejo del cúmulus denudado, así como un citoplasma irregular con áreas oscuras; por último, el tipo D, que tiene las células del cúmulus expandidas y el citoplasma más irregular con áreas oscuras. En base a la clasificación anterior (Samaniego et al., 2017) agruparon a los tipos A y B definiéndolos como ovocitos aptos, mientras que a los tipos C y D los denominaron como no aptos para producción *in vitro*.

A continuación, tenemos las características que Palma & Brem (2001) plantean tomar en cuenta para evaluar la calidad y morfología de las estructuras embrionarias:

**Tabla 2. Clasificación según la calidad y morfología de las estructuras embrionarias.**

Grados de calidad	Clasificación	Características
<b>G1</b>	<b>Excelente</b>	Sin defectos visibles. Blastómeros claramente visibles, de color y de estructura uniforme, simétricos de forma esferoide; zona pelúcida intacta.
<b>G2</b>	<b>Bueno</b>	Pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y una pequeña cantidad de detritus celulares. Forma ligeramente irregular.
<b>G3</b>	<b>Regular</b>	Embrión con detritus, forma irregular, color oscuro o muy claro y ligero estrechamiento en la zona pelúcida.
<b>G4</b>	<b>Malo</b>	Embrión con muchos defectos (ruptura de la zona pelúcida, asimetría marcada, granulación o vacuolización de los blastómeros). No transferible.

Fuente: adaptado de Palma & Brem, (2001).

Por último, Shi et al., (2000) evaluaron las estructuras procedentes de cobayas en base a la normalidad o anormalidad de estos, y de esta forma determinar su calidad basándose en tres aspectos: el primero se refiere a la mórula o blastocisto que se consideró un embrión normal en el momento de recolección en base a su estadio de desarrollo. El segundo punto es el grado de degeneración o fragmentación del embrión que lo clasifica como anormal. Y el último aspecto se refiere al crecimiento vigoroso del trofoblasto después de la eclosión del blastocisto, durante el cultivo *in vitro*, lo que lo define como un embrión viable.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Materiales

<b>Físicos</b>	<b>Biológicos</b>
Guantes de nitrilo	Cobayas
Jeringas de insulina (1ml)	Útero
Gasas	Ovarios
Equipo de disección	Embriones
Catéteres de 24 G	
Agujas hipodérmica 30 G	
Máquina para rasurar	
<b>Químicos</b>	<b>Laboratorio</b>
Progesterona (Altrenogest), (Regumate®, MSD, España)	Estereomicroscopio
eCG (Novormon, eCG, Novormon® 5000, Laboratorios Zoetis, Argentina)	Cajas de Petri de inspección cuadrículada
hCG (Chorulon, MSD Salud Animal, México)	Micropipetas
Pentobarbital sódico	Puntas para pipeta
Solución jabonosa de yodo	Puntas para micropipeta
Solución salina taponada de fosfato (PBS)	Pipetas automáticas
Suero Fetal Bovino	Baño María
Alcohol 70%	

### 4.2. Metodología

#### 4.2.1. Área de estudio

La presente investigación se realizó de manera simultánea en la granja de “Irquis” y el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Cuenca, ubicada en el km 23 de la vía Cuenca-Girón, a la altura de la Parroquia Victoria del Portete latitud  $-3^{\circ}4'48''$  y longitud  $-79^{\circ}4'31''$ , y que se encuentra a una altitud de 2.663 m s.n.m (figura 2). La precipitación promedio anual es de 789 mm; y posee temperaturas que oscilan entre 10 y 15 °C.





Figura 2. Mapa satelital, ubicación geográfica Granja Iruquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de Google Earth (2020).

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

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio; para este diseño se utilizaron un total de 26 hembras multíparas de  $100 \pm 5$  días de edad y un peso entre 800 a 1150 gramos. Las cobayas provinieron de un núcleo de cobayos de diferentes cruces de líneas Perú, Inti y Andina, que fueron distribuidas en cinco tratamientos.

Las hembras estuvieron en un periodo de adaptación de diez días, que incluyó el manejo similar en la alimentación que consistió en suministrar un concentrado formulado siguiendo las especificaciones nutricionales para cumplir con el 100% de los requerimientos de esta especie según (LabDiet®, 2013; NRC, 1995). Durante este periodo las hembras fueron alojadas en una jaula de 2,5 x 2 m (Anexo A1). Después de este periodo de adaptación, las hembras fueron distribuidas de manera aleatoria en una jaula que estaba dividida en 5 secciones, una para cada grupo experimental, cada sección permitió albergar a 5 animales y grupo control 6 animales (Anexo A2).

Todas las hembras fueron sometidas a un protocolo de sincronización que consistió en la administración vía oral de altrenogest a una dosis de 0,22mg/kg, (Regumate®, MSD, España), durante 15 días (Anexo A3). Las hembras sincronizadas fueron aleatoriamente asignadas a 5 tratamientos o grupos que se describen a continuación.

- Grupo 1 (n=5) recibió una dosis de 100UI/animal de eCG (eCG, Novormon® 5000, Laboratorios Zoetis, Argentina) en el día 14, un día antes del retiro del progestágeno.
- Grupo 2 (n=5) recibió 150UI/animal de eCG en el día 14, un día antes del retiro del progestágeno.
- Grupo 3 (n=5) recibió 100UI/animal de eCG en el día del retiro del progestágeno (día 15).
- Grupo 4 (n=5) recibió 150UI/animal de eCG en el día del retiro del progestágeno (día 15).
- Grupo 5 (n=6) las hembras no recibieron ninguna dosis de eCG.

Asimismo, 48 horas después de la aplicación de eCG, todas las hembras recibieron una dosis intraperitoneal de 50UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Chorulon, MSD Salud Animal, México) para inducir la ovulación de todos los folículos.

El día del retiro del progestágeno, se introdujo al macho en una relación de 1:1 para favorecer la monta; además, desde el retiro de la P<sub>4</sub> a todas las hembras se les revisó diariamente la apertura de la membrana vaginal, que fue la referencia para determinar el día de inicio del celo. Luego de 125,3 ± 13,0 horas (5,2±0,5 días), después del apareamiento (apertura de la membrana vaginal), se procedió a recolectar las estructuras a través del lavado de oviductos y útero para luego ser clasificadas. Además, se valoró los diámetros de cada ovario para determinar el volumen ovárico (VO) y también se valoró el número y diámetro de folículos normales, folículos luteinizados, y cuerpos lúteos.

Para la clasificación de los folículos luteinizados, folículos normales, y cuerpos lúteos se utilizó los criterios de clasificación establecidos por Li et al., (2015), (ver figura 3) que consiste en que tras la aplicación de eCG se produce una diferenciación en las células foliculares, la teca y las células de la granulosa, especialmente en los cuerpos lúteos.

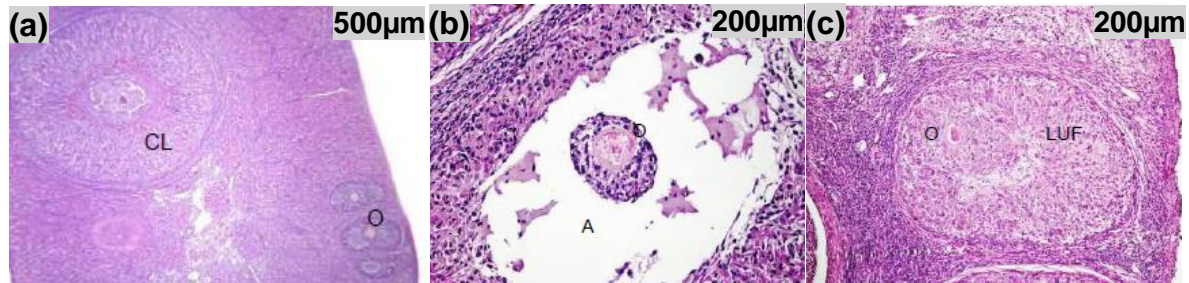


Figura 3. Representación histológica de estructuras recuperadas en ovarios de cobayas. Cuerpo lúteo (a), folículo normal (b) y folículo luteinizado (LUF) (c).

- Cuerpo lúteo (CL): en el parénquima ovárico se observa una o varias estructuras bien delimitadas y no encapsuladas que están compuestas por células lúteas las cuales son redondeadas, tienen moderada cantidad de citoplasma eosinofílico levemente granular y un núcleo central redondo y heterocromático. En ocasiones se exhiben discretas áreas de hemorrágica entremezcladas con las células lúteas.
- Folículo normal (FN): conformados por un ovocito rodeado por varias capas de células foliculares, las cuales son cuboidales, tienen moderada cantidad de citoplasma eosinofílico y un núcleo eucromático. Alrededor de las células foliculares se exhiben algunas células estromales fusiformes e íntimamente relacionadas con las mismas.
- Folículo luteinizado (FL): gran antro folicular, las células de la granulosa en la zona pelúcida o en la membrana folicular no mostraban signos evidentes de diferenciación, pero se encuentran más densas y en una orientación irregular. El ovocito y las células de la granulosa diferenciadas se encuentran visibles, pero la densidad celular es menor en comparación con la del CL.

Se tomó este estudio como referencia y lo adaptamos a las condiciones del nuestro (Figura 4, Figura 5, Figura 6). Además, de la visualización directa, con los ovarios conservados en una solución de formaldehído al 10%, se procedieron a realizar cortes finos y se colocaron en casetes para histopatología, inmediatamente fueron llevados a un procesador de tejidos, para su deshidratación con alcoholes a diferentes concentraciones (70°, 90°, 96° y 100°), y luego en xilol. Posteriormente, los ovarios fueron embebidos en parafina, y con ayuda del microtomo (Leica DM2000) se obtuvieron cortes de 5 micrómetros, se colocaron en una placa y fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para ser observados al microscopio (Leica DM2000).

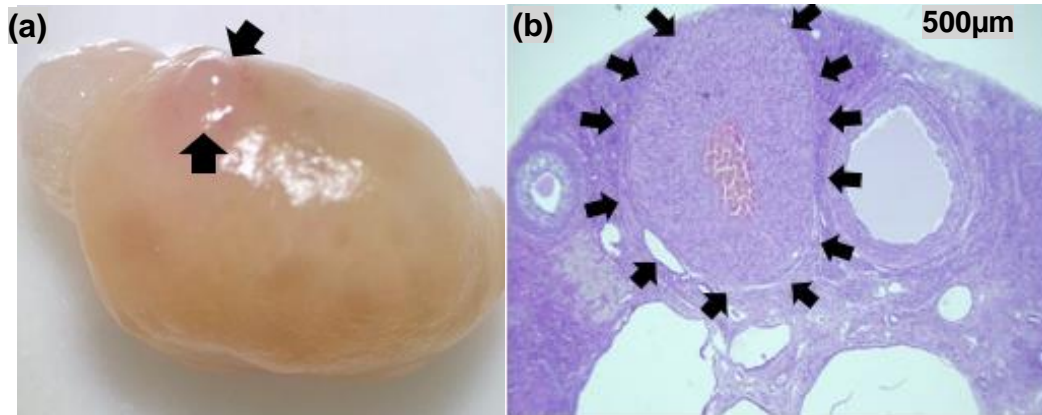


Figura 4. Cuerpo lúteo (CL) de cobayas sacrificadas después de la inyección de eCG. Flechas indican el área del cuerpo lúteo. Imagen representa la vascularización directa del CL en ovario fresco (a). Corte histológico del CL teñido con H&E (b).

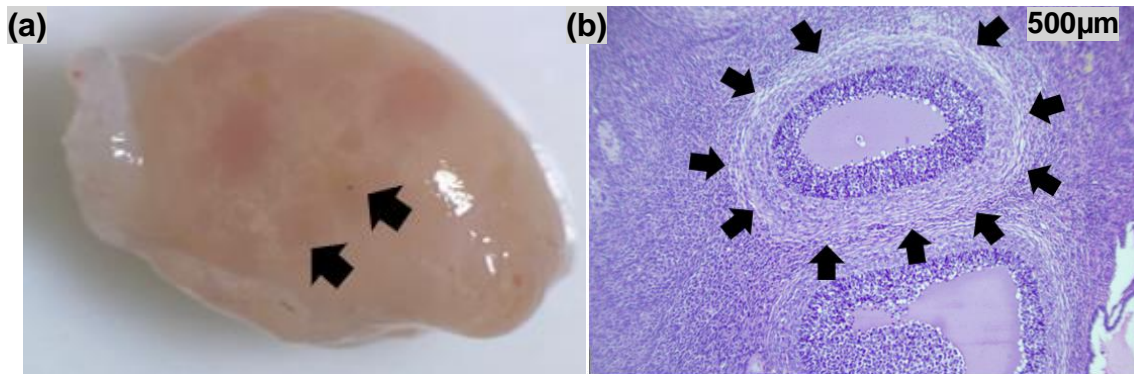


Figura 5. Folículo normal de cobayas sacrificadas después de la inyección de eCG. Flechas indica el área del del folículo normal (FN). Imagen representa FN en ovario fresco (a). Corte histológico del FN teñido con H&E (b).

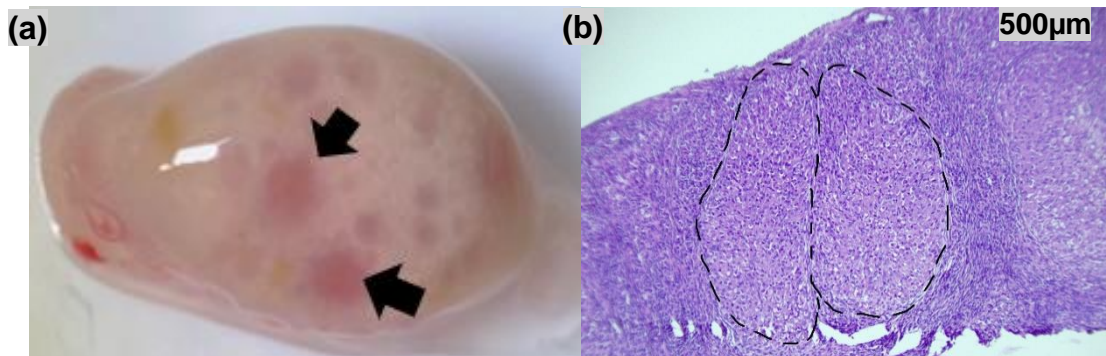
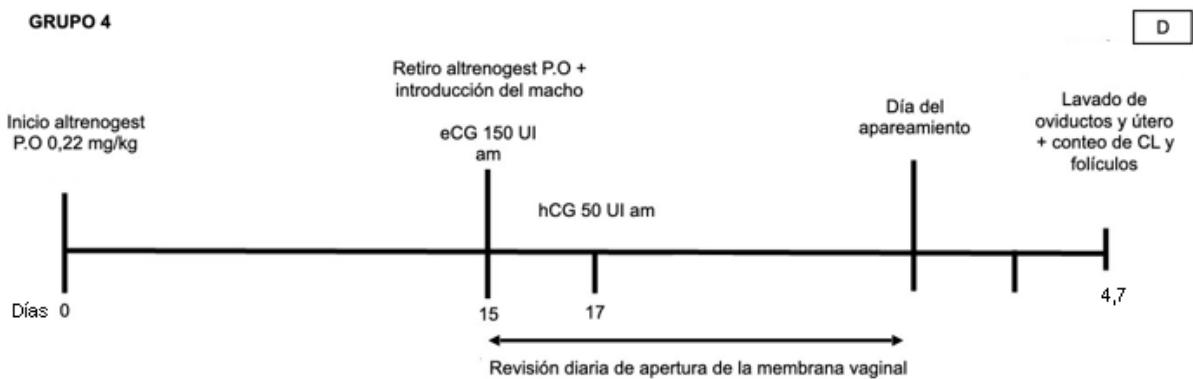
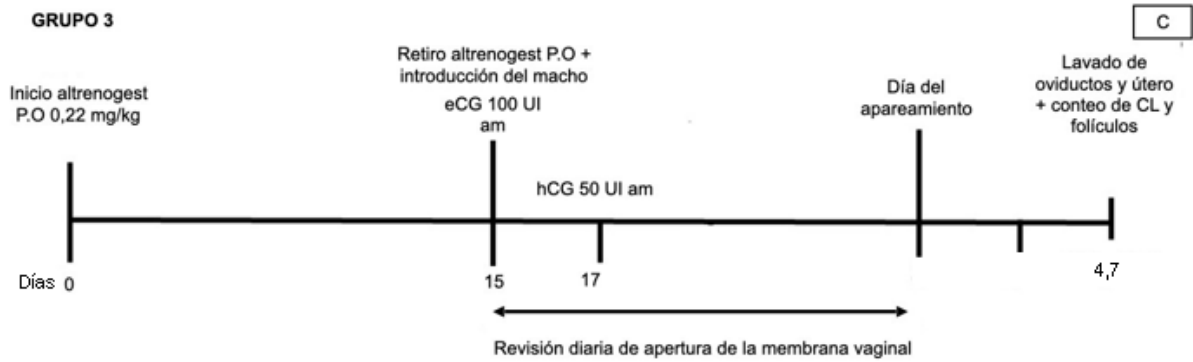
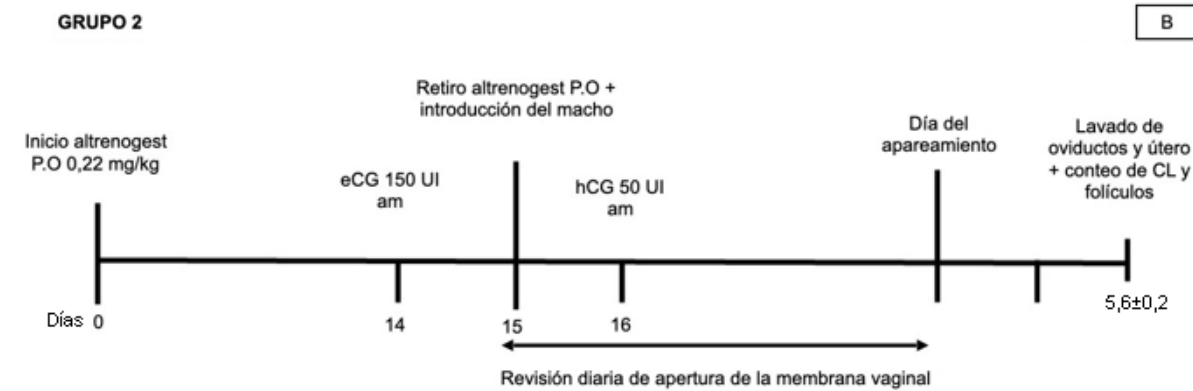
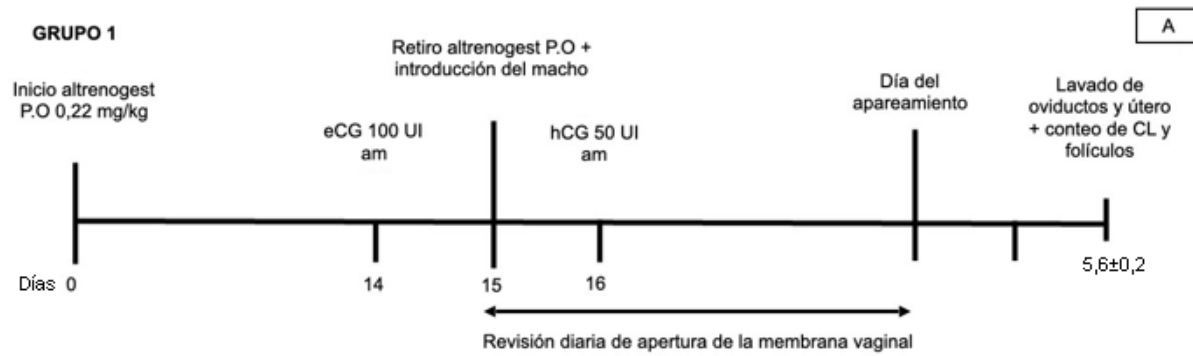


Figura 6. Folículo luteinizado de cobayas sacrificadas después de la inyección de eCG. Líneas discontinuas indican el área del folículo luteinizado (FL). Imagen representa el FL en ovario fresco (a). Corte histológico del FL teñido con H&E (b).



## GRUPO 5

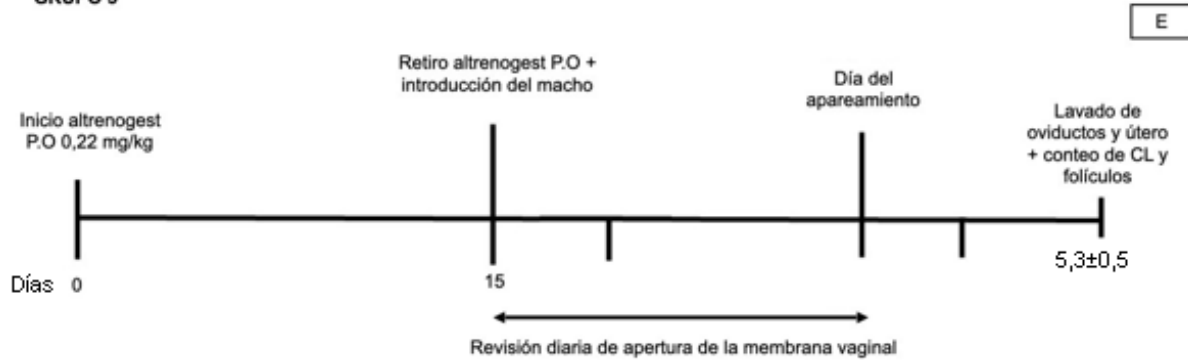


Figura 7. Unidades experimentales: Grupo 1: aplicación de 100 UI antes del retiro de P<sub>4</sub> panel A; Grupo 2: aplicación de 150 UI antes del retiro de P<sub>4</sub> panel B; Grupo 3: aplicación de 100 UI en el día del retiro de P<sub>4</sub> panel C; Grupo 4: aplicación de 150 UI en el día del retiro de P<sub>4</sub> panel D; Grupo 5: sin aplicación de eCG panel E.

#### 4.2.3. Revisión de apertura vaginal

El monitoreo de la apertura de la membrana vaginal se realizó 24 horas de la aplicación de eCG dos veces al día: la primera se realizó en horas de la mañana (7am) y la segunda, en horas de la tarde (7pm), para este procedimiento se siguió la metodología propuesta por Wilson et al., (2021), que brevemente consiste en sujetar a la hembra de forma segura usando el pulgar y el dedo índice para manipular suavemente la abertura vaginal; luego se registró si la membrana está “cerrada” o “abierta” (Anexo A7 y A8; Figura 8, panel C y D); al visualizar la apertura de la membrana vaginal, se registró la fecha y la hora en la que se observó por primera vez perforada.

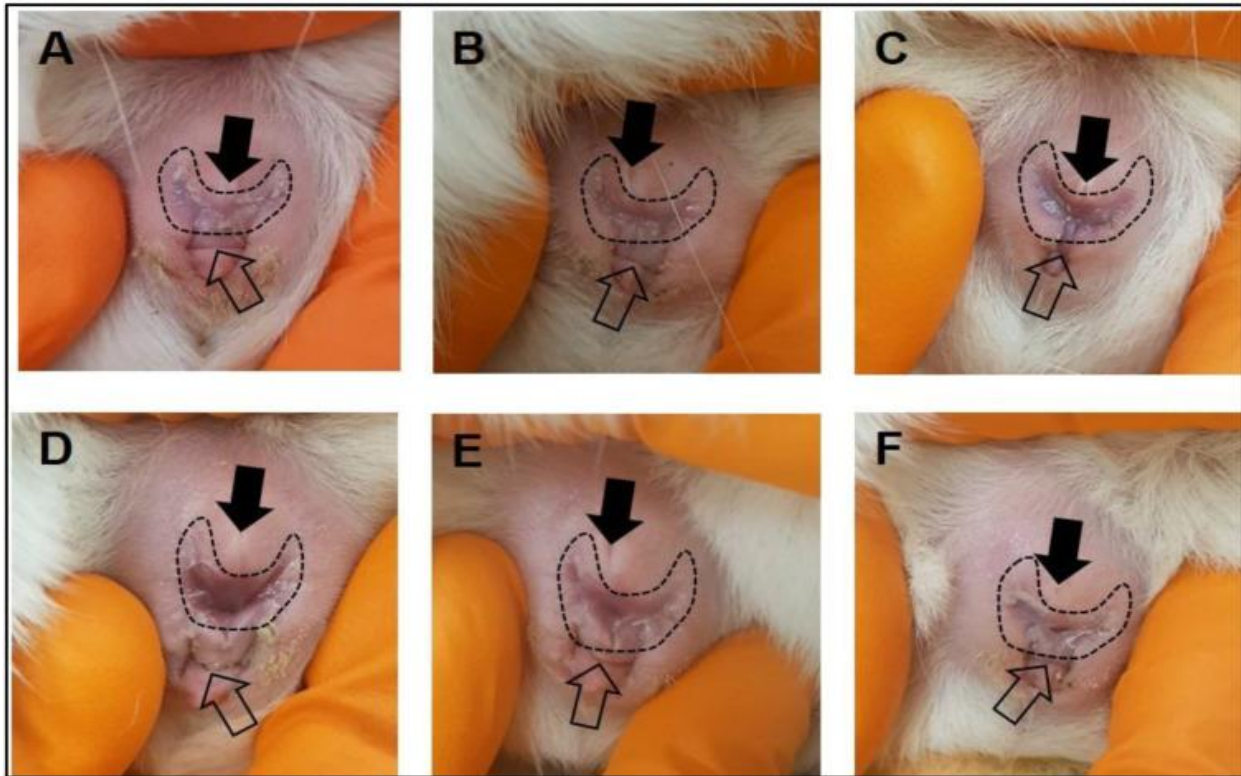


Figura 8. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal. Durante el período de latencia del ciclo estral, la membrana se ve cerrada (**A**, **B**). Cuatro a cinco días antes de la ovulación, cambia la coloración de la membrana vaginal, signo de una posible perforación de la misma (**C**). Al momento de la ovulación, se perfora la membrana vaginal y aumentan las secreciones vaginales (**D**). Tras la ovulación, la membrana vaginal comienza a cerrarse (**E**, **F**). Tomado de Wilson et al., (2021).

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

Todas las hembras fueron sacrificadas  $5,1 \pm 0,5$  días después de la comprobación de la apertura de la membrana vaginal, siguiendo la metodología establecida en el manual (S.E.A Animalario OMG, 2005), que consiste en la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis triplicada 100-150 mg/kg (Penta-Hypnol®, Agrovvetmarket, Perú).

Para el lavado del tracto reproductor de la hembra se siguió la metodología descrita por Shi et al., (2000), que, brevemente, consiste en rasurar la zona del abdomen y desinfectar con una solución jabonosa de yodo, posterior a esto, las hembras fueron colocadas en decúbito dorsal y se realizó una incisión de 4 cm a lo largo de la línea alba, se localizó todo el tracto reproductivo de la hembra incluido los ovarios y se lo extrajo. El útero y los ovarios fueron colocados, para el

mantenimiento, en una solución salina buffer de fosfato (PBS) suplementado con suero fetal bovino y mantenido a 37°C, hasta llevarlo al laboratorio para su posterior lavado.

Para el lavado del útero y oviductos se utilizó la misma solución salina buferada de fosfato. Las estructuras se recolectaron mediante un *flushing* de los oviductos y cuernos uterinos. En el caso del lavado de oviductos el procedimiento consistió en colocarlos en una placa de búsqueda bajo la luz del estereomicroscopio localizar la zona del infundíbulo, abrirlo e introducir una aguja hipodérmica 30 G (0,30 mm de diámetro), sostener la aguja con una pinza y adaptarla a una jeringa de 3 ml para lavar por tres ocasiones. El procedimiento para el lavado uterino se basó en sujetar el útero e introducir un catéter 24G pasando la bifurcación y dirigiéndose hacia un cuerno para lavarlo por tres ocasiones con una jeringa de 3 ml, y de la misma manera para el otro cuerno (Figura 9).



Figura 9. Lavado de oviductos (A) y útero (B).

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

La valoración y clasificación morfológica de las estructuras se realizó siguiendo la metodología descrita por Shi et al., (2000) y Suzuki et al., (2000), que consiste en evaluar las estructuras bajo la luz de un estereomicroscopio con un lente de aumento de 50 a 100x (Olympus SZ61) y clasificarlas en ovocitos sin fecundar y embriones.

Luego de la primera clasificación, se visualizó la viabilidad del embrión, que se evaluó a través de su etapa de desarrollo con relación del día de inicio de celo y considerada la etapa en la que



ocurre la ovulación. Asimismo, se evaluó la calidad de los embriones siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, *por sus siglas en inglés*) (Stringfellow et al., 1998) y adaptándolo a nuestro estudio, según las indicaciones de Suzuki et al., (2000) y Suzuki et al., (1993) en estructuras aptas y no aptas.

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

Ambos ovarios recuperados (izquierdo y derecho) fueron colocados sobre un papel milimétrico y medidos individualmente bajo el lente de un estereomicroscopio (50 a 100x Olympus SZ61). Y se procedió a tomar fotografías de estos para posteriormente medir con mayor precisión en un programa informático (ImageJ, Java; Anexo C1). Los valores individuales de ambos ovarios fueron sumados y se procedió a sacar una media de cada grupo.

En la superficie ovárica se procedió a cuantificar el número de cuerpos lúteos, folículos normales y folículos luteinizados y el diámetro de estos para, valorar la respuesta al tratamiento superovulatorio (Anexo B10, Anexo B11). En este mismo sentido, se valoró el diámetro de cada ovario recuperado y determinar el volumen ovárico en  $\text{mm}^3$ , para esto se utilizó la metodología descrita por (Penitente-Filho et al., 2015), que consiste en medir el ovario en tres planos (largo, ancho y profundidad) como se puede observar en la figura 10 y posteriormente aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen ovárico (mm}^3\text{)} = 0,5 \times D1 \times D2 \times D3$$

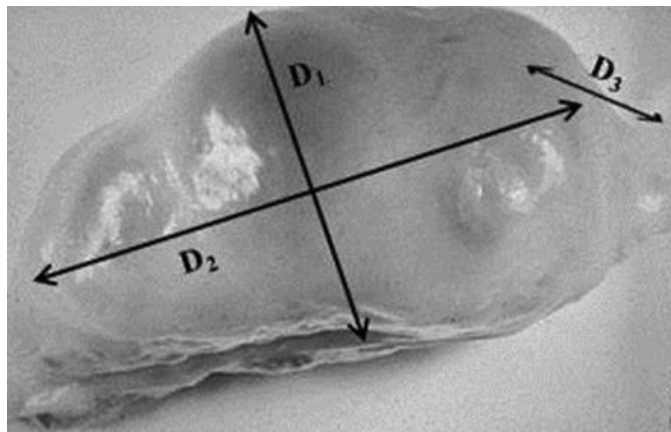


Figura 10. Esquemático de la medición del volumen ovárico. Adaptado de (Penitente-Filho et al., 2015).

Finalmente, para hallar el diámetro del cuerpo lúteo, folículos normales y folículos luteinizados fueron medidos en dos planos (largo x ancho, Figura 11), y se obtuvo mediante la media aritmética de ambas medidas expresado en milímetros:

$$\text{Diámetro (mm)} = (D_1 + D_2) / 2$$

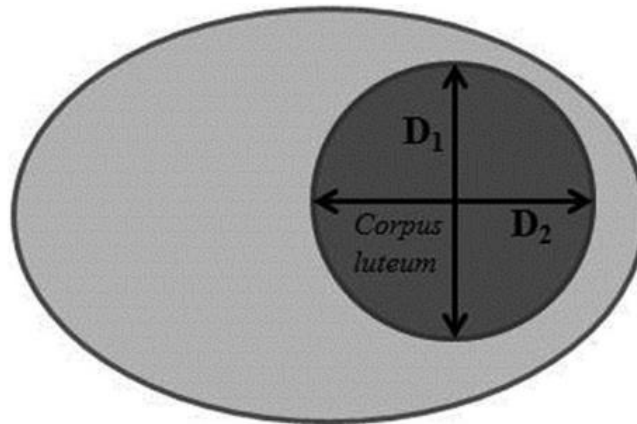


Figura 11. Esquemático de la medición del diámetro del cuerpo lúteo. Adaptado de (Penitente-Filho et al., 2015).

#### 4.2.7. Procesado y análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base en Excel, y posteriormente se analizaron mediante el paquete estadístico STATISTICA® 12.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK, EE. UU.). Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos numéricos de todas las variables (muestra menor a 50), dado que todos los datos de nuestro estudio tuvieron una distribución normal, no se realizó la transformación logarítmica de los datos ni la utilización de pruebas no paramétricas. Los efectos de la administración de la eCG sobre la respuesta ovárica (número de cuerpos lúteos, folículos y estructuras recolectadas) y características morfométricas de los ovarios (diámetro de cuerpos lúteos, folículos normales, folículos luteinizados y volumen ovárico) se estudiaron mediante un análisis ANOVA y para determinar las diferencias entre grupos, se utilizó la prueba Post-Hoc de diferencia mínima significativa (DMS). Los datos presentados en las figuras se expresaron como valores medios  $\pm$  error estándar de la media y los datos presentados en tablas se expresaron como valores medios  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de  $P < 0,05$  y los valores que estén entre 0,051 y 0,10 fueron considerados como tendencia estadística.

## 5. Resultados

Tabla 3. Clasificación de estructuras recuperadas

Tratamientos	n	T. Est	Tipo Est.	Cal. Est			Cla. Est.	
			M	B	R	A	N. A	
<b>Grupo 1</b>	5	0	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo 2</b>	5	1	1	-	1	-	-	1
<b>Grupo 3</b>	5	1	1	1	-	-	-	1
<b>Grupo 4</b>	5	0	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo 5</b>	6	5	5	3	2	3	3	2

**n**=número de cobayas. **T.Est**=total de estructuras. **Tipo Est**=tipo de estructuras. **M**=mórula. **Cal. Est.**=calidad de las estructuras. **B**=bueno. **R**=regular. **Clas. Est.**=clasificación de las estructuras. **A**=apto. **N. A**=no apto.

De manera inmediata, después del lavado del útero y oviductos de todas las cobayas, se procedió a realizar la valoración y clasificación morfológica de las estructuras colectadas (Tabla 4). Se colectaron un total de 7 estructuras (150 UI A: 1; 100 UI D:1; Control:5) de las 26 cobayas a las que se les aplicó el protocolo de sincronización y superovulación, y de estas estructuras colectadas, solo 3 estructuras del grupo control fueron consideradas aptas.

Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de las diferentes variables sobre la respuesta ovárica de cobayas sincronizadas

		n	$\bar{x} \pm D. E$	V. MIN	V. MÁX
<b>VO</b> (mm <sup>3</sup> )	100 UI A	5	77,3 ± 22,9	51,4	106,5
	150 UI A	5	52,2 ± 19	26	79
	100 UI D	5	88,2 ± 60,4	26,9	176
	150 UI D	5	71,7 ± 44,4	24,4	133,5
	Control	6	21,7 ± 5,2	16,4	31,9
<b>FN</b> (número)	100 UI A	5	10 ± 8	1	23
	150 UI A	5	3,6 ± 2,7	1	8
	100 UI D	5	10,4 ± 9	-	24
	150 UI D	5	15,8 ± 7,2	6	25
	Control	6	2,1 ± 2,4	-	6
<b>DFN</b> (mm)	100 UI A	5	0,8 ± 0,5	0,2	1,5
	150 UI A	5	1,2 ± 0,7	0,3	2
	100 UI D	5	0,5 ± 0,3	-	1
	150 UI D	5	0,4 ± 0,2	0,2	0,7
	Control	6	0,2 ± 0,2	-	0,4
<b>FL</b> (número)	100 UI A	5	11,6 ± 9,3	0	21
	150 UI A	5	14,8 ± 11,1	2	26
	100 UI D	5	11 ± 11,5	3	31
	150 UI D	5	11,6 ± 8,2	2	21
<b>DFL</b> (mm)	100 UI A	5	0,4 ± 0,1	0,3	0,5
	150 UI A	5	0,4 ± 0,1	0,2	0,7
	100 UI D	5	0,6 ± 0,1	0,3	0,8
	150 UI D	5	0,5 ± 0,2	0,2	0,8
<b>CL (mm)</b>	100 UI A	5	2,2 ± 1,6	1	5
	150 UI A	5	1,4 ± 0,4	-	3
	100 UI D	5	1,2 ± 0,4	1	2
	150 UI D	5	1,2 ± 1,6	-	4
	Control	6	3 ± 1	2	4

<b>DCL</b> <b>(mm)</b>	100 UI A	5	0,7 ± 0,2	0,3	1
	150 UI A	5	0,4 ± 0,4	-	0,9
	100 UI D	5	0,9 ± 0,1	0,7	1
	150 UI D	5	0,4 ± 0,4	-	1
	Control	6	0,6 ± 0,1	0,4	0,7
<b>AMV</b> <b>(horas)</b>	100 UI A	5	67,2 ± 7,4	59	73
	150 UI A	5	67,2 ± 7,4	59	73
	100 UI D	5	43,2 ± 7,4	35	49
	150 UI D	5	43,2 ± 7,4	35	49
	Control	6	20 ± 6,1	12	24
<b>C.E</b> <b>(horas)</b>	100 UI A	5	135,2 ± 4,9	133	144
	150 UI A	5	135,2 ± 4,9	133	144
	100 UI D	5	113,8 ± 10,7	109	133
	150 UI D	5	113,8 ± 10,7	109	133
	Control	6	128 ± 12,3	120	144

**VO=** volumen ovárico. **FN=** número de folículos normales. **DFN=** diámetro de los folículos normales. **FL=** número de folículos luteinizados. **DFL=** diámetro de los folículos luteinizados. **CL=** cuerpos lúteos. **DCL=** diámetro de los cuerpos lúteos. **AMV=** apertura de la membrana vaginal. **CE=** colecta de estructuras. **n=** número de cobayas.

Las diferentes características ováricas y de conducta estral de las hembras en las que se incluye: inicio de celo, número y diámetro de estructuras ováricas, se resumen en la tabla 5. El inicio de celo, considerado el día que las hembras mostraron apertura de membrana vaginal después del retiro de la fuente de progesterona, fue de 47,0 ± 19,6 horas. El valor medio para la colecta de estructuras desde el inicio de celo fue después de 125,3 ± 13,0 horas (5,2 ± 0,5 días) con un rango de 4,5 (109,0 horas) – 6 días (144 horas).

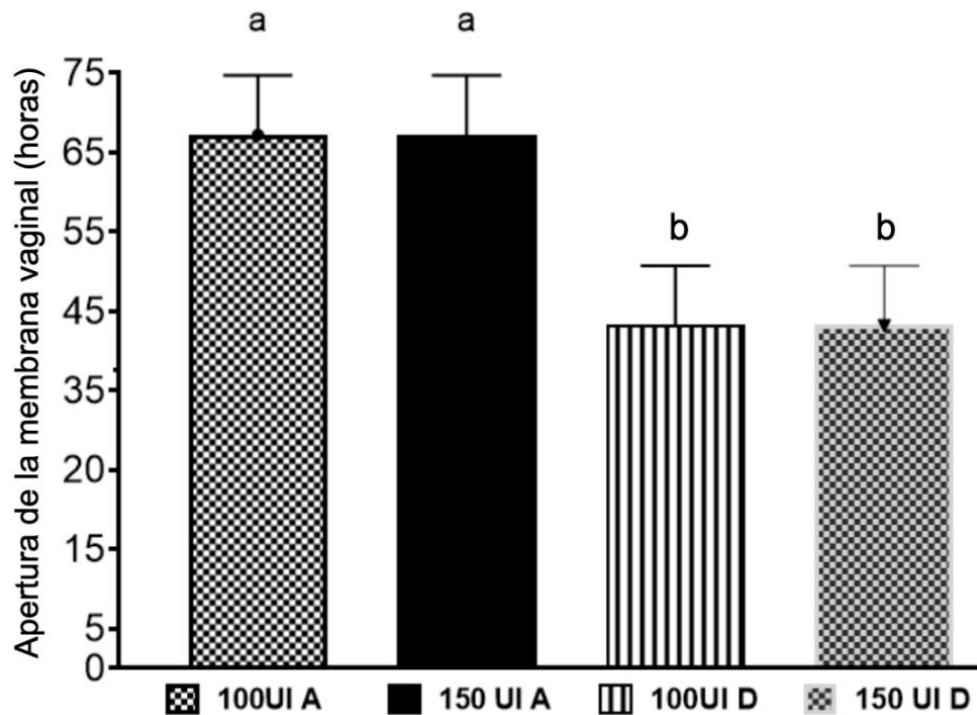


Figura 12: Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal de cobayas desde la aplicación de eCG hasta el inicio de celo. Cobayas a las que se aplicó 100 UI de eCG antes del retiro de  $P_4$  (100 UI A), cobayas a las que se aplicó 150UI de eCG antes del retiro de  $P_4$  (150 UI A), cobayas a las que se aplicó 100 UI eCG el día del retiro de  $P_4$  (100 UI D), y cobayas a las que se aplicó 150 UI eCG el día del retiro de  $P_4$  (150 UI D). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a – b  $p < 0,05$ ).

La media de la apertura de la membrana vaginal después del retiro de la fuente de progesterona fue diferente entre los grupos tratados con eCG ( $p < 0,05$ ). Los grupos tratados con eCG antes del retiro de  $P_4$  mostraron el inicio de celo similar entre ellos, y en estos grupos fue mayor el tiempo de inicio de celo en comparación con los grupos del día del retiro de  $P_4$  los cuales tuvieron un tiempo de inicio de celo similar (100 UI A  $67,2 \pm 7,4$ ; 150 UI A  $67,2 \pm 7,4$  vs. 100 UI D  $43,2 \pm 7,4$ ; 150 UI D  $43,2 \pm 7,4$ ; Figura 12,  $p < 0,05$ ); esto se debe a la ventana de 24 horas entre la aplicación de eCG.

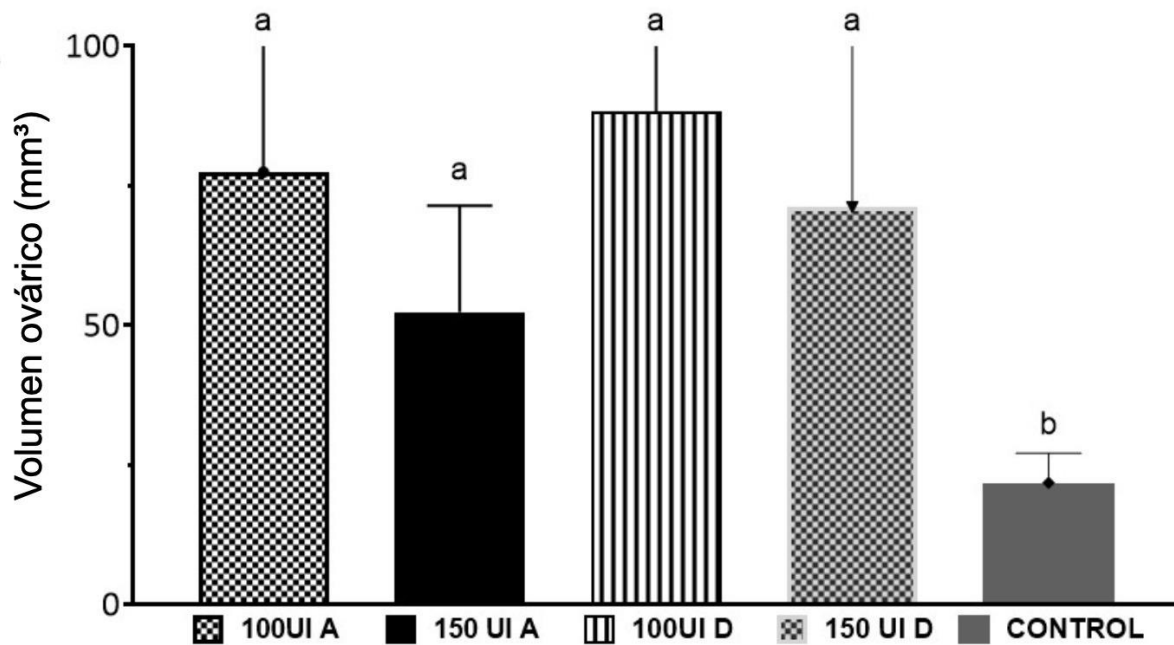


Figura 13. Volumen ovárico de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG. Cobayas a las que se aplicó 100UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI A), cobayas a las que se aplicó 150 UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI A), cobayas a las que se aplicó 100 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI D), cobayas a las que se aplicó 150 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI D), y cobayas que no se aplicó eCG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a – b p<0,05).

La evaluación de las características morfométricas del ovario demostró que el valor medio del volumen ovárico fue de  $60,6 \pm 40,6 \text{ mm}^3$  para todas las hembras. Al comparar esta característica entre grupos todas las hembras a las que se les aplicó eCG mostraron un volumen ovárico similar entre ellos pero mayor (100 UI A  $77,3 \pm 22,9$ ; 150 UI A  $52,2 \pm 19$ ; 100 UI D  $88,2 \pm 60,4$ ; 150 UI D  $71,1 \pm 44,4 \text{ mm}^3$ ; Figura 13, p>0,05) en comparación con el grupo control que fue el grupo que tuvo el menor volumen ovárico ( $21,7 \pm 5,28 \text{ mm}^3$ ).

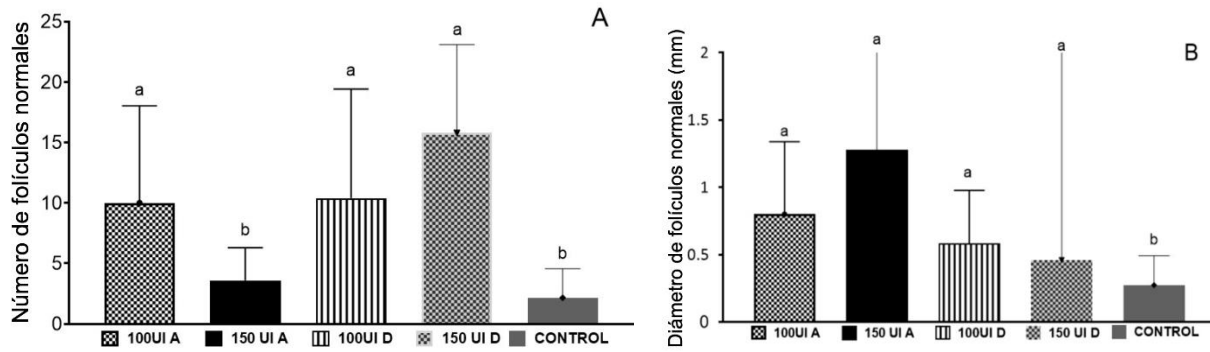


Figura 14: Total de folículos normales (Panel A) y diámetro de folículos normales (Panel B) de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG. Cobayas a las que se aplicó 100UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI A), cobayas a las que se aplicó 150 UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI A), cobayas a las que se aplicó 100 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI D), cobayas a las que se aplicó 150 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI D), y cobayas que no se aplicó eCG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a – b – c p<0,05).

Al evaluar las características ováricas se observó que la administración de eCG afectó la cantidad de folículos ( $p < 0,05$ ), al igual que el diámetro de estos ( $p < 0,05$ ). A las hembras a las que se les administró eCG antes o después del retiro de la progesterona fueron las que tuvieron mayor y similar población folicular (100 UI A  $10 \pm 8$ ; 100 UI D  $10,4 \pm 9$ ; 150 UI D  $15,8 \pm 7,2$ ) en comparación con el grupo control ( $2,1 \pm 2,4$ ) (Figura 14 A,  $p < 0,05$ ).

En este mismo sentido, el diámetro de los folículos normales también se vio afectado por la aplicación de eCG; a todos los grupos a los que se les administró intraperitonealmente eCG mostraron un diámetro folicular mayor y similar entre ellos en comparación con el grupo control (100 UI A  $0,8 \pm 0,5$ ; 150 UI A  $1,2 \pm 0,7$ ; 100 UI D  $0,5 \pm 0,3$ ; 150 UI D  $0,4 \pm 0,2$  vs. Control  $0,2 \pm 0,2$  mm<sup>3</sup>; Figura 14 B,  $p < 0,05$ ).



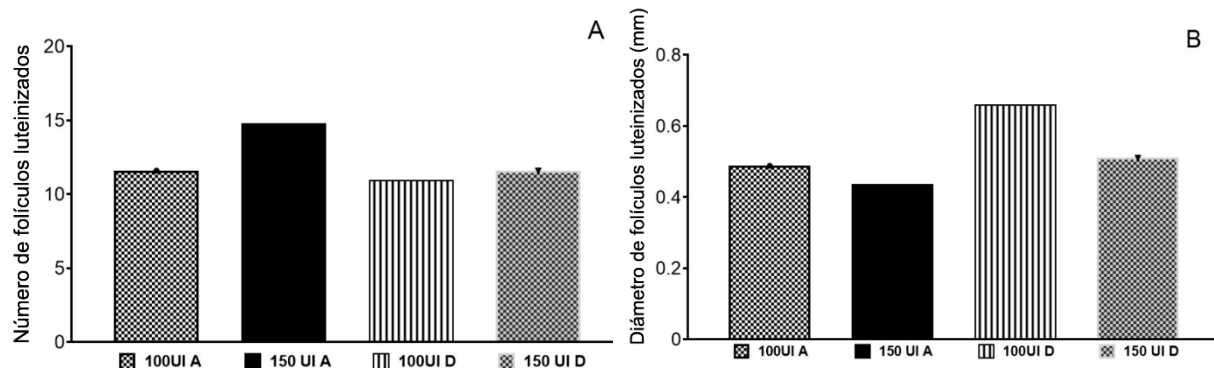


Figura 15. Total de folículos luteinizados (Panel A) y diámetro de folículos luteinizados (Panel B) de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG. Cobayas a las que se aplicó 100UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI A), cobayas a las que se aplicó 150 UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI A), cobayas a las que se aplicó 100 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI D), cobayas a las que se aplicó 150 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI D), y cobayas que no se aplicó eCG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a – b – c p<0,05).

Se reportó que la administración de eCG a cobayas indujo la luteinización de folículos, sin embargo, la administración de eCG no afectó el número (Figura 15 A, p>0,05), ni el diámetro de estos (Figura 15 B, p>0,05).

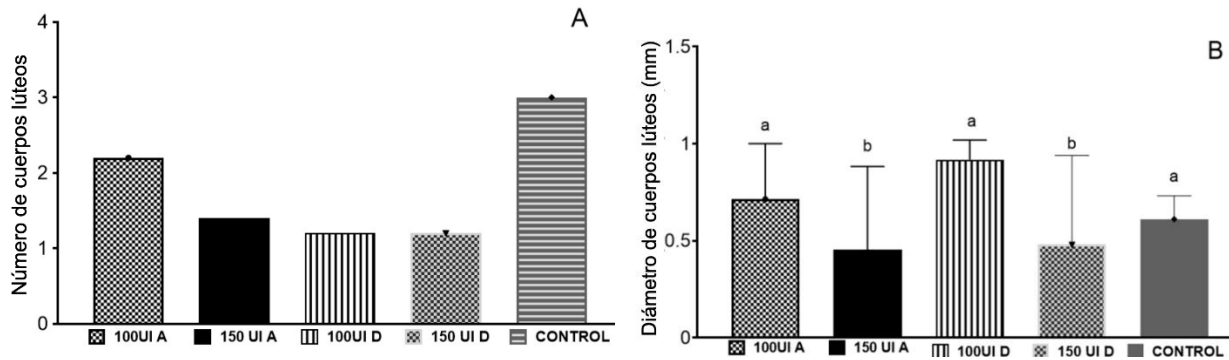


Figura 16. Total de cuerpos lúteos (Panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (Panel B) de cobayas a las que se les aplicó un protocolo de superovulación con diferentes dosis de eCG. Cobayas a las que se aplicó 100UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI A), cobayas a las que se aplicó 150 UI de eCG antes del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI A), cobayas a las que se aplicó 100 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (100 UI D), cobayas a las que se aplicó 150 UI el día del retiro de P<sub>4</sub> (150 UI D), y cobayas que no se aplicó eCG (Control). Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a – b – c p<0,05).

A la evaluación de las demás características morfológicas ováricas, se pudo evidenciar que la administración de eCG no afectó el número de cuerpos lúteos (100 UI A 2,2±1,6; 150 UI A 1,4±1,3; 100 UI D 1,2±0,4; 150 UI D 1,2±1,6; Control 3±1) (Figura 16 A, p>0,05), sin embargo, el diámetro de estos si fue afectado por la administración de eCG (Figura 16 B, p<0,05). Todas las hembras a las que se les administró 150 UI de eCG antes y después del retiro de la fuente de P<sub>4</sub> tuvieron un menor y similar diámetro de sus cuerpos lúteos (150 UI A 0,4±0,4 y 150 UI D 0,4±0,4) en comparación con los demás grupos (100 UI A 0,7±0,2; 100 UI D 0,9±0,1; Control 0,6±0,1; Figura 16 B; p<0,05).

## 6. Discusión

Los resultados del presente estudio señalan que, la administración intraperitoneal de eCG antes o el día de la supresión de progesterona como parte de un protocolo de sincronización del celo y superovulación, no afecta el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas después del lavado de oviductos y útero. Sin embargo, si tiene un efecto sobre las características morfológicas del ovario (volumen ovárico, folículos y cuerpos lúteos).

No obstante, a pesar de no tener el efecto deseado, si se obtuvo un total de 7 embriones (Grupo 150 UI A: 1 mórula, 100 UI D: 1 mórula y control 5: mórulas) y todos estos estuvieron en un estadio de desarrollo de mórula, su obtención se realizó en el día  $5,2 \pm 0,5$  ( $125,3 \pm 13,0$  horas) luego de la comprobación de la apertura de la membrana vaginal (indicativo de manifestación de celo) que para nuestro estudio fue considerado como el día del apareamiento y el momento en el que ocurre la ovulación.

El ciclo estral de la cobaya tiene una duración de aproximadamente 15 a 17 días y se encuentra dividido en cuatro etapas: estro, metaestro, diestro y proestro (Araníbar & Echevarría, 2014); en el estro que dura entre 6 a 11 horas (Quesenberry & Donnelly, 2019), es cuando la hembra es receptiva al macho y se da la apertura de la membrana vaginal y la ovulación (Luna et al., 2003). Si tomamos como referencia que en el estro ocurre la ovulación, la implantación de los embriones se da aproximadamente entre los días 7-8 tras la fertilización (Thapar et al., 1988) con una ventana de 1-2 días (Chavatte-Palmer & Guillomot, 2007). Si se sobrepasa esa ventana de días, el útero pasa a un estado de no receptividad (Ueda et al., 2003). El día de lavado de los oviductos y útero de nuestro estudio fue el  $5,2 \pm 0,5$  días, lo que sugiere que este día estuvo dentro de la ventana adecuada para obtener las estructuras antes de su implantación.

Esta ventana de tiempo para realizar la colecta de estructuras, se ha demostrado en estudios realizados por Takahashi et al., (1999), quienes recuperaron estructuras los días 1,3, 4 y 5 después de la cópula. Asimismo, las características de estas se relacionaban con estadios de 4 y 8 células correspondientes a los estadios de mórula y blastocisto, lo que concuerda con el estadio de desarrollo de los embriones colectados en nuestro estudio. Si la recolección se realiza pasados los 5 días, es probable que no se logre recuperar ninguna estructura del tracto genital puesto que, como mencionamos anteriormente ya se dio la implantación, pero para hacer esta afirmación es necesario el desarrollo de más estudios específicos que confirmen esta hipótesis.

El uso de eCG para superovular cobayas, ha sido reportado por Kosaka & Takahashi, (1989) quienes sincronizaron el celo de hembras de 3-4 meses utilizando implantes de P<sub>4</sub> para posteriormente, aplicar 10 UI eCG vía intraperitoneal 8 y 24 horas antes o después de la retirada de la progesterona dando como resultado, el éxito en la inducción de la superovulación aplicando la eCG 8 horas antes del retiro del progestágeno. En este sentido, los autores relacionan el éxito con la aplicación de eCG en un momento fijo del ciclo estral, para este caso en la etapa de proestro. Sin embargo, en nuestro estudio no se obtuvo la respuesta esperada y esto quizás se deba a la dosis y etapa del ciclo estral en la que se administró la eCG, aunque es una hipótesis que no se puede comprobar en el presente estudio.

Las características morfológicas de los ovarios pueden verse afectadas por algunos factores fisiológicos y patológicos (Fernández et al., 2022). Se ha observado que la administración de altas dosis de hormonas gonadotrópicas hipofisarias (FSH) y no hipofisarias (eCG), pueden ocasionar un cambio en la función ovárica, específicamente en el número y diámetro folicular y a posteriori después de la ovulación en la cantidad y diámetro de cuerpos lúteos lo que provoca un cambio en la forma y peso del ovario (Komatsu et al., 2021). En nuestro estudio se observó que, la administración de 100 y 150 UI provocan un aumento en el volumen ovárico. Estos resultados se relacionan con estudios de *Kosaka & Takahashi, (1989)* quienes demostraron que la eCG estimula un aumento del número de folículos en animales previamente sincronizados con un dispositivo liberador de P<sub>4</sub> durante 21 días. Estas variaciones observadas en nuestro estudio en cuanto al volumen ovárico como consecuencia de la administración de diferentes dosis de eCG en comparación con aquellas hembras sin estimulación hormonal, estarían relacionadas principalmente con cambios que ocurren en los componentes somáticos de los folículos durante la fase de previa a la ovulación con fenómenos de crecimiento y diferenciación (Richards, 1980) que, posteriormente de ocurrir la múltiple ovulación, y bajo la influencia de cambios hormonales, ocasionarían cambios morfológicos ováricos (Teruel et al., 2006).

Nuestros resultados sugieren que la administración de diferentes dosis de eCG ocasiona el aumento de un mayor número de folículos en desarrollo pero que estos no se encontraban en una etapa madura para la ovulación lo que provocó el aumento de la cantidad de folículos luteinizados ( $12,5 \pm 9,4$ ), sin diferir de la dosis de eCG utilizada. Asimismo, la administración de eCG no aumentó el número de cuerpos lúteos, pero si provoca el aumento del volumen ovárico, la posible explicación a este hallazgo puede ser debido a que la eCG es principalmente efectiva en la etapa de folículo antral, pero es insuficiente para inducir la ovulación de todos los folículos grandes (Li et al., 2015); no obstante, en nuestro estudio se incluyó la hormona hCG para inducir la ovulación de los folículos grandes. Otros estudios

tanto *in vivo* como *in vitro* también muestran que la eCG ejerce efectos inhibitorios sobre la atresia folicular y apoptosis de las células de la granulosa (Braw et al., 1981; Carson et al., 1979; Chun et al., 1994), lo que estaría explicando la gran cantidad de folículos luteinizados encontrados en nuestro estudio. No obstante, la razón más convincente se puede deber a que la eCG podría acelerar el proceso de luteinización de las células de la granulosa y teca interna de los folículos grandes (Fujimori et al., 1987), antes que estos lleguen a ovular, y por lo tanto la administración de cualquier hormona que induzca la ovulación no tendría ese efecto, como es el caso de nuestro estudio en la que la administración de hCG no tuvo el efecto esperado, pero para hacer esta afirmación es necesario el desarrollo de más estudios específicos que confirmen esta hipótesis.

En este mismo sentido, existen otros trabajos en los que se ha obtenido resultados similares a los nuestros, la administración de eCG promueve la luteinización de las células de la granulosa, pero no el desarrollo folicular lo que concuerda con nuestro estudio en donde la eCG puede inducir a una luteinización folicular pero no la superovulación; es decir, la eCG utilizada en cobayas cíclicas multíparas tiene una actividad similar a la LH pero no a la FSH (Li et al., 2015). Sin embargo, Barahona & Quishpe, (2012) encontraron que tras la administración de 30 UI de eCG en cobayas primerizas hubo un mayor número de crías, otros autores como Popova et al., (2002) tienen hallazgos de que la eCG en cobayas puede inducir a SOV, no obstante los resultados obtenidos de nuestra investigación discrepan entre estos estudios, quizá debido a otros factores como la raza, dosis o edad (Behringer et al., 2003; Daniel, 1971; Gates, 1971).

## Conclusiones

- La administración de una dosis de 100 o 150 UI de gonadotropina coriónica equina vía intraperitoneal un día antes y el de supresión de progesterona en cobayas sincronizadas no provocan un efecto de superovulación en cobayas multíparas y por tanto sobre el tipo, calidad y número de estructuras recuperadas.
- La administración de eCG vía intraperitoneal un día antes y el día de la supresión de la fuente de progesterona en cobayas sincronizadas ocasiona una modificación de las características morfológicas del ovario (volumen ovárico).
- La administración de eCG promueve la luteinización de los folículos que se encuentran en crecimiento, lo que sugiere que la gonadotropina coriónica equina en cobayas tiene una función similar a la hormona luteinizante, pero no a la hormona folículo estimulante.

## Referencias

- Almeida, A. (2016). Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho". Universidad de Cuenca.
- Araníbar, E., & Echevarría, L. (2014). Number of ovulations per estrous cycle in Andina and Peru guinea pig (*Cavia porcellus*) breeds. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 25(1), 29–36.
- Armstrong, D. T., & Opavsky, M. A. (1988). Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 39(3), 511–518. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD39.3.511>
- Barahona, M., & Quishpe, O. (2012). Inducción de superovulación en cobayas primerizas, usando gonadotropina sérica con tres dosis diferentes. Universidad Central del Ecuador.
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K., & Nagy, A. (2003). *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual* (4<sup>th</sup> ed.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101622901>
- Behringer, R., Gertsenstein, M., Nagy, K. V., & Nagy, A. (2018). Administration of gonadotropins for superovulation in mice. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), 24–27. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403>
- Bland, K. P. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 73–76. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0600073>
- Bouhier, M. (2016). Categorización de estructuras ováricas: relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario in vitro en la especie bovina [Pontificia Universidad Católica de Argentina]. <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/categorizacion-estructuras-ovaricas-especie-bovina.pdf>
- Braw, R. H., Bar Ami, S., & Tsafiriri, A. (1981). Effect of Hypophysectomy on Atresia of Rat Preovulatory Follicles. *Biology of Reproduction*, 25(5), 989–996. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD25.5.989>
- Carson, R. S., Findlay, J. K., Burger, H. G., & Trounson, A. O. (1979). Gonadotropin Receptors of the Ovine Ovarian Follicle during Follicular Growth and Atresia. *Biology of Reproduction*, 21(1), 75–87. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD21.1.75>
- Charreau, B., Tesson, L., Soullou, J. P., Pourcel, C., & Anegon, I. (1996). Transgenesis in

- rats: technical aspects and models. *Transgenic Research*, 5(4), 223–234.  
<https://doi.org/10.1007/BF01972876>
- Chavatte-Palmer, P., & Guillomot, M. (2007). Comparative implantation and placentation. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 64(3), 166–174.  
<https://doi.org/10.1159/000101742>
- Chun, S. Y., Billig, H., Tilly, J. L., Furuta, I., Tsafiriri, A., & Hsueh, A. J. W. (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 135(5), 1845–1853.  
<https://doi.org/10.1210/ENDO.135.5.7525255>
- Cole, L. A. (2010). Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102>
- Daniel, J. (1971). *Studying Development: Methods in Mammalian Embryology*. In <https://doi.org/10.1086/407030> (Vol. 46, Issue 4). Stony Brook Foundation, Inc.  
<https://doi.org/10.1086/407030>
- Deanesly, R. (1968). The effects of progesterone, testosterone and ergocornine on non-pregnant and pregnant guinea-pigs. *Reproduction*, 16(2), 271–281.  
<https://doi.org/10.1530/JRF.0.0160271>
- Dempsey, E. W. (1937). Follicular growth rate and ovulation after various experimental procedures in the guinea pig. <https://doi.org/10.1152/AJPLEGACY.1937.120.1.126>, 120(1), 126–132. <https://doi.org/10.1152/AJPLEGACY.1937.120.1.126>
- Fernández, E. A., Rosales, C. A., Garzón, J. P., Argudo, D. E., Ayala, L. E., Guevara, G. E., Maldonado, J. E., & Perea, F. P. (2022). Morphological and histological characteristics of ovaries from two genetic groups of guinea pigs (*Cavia porcellus*) from South America. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 33(4), 1–11.  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v33i4.23349>
- Fowler, R. E., & Edwards, R. G. (1957). Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *The Journal of Endocrinology*, 15(4), 374–384.  
<https://doi.org/10.1677/JOE.0.0150374>
- Franco, J., & Uribe Velásquez, L. F. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. 11(1), 41–56.



- Fujimori, K., Nakamura, R. M., Tonetta, S. A., & di Zerega, G. S. (1987). Cessation of transition-phase follicle growth in the guinea pig by follicle-regulatory protein. *Biology of Reproduction*, 37(4), 812–822. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD37.4.812>
- Gates, A. (1971). Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. (D. Jr JC (ed.)). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19720103587>
- Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M., & Joly, T. (2012). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Guerrini, A. (2003). Experimenting with Humans and Animals: from Galen to Animal Rights. In *Experimenting with Humans and Animals: from Galen to Animal Rights*. (Vol. 23, Issue 2, pp. 589–590). <https://doi.org/10.3138/cbmh.23.2.589>
- Hamilton, G. S., & Armstrong, D. T. (1991). The superovulation of synchronous adult rats using follicle-stimulating hormone delivered by continuous infusion. *Biology of Reproduction*, 44(5), 851–856. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD44.5.851>
- Hamilton, G. S., & Tam, W. H. (1990). The bimodular development of ovarian follicles in cyclic guinea pigs and differences between antral follicles developed at different phases of the cycle. <https://doi.org/10.1139/Z90-150>, 68(5), 1031–1036. <https://doi.org/10.1139/Z90-150>
- Hasegawa, A., Mochida, K., Inoue, H., Noda, Y., Endo, T., Watanabe, G., & Ogura, A. (2016). High-yield superovulation in adult mice by anti-inhibin serum treatment combined with estrous cycle synchronization. *Biology of Reproduction*, 94(1), 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134023>
- Hermreck, A. S., & Greenwald, G. S. (1964). The effects of unilateral ovariectomy on follicular maturation in the guinea pig. *The Anatomical Record*, 148(2), 171–176. <https://doi.org/10.1002/AR.1091480207>
- Herrera, H. (2007). Determinación de parametros productivos y reproductivos de cuyes mejorados con sistemas de crianza en jaula y en pozas. ESPOCH.
- INEC. (2000). III Censo Nacional Agropecuario. [https://aplicaciones2.ecuadorencifras.gob.ec/SIN/co\\_alimentos.php?id=21119.03.01](https://aplicaciones2.ecuadorencifras.gob.ec/SIN/co_alimentos.php?id=21119.03.01)
- Ishibashi, I. (1983). Number of ovulation, fertilization and early development of ova in adult rats following treatment with various doses of PMSG and hCG. *The Japanese Journal of*

Animal Reproduction, 29. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302135214>

Jiménez, A. (2005). Parámetros productivos y reproductivos de cuyes mejorados con sistemas de crianza en jaula y en poza. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Komatsu, K., Murata, K., Iwasaki, T., Tokita, S., Yonekura, S., Sugimura, S., Fujishima, Y., Nakata, A., Miura, T., & Yamashiro, H. (2021). Changes in ovarian morphology and hormone concentrations associated with reproductive seasonality in wild large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*). *Animal Reproduction*, 18(4), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0067>

Kosaka, T., & 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](https://doi.org/10.1538/EXPANIM1978.38.1_81)

Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82 E-Suppl. [https://doi.org/10.2527/2004.8213\\_SUPPLE14X](https://doi.org/10.2527/2004.8213_SUPPLE14X)

LabDiet®. (2013). Certified Guinea Pig Diet 5025. <https://www.labdiet.com/product/detail/5025-guinea-pig-diett>

Labhsetwar, A., & Diamond, M. (1970). Ovarian changes in the guinea pig during various reproductive stages and steroid treatments. *Biology of Reproduction*. <http://www.hawaii.edu/PCSS/biblio/articles/1961to1999/1970-ovarian.html>

Li, J. rong, Wang, W., & Shi, F. xiong. (2015). Induction of follicular luteinization by equine chorionic gonadotropin in cyclic guinea pigs. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 16(12), 980–990. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500046>

Luna, F., Cortés, M., Flores, M., Hernández, B., Trujillo, A., & Domínguez, R. (2003). The effects of superior ovarian nerve sectioning on ovulation in the guinea pig. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 1. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-61>

Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2014). Superovulation in Cattle. In R. Hopper (Ed.), *Bovine Reproduction* (pp. 696–702). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118833971.CH75>

Mora, I. (2015). Efecto de la capsaicina administrada en la bolsa ovárica sobre el desarrollo folicular y la pubertad de la cobaya. Universidad autónoma de Puebla.

- Morales-Ledesma, L., Trujillo, A., & Apolonio, J. (2015). In the pubertal rat, the regulation of ovarian function involves the synergic participation of the sensory and sympathetic innervations that arrive at the gonad. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0062-8/FIGURES/2>
- Morrison, J. L., Botting, K. J., Darby, J. R. T., David, A. L., Dyson, R. M., Gatford, K. L., Gray, C., Herrera, E. A., Hirst, J. J., Kim, B., Kind, K. L., Krause, B. J., Matthews, S. G., Palliser, H. K., Regnault, T. R. H., Richardson, B. S., Sasaki, A., Thompson, L. P., & Berry, M. J. (2018). Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *The Journal of Physiology*, 596(23), 5535–5569. <https://doi.org/10.1113/JP274948>
- Muñoz, I., Del Niño Jesus, A., Josa, A., Espinosa, E., & Gil, I. (1995). Use of follicle-stimulating hormone (FSH) to increase the in vitro fertilization (IVF) efficiency of mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12(10), 738–743. <https://doi.org/10.1007/BF02212903>
- Nagy, A., Nagy, K., & Gertsenstein, M. (2010). Production of Mouse Chimeras by Aggregating Pluripotent Stem Cells with Embryos. *Methods in Enzymology*, 476(C), 123–149. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)76008-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)76008-0)
- Noonan, D. (1994). The Guinea Pig (*Cavia porcellus*). *ANZCCART*, 7(3), 1–7. [https://www.researchgate.net/publication/235936317\\_The\\_Guinea\\_Pig\\_Cavia\\_porcellus](https://www.researchgate.net/publication/235936317_The_Guinea_Pig_Cavia_porcellus)
- NRC. (1995). Nutrient Requirements of the Guinea Pig. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231932/>
- Oñate, C. (2008). Evaluación de dos métodos de sincronización del estro en cuyes. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Padilla-Carlin, D. J., McMurray, D. N., & Hickey, A. J. (2008). The Guinea Pig as a Model of Infectious Diseases. *Comparative Medicine*, 58(4), 324. [/pmc/articles/PMC2706043/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111111/)
- Palomino, J. M., Cervantes, M. P., Woodbury, M. R., Mapletoft, R. J., & Adams, G. P. (2017). Effects of eCG and progesterone on superovulation and embryo production in wood bison (*Bison bison athabasca*). *Animal Reproduction Science*, 181, 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2017.03.013>
- Penitente-Filho, J. M. aur., Jimenez, C. R. odrigue., Zolini, A. M. oreir., Carrascal, E., Azevedo,

- J. L. uiz., Silveira, C. O. liveir., Oliveira, F. A., & Torres, C. A. lexandr. A. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Animal Science Journal*, 86(2), 148–152. <https://doi.org/10.1111/asj.12261>
- Popova, E., Krivokharchenko, A., Ganten, D., & Bader, M. (2002). Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats. *Molecular Reproduction and Development*, 63(2), 177–182. <https://doi.org/10.1002/MRD.10173>
- Portelli, C. (2013). Superovulation and Embryo Recovery in the Guinea Pig [Szent Istvan University]. <http://huveta.hu/handle/10832/973>
- Quesenberry, K., & Donnelly, T. (2019). Breeding and Reproduction of Guinea Pigs. <https://www.msdtvetmanual.com/all-other-pets/guinea-pigs/breeding-and-reproduction-of-guinea-pigs>
- Rawson, J. M. R., Galey, C. I., Weinberg, L. C., & Hodgson, B. J. (1979). Effects of gonadotropins on follicular development. Ovulation, and atresia in the mature guinea pig. *Hormone Research in Paediatrics*, 10(1), 25–36. <https://doi.org/10.1159/000178986>
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, 60(1), 51–89. <https://doi.org/10.1152/Physrev.1980.60.1.51>
- Roa, I., Smok, S. C., & Prieto, G. R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490–1496. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400036>
- S.E.A Animalario OMG. (2005). Eutanasia (rata, ratón, hámster y cobayo). <https://nucleus.usal.es/sites/default/files/servicios/sea/formularios/EutanasiaPNSEA4.pdf>
- Segal, T. R., Amini, P., Wang, J., Peters, G., Skomorovska-Prokvolit, Y., Mainigi, M. A., Goldfarb, J. M., Mesiano, S., & Weinerman, R. (2020). Superovulation with human chorionic gonadotropin (hCG) trigger and gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) trigger differentially alter essential angiogenic factors in the endometrium in a mouse ART model. *Biology of Reproduction*, 102(5), 1122–1133. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAA014>
- Sharp, P. (2017). The laboratory guinea pig. In *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*,

Third Edition. <https://doi.org/10.1201/9781315155807>

Shi, F., Mochida, K., Suzuki, O., Matsuda, J., Ogura, A., Tsonis, C. G., Gen, W., Suzuki, A. K., & Taya, K. (2000). Development of embryos in superovulated guinea pigs following active immunization against the inhibin  $\alpha$ -subunit. *Endocrine Journal*, 47(4), 451–459. <https://doi.org/10.1507/endocrj.47.451>

Solís, R., & Chávez, P. (2015). Evaluación de producción in vitro de embriones en cuyes (*cavia porcellus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la universidad técnica de Cotopaxi. Universidad Técnica de Cotopaxi.

Sprott, L. R., Carpenter, B. B., & Thrift, T. A. (2020). Synchronizing estrus in cattle.

Stringfellow, D. A., 1944-, & Seidel, S. M. (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. The Society.

Südmersen, H. J., & Glenny, A. T. (1911). Immunity of guinea-pigs to diphtheria toxin and its effect upon the offspring. *Journal of Hygiene*, 12(1), 64–76. <https://doi.org/10.1017/S0022172400017046>

Suzuki, O., Ogura, A., Asano, T., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., & Oike, M. (1993). Development of preimplantation guinea-pig embryos in serum-free media. *Reproduction, Fertility, and Development*, 5(4), 425–432. <https://doi.org/10.1071/RD9930425>

Suzuki, Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., Watanabe, G., Tsonis, C. G., & Taya, K. (2000). Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 1–7. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1180001>

Takahashi, W., Ueda, H., & Kosaka, T. (1999). Conception rate and embryo development in guinea pigs with synchronized estrus induced by progesterone implant. 43(1), 95–99.

Taylor, D. K., & Lee, V. K. (2012). Chapter 25 - Guinea Pigs as Experimental Models. In M. A. Suckow, K. A. Stevens, & R. P. Wilson (Eds.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 705–744). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0>

Teruel, M. T., Catalano, R. C., Callejas, S. S., Cabodevila, J. A., & Gómez, S. (2006). Efecto de la administración de diferentes dosis de gonadotrofina coriónica equina sobre la respuesta ovárica y el desarrollo in vitro de embriones de ratón. *InVet*, 8(1), 149–156. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1668-](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-)

34982006000100014&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Thapar, M., Kumari, G. L., Shrivastav, T. G., & Pandey, P. K. (1988). Hormonal control of implantation in guinea pigs. *Steroids*, 52(1–2), 85–108. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(88\)90219-X](https://doi.org/10.1016/0039-128X(88)90219-X)
- Ueda, O., Yorozu, K., Kamada, N., Jishage, K. I., Kawase, Y., Toyoda, Y., & Suzuki, H. (2003). Possible expansion of “Window of Implantation” in pseudopregnant mice: time of implantation of embryos at different stages of development transferred into the same recipient. *Biology of Reproduction*, 69(3), 1085–1090. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.103.017608>
- Vaca, J. (2017). Evaluación de tres diluyentes para semen fresco de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en la inseminación artificial. Universidad Técnica de Ambato.
- Villamarín, K. (2016). Evaluación de dos crioprotectores (Etilenglicol y propilenglicol) en la conservación de ovocitos en cobayos (*Cavia porcellus*) en el laboratorio de la carrera de medicina veterinaria. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Wang, J., Liu, Z., Sun, Q., Xia, S., Cui, J., Yang, L., An, L., Zhang, J., Su, L., Su, Y., & Du, F. (2019). Combined treatment with cysteamine and leukemia inhibitory factor promotes guinea pig oocyte meiosis in vitro. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7479. [/pmc/articles/PMC6943477/](https://pmc/articles/PMC6943477/)
- Wang, S., Han, L., Ahmad, S., Cao, S., Xue, L., Xing, Z., Feng, J., Liang, A., & Yang, L. (2012). Effect of a DNA vaccine harboring two copies of inhibin  $\alpha$  (1-32) fragments on immune response, hormone concentrations and reproductive performance in rats. *Theriogenology*, 78(2), 393–401. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.02.019>
- Wilson, R. L., Lampe, K., Matuszewski, B. J., Regnault, T. R. H., & Jones, H. N. (2021). Time mating guinea pigs by monitoring changes to the vaginal membrane throughout the estrus cycle and with ultrasound confirmation. *Methods and Protocols*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/mps4030058>
- Yllera, M. del M., Lombardero, M., & Camiña, M. (2020). Anatomía y fisiología de los animales de laboratorio. *Roedores y lagomorfos*. Instituto de de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural, 60.

## 9. Anexos

### Anexos A. Trabajo de Campo



Anexo A1. Cobayas (*cavia porcellus*) en su periodo de adaptación durante 15 días



Anexo A2. Jaulas de los 5 tratamientos



Anexo A3. Foto panorámica de las cobayas en sus jaulas.



Anexo A4. Administración de progesterona 0,22mg/kg a las cobayas durante 15 días.



Anexo A5. Adecuación de jaulas individuales y colocación del macho para cada tratamiento.



Anexo A6. Administración intraperitoneal de hormona eCG.





Anexo A7. Revisión de la membrana vaginal cerrada



Anexo A8. Revisión de la membrana vaginal abierta.



Anexo A9. Apareamiento de los cobayos.

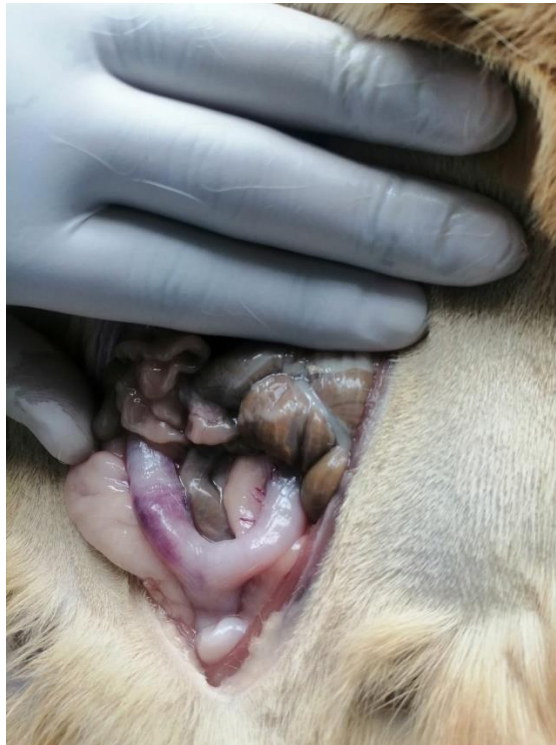
## Anexos B. Trabajo de Laboratorio



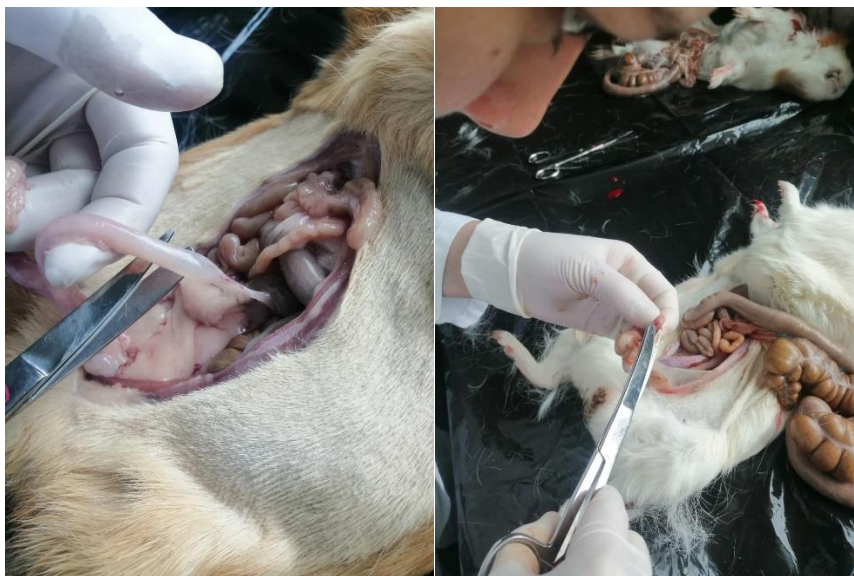
Anexo B1. Preparación del suplemento para mantenimiento de útero, oviductos y ovarios.



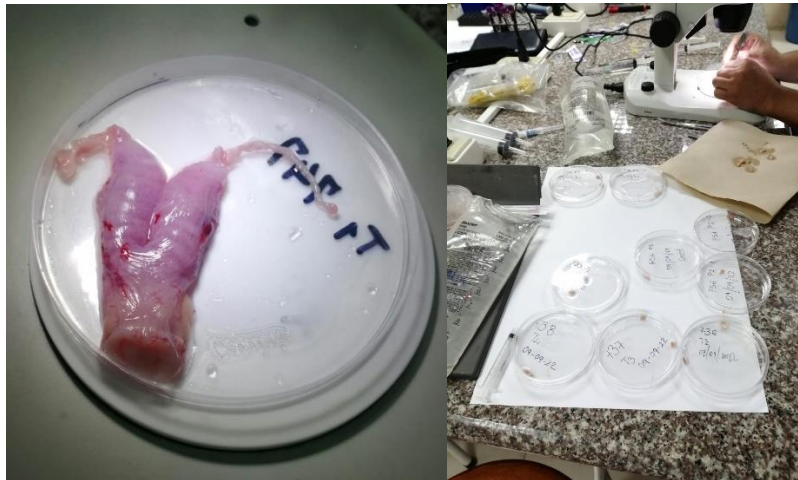
Anexo B2. Incisión en la parte baja del abdomen de la cobaya.



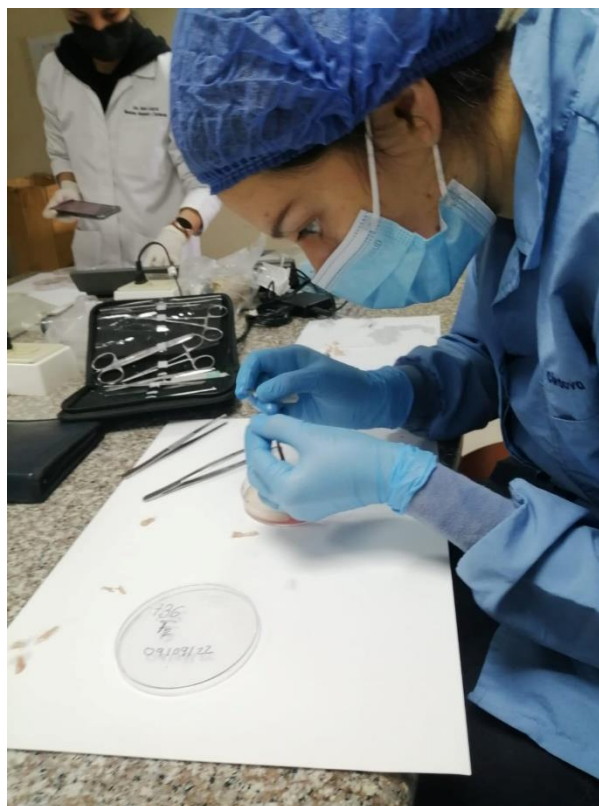
Anexo B3. Localización del útero.



Anexo B4. Extracción del útero, oviductos y ovarios.



Anexo B5. Colocación de útero, oviductos y ovarios recolectados.



Anexo B6. Limpieza de oviductos.



Anexo B7. Mantenimiento de implementos para el lavado en la placa térmica.



Anexo B8. Localización y lavado de oviductos bajo el estereomicroscopio.



Anexo B9. Lavado de oviductos y útero.



Anexo B10. Folículos normales encontrados en ovarios de cobayas

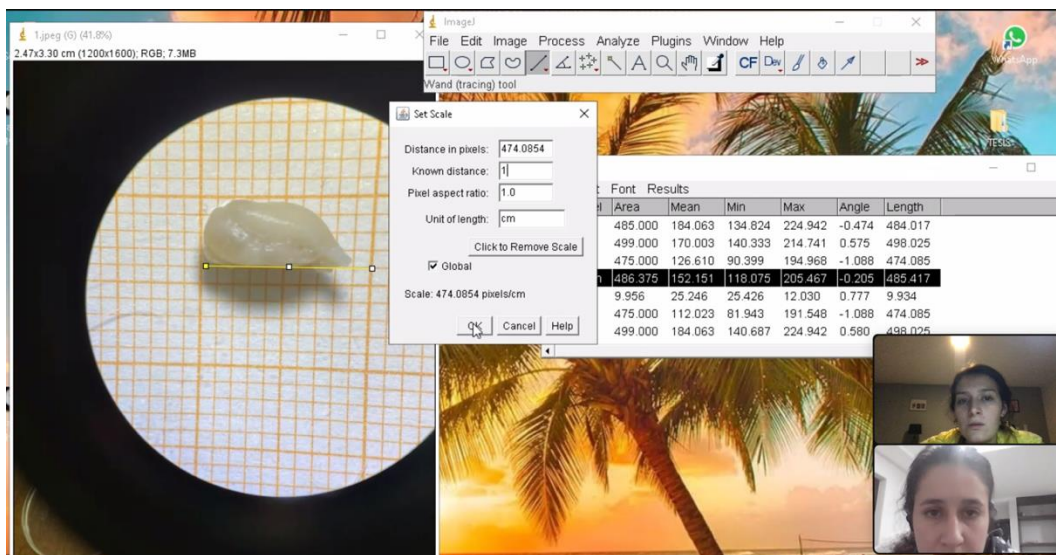


Anexo B11. Folículos luteinizados encontrados en ovarios de cobayas.



Anexo B12. Cuerpo lúteo encontrado en ovario de cobaya

## Anexo C. Trabajo digital



Anexo C1. Medición de folículos en el programa ImageJ.