

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de la respuesta ovárica en cobayas (*Cavia porcellus*) superovuladas con la hormona folículo estimulante

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

Autoras:

Grace Estefanía Loayza Salazar

María Belén Quezada Vimos

Director:

José Luis Pesántez Pacheco

ORCID:  0000-0002-5669-6014

Cuenca, Ecuador

2023-05-04

Resumen

En el presente estudio se determinó el efecto de la superovulación con la hormona folículo estimulante porcina (pFSH), en diferentes momentos del ciclo sobre la respuesta ovárica de cobayas previamente sincronizadas. Se utilizaron 20 hembras multíparas, donde se sometieron a un protocolo de sincronización con progesterona (P_4) (Altrenogest; 0,22 mg/kg) vía oral por 15 días. Asimismo, se formaron 3 grupos: grupo 1 ($n=7$), donde se aplicó una dosis diaria de 30 UI de pFSH divididas en dos aplicaciones, (mañana y tarde), los días 13, 14 y 15 (día del retiro de P_4); grupo 2 ($n=7$), similar al anterior grupo se administró la misma dosis dos veces por día de pFSH los días 15, 16 y 17; y grupo 3 ($n=6$) no se administró dosis, por lo que se consideró como control. Luego se evaluaron los siguientes parámetros: horas transcurridas desde el retiro de P_4 hasta la apertura de la membrana vaginal (AMV- P_4), horas transcurridas desde la aplicación de pFSH hasta la apertura de la membrana (AMV-pFSH), volumen ovárico (VO), total de folículos (FOLs), diámetro folicular (D-FOLs), total de cuerpos lúteos (CLs) y diámetro de CLs (D-CLs). Como resultados, se obtuvo que la aplicación de pFSH antes o después de la sincronización con P_4 no influyó en la respuesta ovárica. Se observaron cambios morfológicos en el ovario, donde el VO junto con D-FOLs fueron mayores para los grupos de pFSH; sin embargo, en relación a FOLs, CLs y D-CLs, no se encontraron afectados.

Palabras clave: cobayas, respuesta ovárica, sincronización, superovulación, hormona folículo estimulante

Abstract

In the present study, the effect of superovulation with porcine follicle stimulating hormone (pFSH), at different times of cycle on the ovarian response of previously synchronized guinea pigs was determined. 20 multiparous females were used, which underwent a synchronization protocol with progesterone (P₄) (Altrenogest; 0.22 mg/kg) orally for 15 days. Likewise, 3 groups were formed: group 1 (n=7), where a daily dose of 30 IU of pFSH was applied, divided into two applications, (morning and afternoon), on days 13, 14 and 15 (day of P₄ withdrawal); group 2 (n=7), similar to the previous group, was administered the same dose of pFSH twice a day on days 15, 16 and 17; and group 3 (n=6) did not receive a dose, so it was considered as control. The following parameters were then evaluated: hours elapsed from the removal of P₄ to the opening of the vaginal membrane (AMV-P₄), hours elapsed from the application of pFSH to the opening of the membrane (AMV-pFSH), ovarian volume (VO), total follicles (FOLs), follicular diameter (D-FOLs), total corpora lutea (CLs) and diameter of CLs (D-CLs). As results, it was obtained that the application of pFSH before or after the synchronization with P₄ did not influence the ovarian response and thus, morphological changes were observed in the ovary where the VO together with D-FOLs were higher for the pFSH groups; however, in relation to FOLs, CLs and D-CLs, they were not affected.

Keywords: guinea pigs, ovarian response, synchronization, superovulation, follicle-stimulating hormone

Abreviaturas utilizadas

AMV= Apertura de la membrana vaginal

AMV-P₄= Horas transcurridas desde el retiro de la fuente de progestágeno hasta la apertura de la membrana vaginal

AMV-pFSH= Horas transcurridas desde la aplicación de pFSH hasta la apertura de la membrana vaginal

CL= Cuerpo lúteo

CLs= Total de cuerpos lúteos encontrados

D-CLs= Diámetro de cuerpos lúteos

D-FOLs= Diámetro de folículos

FOLs= Total de folículos encontrados

eCG= Gonadotropina coriónica equina

FSH= Hormona folículo estimulante

FSH-h= Hormona folículo estimulante humana

GnRH= Hormona liberadora de gonadotropinas

hCG= Gonadotropina coriónica humana

hMG= Gonadotropina menopáusica humana

IETS= Sociedad Internacional de Transferencia de embriones

NaCl= Cloruro de Sodio

o-LH= Hormona luteinizante ovina

P₄= Progesterona

PBS= Solución buffer fosfato

pFSH= Hormona folículo estimulante porcina

pFSH-A= Aplicación de pFSH antes del retiro de progesterona

pFSH-D= Aplicación de pFSH después del retiro de progesterona

PGF_{2α}= Prostaglandina F2 alfa

SOV= Superovulación

UI= Unidades internacionales

VO= Volumen ovárico

Índice de contenido

Introducción	13
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3.Revisión bibliográfica.....	16
3.1. Características fenotípicas de los cobayos.....	16
3.2. Nutrición	16
3.3. Características reproductivas	18
3.3.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra	18
3.3.2. Pubertad.....	20
3.3.3. Endocrinología y cambios del ciclo estral.....	20
3.3.4. Control hormonal del ciclo estral en la cobaya	22
3.3.5. Protocolos de superovulación en cobayas	22
3.3.6. Desarrollo embrionario.....	24
4. Materiales	25
4.1. Materiales.....	25
4.1.1. Físicos	25
4.1.2. Químicos	25
4.1.3. Biológicos	26
4.1.4. Laboratorio	26
4.2. Métodos.....	26
4.2.1. Área de estudio.....	26
4.2.2. Preparación de las unidades experimentales.....	27
4.2.3. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal	29
4.2.4. Administración de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)	30
4.2.5. Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras	31
4.2.6. Evaluación del desarrollo y calidad de estructuras colectadas.....	32
4.2.7. Volumen ovárico, número y diámetro de folículos y cuerpos lúteos	32
4.2.8. Análisis estadístico	34
5.Resultados.....	35
5.1. Clasificación morfológica de las estructuras recuperadas.....	35

5.2. Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas y superovuladas.....35

6. Discusión.....41

Conclusiones.....45

Referencias.....46

Anexos.....60

Índice de figuras

Figura 1: Tipos de conformación de cobayos: A y B.....	16
Figura 2: Sistemas productivos del cobayo: Tradicional (A) y Tecnificado (B).....	17
Figura 3: Representación anatómica del tracto reproductivo de la cobaya.....	19
Figura 4: Esquema de vagina y vulva de la cobaya	19
Figura 5: Perforación de la membrana vaginal. Membrana cerrada (A) y membrana perforada o abierta (B).....	21
Figura 6: Incorporación de mini bombas osmóticas subcutáneas en animales de laboratorio ...	22
Figura 7: Geolocalización de Granja Irquis.....	26
Figura 8: Aplicación de pFSH antes del retiro de P ₄	28
Figura 9. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal (AMV) en cobayas.....	29
Figura 10: Revisión de la apertura de la membrana vaginal.....	30
Figura 11: Inyección intraperitoneal en cobayas.	30
Figura 12: Metodología de Flushing de los cuernos uterinos en animales de laboratorio	31
Figura 14. Esquemmatización de la medición del diámetro del cuerpo lúteo.....	33
Figura 13. Esquemmatización de la medición del volumen ovárico.....	33
Figura 15. Periodo de tiempo de la apertura de la membrana vaginal de cobayas desde el retiro de la fuente de progesterona (Altrenogest)	37
Figura 16. Volumen ovárico en mm ³ (VO).	38
Figura 17. Número total de folículos.....	39
Figura 18: Número total de cuerpos lúteos.....	40

Índice de tablas

Tabla 1: Requerimientos nutricionales del cobayo.....	18
Tabla 2: Clasificación de estructuras recuperadas en el lavado.....	35
Tabla 3: Valores medios y desviación estándar de las distintas variables.....	36

Agradecimientos

Agradezco a Dios que me permitió culminar esta etapa universitaria; agradezco eternamente a mis padres Marco y Grey, por haber creído en mí y ser mi pilar fundamental en toda mi carrera universitaria, ayudándome a enfrentar las adversidades y apoyándome en cada momento con sus consejos, su amor y preocupación.

A mi compañera de tesis Belencita, gracias por haber tomado esta tesis con mucho compromiso y por haber sido siempre incondicional.

A mis hermanos, por motivarme a seguir siempre adelante.

También mis agradecimientos a mi pareja, Adrián, por su paciencia, motivación y apoyo incondicional durante este trayecto.

A María del Carmen, que fue parte importante dentro de todo este trabajo, gracias por el amor hacia mí, por los consejos y por siempre estar presente.

A nuestro director de tesis Dr. José Luis Pesántez, por toda su dedicación, compromiso y, sobre todo, por su paciencia en todo este proceso.

Con mucho cariño.

Grace Loayza Salazar.

Primero agradezco a Dios y a la vida por permitirme llegar a este momento y cumplir este gran sueño que lo he tenido desde pequeña.

A mis padres, Nancy y Fernando, que siempre me apoyaron y me brindaron su amor incondicional todo el tiempo y me alentaron para que siguiera esforzándome por seguir logrando mis metas.

A mi compañera Grace por su trabajo, dedicación y por ser una gran amiga a la cual le tengo mucho cariño.

A nuestro director de tesis, Dr. José Luis Pesántez por permitirme ser parte de su investigación, por su paciencia, dedicación y ser una guía en todo el proceso de este estudio.

Al Dr. Xavier Samaniego y técnicos del Laboratorio de Biotecnología y Reproducción de la Universidad de Cuenca que fueron de gran ayuda para que este trabajo práctico diera frutos, estoy muy agradecida.

Finalmente, a mis mejores amigos y futuros colegas, Vale y José que fueron las personas más especiales que conocí a lo largo de la carrera, gracias por estar para mí, brindarme todo el cariño y comprenderme siempre, espero seguir compartiendo momentos increíbles junto a ustedes.

Belén Quezada Vimos.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a mis padres, que sin duda han sido la razón más grande para el cumplimiento de mis objetivos. Todo lo que soy hoy es gracias a ellos; son lo mejor y lo más valioso que me ha dado Dios.

Grace Loayza Salazar.

Este proyecto se lo dedico a mi familia y amigos que siempre me dieron su apoyo incondicional a lo largo de este camino, les tengo un gran aprecio y en especial a mis padres que se esforzaron mucho para que saliera adelante; esto es de ustedes.

Belén Quezada Vimos.

Introducción

En la actualidad el cobayo forma parte de muchas investigaciones, y a partir del siglo 18th se ha utilizado como animal de laboratorio para la aplicación de distintos tratamientos (Taylor y Lee, 2012). A pesar de que con el paso de los años, el uso del cobayo fue reemplazado paulatinamente por otras especies de roedores como los son el ratón y las ratas (Grégoire, 2012b); sigue teniendo ciertas ventajas, ya que a diferencia de estos, las cobayas poseen un ciclo reproductivo (16 días) y una gestación relativamente larga (65 días) junto con un menor número de embriones implantados, en comparación con otras especies, lo que se asemeja al ciclo reproductivo y gestacional del humano (Wang et ál., 2019), permitiendo así estudiar el desarrollo embrionario adecuado del individuo (Swanson et ál., 2017). Por lo antes expuesto, se considera al cobayo como un modelo predilecto para el estudio de reproducción, principalmente por poseer similitud biológica con la especie humana (Briscoe et ál., 2004); sin embargo, hay que analizar que es un desafío ya que solo tiene 3,8 ovulaciones por ciclo estral. (Noonan, 1994).

Algunos estudios realizados se han enfocado en optimizar los métodos de control del ciclo estral y la respuesta ovárica a los tratamientos superovulatorios, con la finalidad de mejorar la tasa ovulatoria y el índice de obtención de ovocitos o embriones (Grégoire et ál., 2012a; Salcedo, 2016; Portelli, 2013). En roedores, los programas de superovulación (SOV) con previa sincronización del ciclo permiten recolectar ovocitos maduros de oviductos, mediante la hiperestimulación del desarrollo folicular e inducción de la ovulación; donde los ovocitos recolectados pueden utilizarse para diferentes tecnologías reproductivas como criopreservación de embriones (Hasegawa et ál., 2015). Razón por la cual, la SOV podría ser considerada una de las mejores opciones para producir un mayor número de crías incrementando la producción de cobayos.

La inducción de SOV está regulada generalmente por el empleo de hormonas folículo estimulantes como gonadotropina coriónica equina (eCG), gonadotropina coriónica humana (hCG), entre otras (Barahona y Quishpe, 2012); sin embargo, hasta ahora existe mucha discrepancia en los resultados en cuanto a esta especie, debido probablemente a la alta variabilidad en la respuesta, que radica en el hecho de que, en estos trabajos no se utilizó un tratamiento de control previo del ciclo estral (Rawson et ál., 1979; Li et ál., 2015).

Otras hormona que se ha utilizado en cobayas para inducir SOV es la hormona folículo estimulante (FSH), que se puede usar sola o en combinación con hormona liberadora de

gonadotropinas (GnRH) (Carney y Foote, 1990). La administración de FSH exógena genera un incremento en la concentración endógena de la misma, favoreciendo al crecimiento folicular, diferenciación, maduración y ovulación; pudiendo ser necesario agregar al final de este tratamiento, una dosis de GnRH o hCG para que provoque la ovulación (Edwards et ál., 2005). La FSH porcina (pFSH) es sintetizada y secretada por la adenohipófisis del cerdo, que se obtiene a través de procesos como precipitación de proteínas, separación cromatográfica y filtración (Closset y Hennen, 1978); la pFSH al igual que la FSH en las demás especies, se involucra directamente en el crecimiento de folículos inmaduros (Deguettes et ál., 2020). La pFSH ha sido aplicada en varios tratamientos de SOV en diferentes especies tanto de producción (bovinos: Bó, Rogan, y Mapletoft, 2017; ovinos: Loiola et ál., 2015; caprinos: Sánchez et ál., 2014), en ratas (Armstrong y Opavsky, 1988), conejos (Hashimoto et ál., 2007); entre otros, donde observaron resultados benéficos.

Existen pocos estudios que han utilizado la FSH como tratamiento para SOV en cobayas. Reed y Hounslow. (1971) administraron hormona folículo estimulante humana (FSH-h) a cuatro cobayas, donde no obtuvieron respuesta superovulatoria pero si un incremento en el número y tamaño de folículos maduros; mientras que, en el estudio realizado por Soares et ál., (1996) obtuvieron resultados favorables al aplicar en 60 hembras divididas equitativamente en 10 grupos, en 3 fases en donde se iba aplicando eCG, pFSH, gonadotropina menopáusica humana (hMG) y cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%, las dosis se iban acoplando de acuerdo al grupo y fase de estudio; en dichos resultados obtenidos se concluyó que la prostaglandina F2 alfa ($PGF_{2\alpha}$) participa en el mecanismo de ovulación de las cobayas, además que si es posible aumentar el desarrollo folicular utilizando la FSH-h junto con hCG asociadas o no a $PGF_{2\alpha}$. Por lo explicado anteriormente, se ha decidido evaluar la respuesta ovárica a la aplicación de un protocolo a base de pFSH en diferentes momentos previa sincronización del ciclo estral en cobayas.

Objetivos

2.1.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la superovulación con la hormona folículo estimulante, aplicada en diferentes momentos del ciclo, sobre la respuesta ovárica de cobayas previamente sincronizadas.

2.1.2. Objetivos específicos

- Valorar el efecto de dos dosis diarias de pFSH aplicada por tres días consecutivos sobre la respuesta ovárica de cobayas con sincronización previa del ciclo estral.
- Cuantificar y clasificar el número de estructuras recuperadas después de la ovulación de cobayas superovuladas.

Marco Teórico

3.1. Características fenotípicas de los cobayos

Desde el punto de vista fenotípico, el cuy es un animal redondeado y de cuerpo largo, en relación a sus patas que son cortas, al igual que su cola, que posee un par de vertebrae (Sánchez, 2002). Su tamaño es muy variable y depende de su tipo (mejorado o criollo), llegando a medir entre 20 y 25 centímetros de longitud, con pesos de 650g en hembras a los 55 a 70 días de edad y peso de 750g en machos a los 70 días de edad (Chauca de Saldivar, 1997; Sunday et ál., 2010).

En base a su conformación se consideran dos tipos de cobayos: A y B. El tipo A es de carácter tranquilo y adaptable al manejo, es clásico en las razas productoras de carne de calidad donde tienen buena base ósea y excelente en longitud, ancho y profundidad (Figura A). El tipo B posee un carácter nervioso, de forma angular, posee poca profundidad y poco desarrollo muscular (Figura B) (Vaca, 2016).

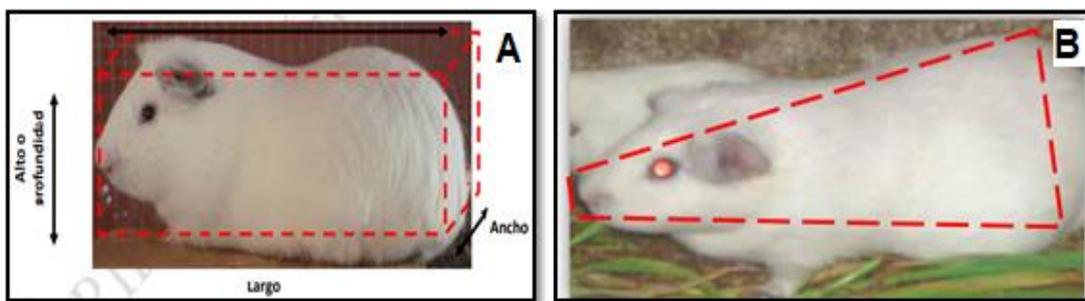


Figura 1: Tipos de conformación de cobayos: A y B. Adaptado de Montes, (2012).

3.2. Nutrición

La alimentación del cobayo es un aspecto muy importante ya que de eso depende el éxito de la producción (Vivas y Carballo, 2009). El cobayo es una especie herbívora monogástrica y su alimentación consiste, en hacer una selección y combinación adecuada de diferentes nutrientes con la finalidad de obtener una eficiencia reproductiva desde el punto de vista económico y nutricional (González et ál., 2019).

En América del Sur se manejan tres tipos de sistemas dentro de la unidad productiva, como lo son: familiar o tradicional (Figura 2A), semi tecnificado y tecnificado (Figura 2B) (Tarrillo et ál., 2018). El sistema tradicional al existir un escaso manejo de los animales, su alimentación se basa en rastrojos de cosecha, residuos de comida, malezas, etc. En el sistema semi tecnificado

se emplean mejores técnicas de crianza y se usan subproductos agrícolas, pastos cultivados y en algunas ocasiones balanceados. El sistema tecnificado emplea mejoras en la tecnología en cuanto a estructura, alimentación y comercialización; su alimentación es mixta que consiste en suministrar forraje más suplemento alimentario, esta alimentación permite llegar a los requerimientos nutritivos y obtener un óptimo rendimiento (Vivas y Carballo, 2009).

Asimismo, los sistemas se realizan según sus fases de crianza: los lactantes, desde el nacimiento hasta los 15-21 días, los de crecimiento, considerados desde el destete hasta los 56 días de edad, se separan por sexo y lotes; y los de engorde, que son hasta los 75-90 días de edad, estos van a adquirir su peso de venta al mercado (Tarrillo et ál., 2018).



Figura 2: *Sistemas productivos del cobayo: Tradicional (A) y Tecnificado (B). Adaptado de Ataucusi, (2015).*

El requerimiento nutritivo (Tabla 1) nos permite poder elaborar raciones balanceadas que va a depender de la edad, estado fisiológico, genotipo y el medio ambiente en el que cría, se debe alimentar por lo menos dos veces al día, un 30-40% durante la mañana y el resto 60-70% por la tarde (Chauca, 2021).

Tabla 1: Requerimientos nutricionales del cobayo en diferentes etapas de crecimiento.

Nutrientes	Etapas		
	Gestación	Lactancia	Crecimiento
Proteína (%)	18	18-22	13-17
Energía digestible (Kcal/kg)	2800	3000	2800
Fibra (%)	8-17	8-17	10
Calcio (%)	1,4	1,4	0,8-1,0
Fosforo (%)	0,8	0,8	0,4-1,0
Magnesio (%)	0,1-0,3	0,1-0,3	0,1-0,3
Potasio (%)	0,5-1,4	0,5-1,4	0,5-1,4
Vitamina C (%)	200	200	200

Fuente: Adaptado de Vivas y Carballo, (2009).

Las proteínas son la base fundamental para la formación de masa muscular, pelos y víscera, la misma que se puede encontrar forrajes ricos en proteína como lo son: las leguminosas, que consumen alrededor del 30% de su peso vivo en forraje verde (FAO, 2000). Por otro lado, los carbohidratos proporcionan la energía necesaria para que el animal pueda mantenerse, crecer y reproducirse; podemos encontrar carbohidratos en todos los granos y subproductos como el afrecho (Vivas y Carballo, 2009). El consumo de agua es indispensable para el crecimiento y desarrollo normal del animal; las fuentes principales se las encuentra en el agua asociada al forraje fresco y el agua ofrecida para bebida. El requerimiento de agua es de 120 cm³ por cada 40 g de materia seca de alimento consumido (Gavilanez, 2014).

3.3. Características reproductivas

3.3.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra

La cobaya tiene ovarios blancos amarillentos de forma ovalada y se encuentran en la cavidad abdominal recubiertos por una membrana serosa, denominada bolsa ovárica. Tienen un diámetro de 3 mm de largo x 2 ancho x 2-mm de profundidad (Hargaden y Singer, 2012). Su función principal está en el producir ovocitos y secretar hormonas como estrógenos y progesterona (Pino, 2015). Lateral a la bolsa ovárica se encuentran los oviductos (Figura 3), con un diámetro de 57

mm de largo x 1,5 mm de diámetro (Aliaga et ál., 2009); se divide en infundíbulo, ámpula e istmo, siendo las encargados de transportar el óvulo hasta el cuerno uterino donde se lleva a cabo la

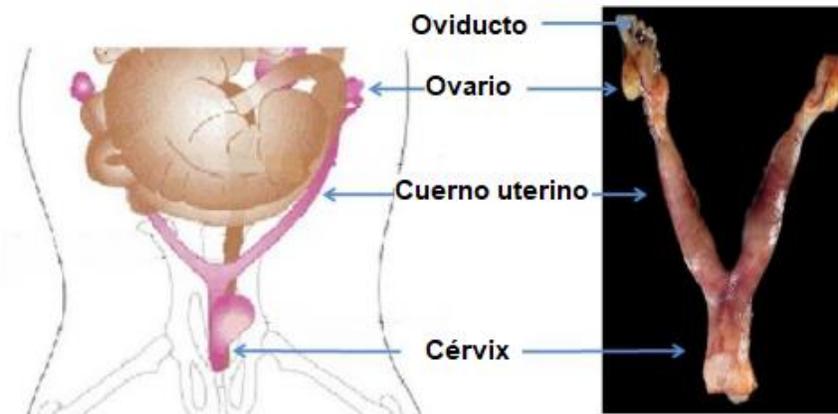


Figura 3: Representación anatómica del tracto reproductivo de la cobaya. Adaptado de Cañón. (2018)

fertilización (Aucapiña y Marín, 2016)

La cobaya posee un útero de cuerpo corto y aplanado dorso-ventralmente (Figura 3); los cuernos uterinos miden en su parte media un aproximado de 6 mm y de longitud 37 mm disminuyendo su diámetro en dirección cráneo-caudal (Solís y Chávez, 2015). Su principal función es recibir al embrión para su implantación, siendo las paredes internas de los cuernos uterinos encargadas de nutrir al huevo o cigoto a partir del endometrio quien es responsable de secretar sustancias nutritivas. (Cañón et ál., 2015)

La vagina mide aproximadamente 30 a 40 mm de largo; ubicada en la cavidad pélvica en relación ventral a la vejiga (Hargaden y Singer, 2012). La cobaya posee una membrana epitelial que recubre el orificio de la vagina (Grégoire, 2012b). La vulva tiene forma de “Y” (Figura 4) y llega a medir hasta 25 mm (Solís y Chávez, 2015).

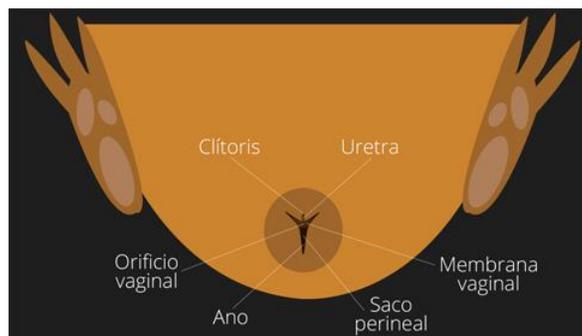


Figura 4: Esquema de vagina y vulva de la cobaya. Tomado de Fernández, (2020).

3.3.2. Pubertad

Se inicia a los 55 y 70 días de edad, dependiendo de la línea y de la alimentación que se les brinda ya sea forraje, balanceado o una alimentación mixta, se conoce que las hembras alcanzan la pubertad cuando han llegado a un peso entre 800 y 1400 g, y los machos a un peso de 1000 a 1500 g. En esta fase en los machos, los testículos inician la producción de espermatozoides y en las hembras, la de óvulos y la manifestación de celo (Chauca de Saldivar, 1997).

Los cuyes copulan en cualquier época del año y por lo general la cubrición ocurre en la noche, es por esto que se dificulta establecer un control de la monta. Durante el empadre la relación macho/hembras en animales jóvenes es de 1 a 8 y para mayores de 6 meses se ha comprobado la eficiencia del macho reproductor hasta con 10 hembras; el empadre se realiza a los tres meses y con un peso mínimo de 550 g (Vivas y Carballo, 2009).

3.3.3. Endocrinología y cambios del ciclo estral

El cuy es una especie poliéstrica continua, es decir, cicla durante todo el año con pequeñas variaciones de fecundidad. Su ciclo estral presenta cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro, y tiene una duración de 15 a 17 días. Cada una de las fases está caracterizada por diferentes cambios hormonales y algunos morfológicos en el aparato reproductor (Quenta, 2020).

3.3.3.1. Etapas del ciclo estral

- **Proestro:**

Con una duración entre 1 a 1,5 días (Kuhne y Mendoza, 1992), en esta fase existe una rápida disminución de los niveles de progesterona plasmática que precede al estro, esto permite que el folículo preovulatorio crezca y secrete estradiol en un ambiente sin progesterona, la acción del incremento de los estrógenos ocasiona una notable congestión a nivel de sus genitales externos con una secreción ligeramente serosa transparente (Ishii, 1920).

- **Estro:**

Durante esta fase, que se extiende por 8 a 24 horas (Kuhne y Mendoza, 1992), la hembra acepta voluntariamente al macho. El acercamiento de esta etapa se manifiesta con una secreción viscosa en donde la vulva se encuentra edematizada y húmeda (Tresidder, 1922). Y el principal evento fisiológico importante es la ovulación del folículo preovulatorio.

- **Metaestro:**

Su duración es entre 1 y 1,5 días (Kuhne y Mendoza, 1992) en esta fase la hembra rechaza al macho, iniciándose el crecimiento de cuerpo lúteo y el útero adquiere ciertas características fisiológicas que permitan la implantación del óvulo fecundado (Obregón, 2009).

- **Diestro:**

La duración del diestro se encuentra entre 13 a 15 días (Kuhne y Mendoza, 1992) conocida también como fase de reposo o descanso, su tiempo de duración es más largo que las otras fases (Obregón, 2009).

3.3.3.2. Ovulación

La ovulación de la cobaya es espontánea y se produce a las 10 horas de iniciado el celo, en esta fase se libera de 1-6 óvulos que pueden permanecer viables por un lapso de 15 horas, alcanzando un promedio de 3,14 ovulaciones por ciclo estral (Cerna, Deza, y Lluén, 1995). Un indicativo de que la hembra está en celo (estro) es la perforación de la membrana vaginal y hay que destacar que durante la etapa de ocurre la ovulación (Figura 5). Otro indicativo de celo es el cambio de coloración de la zona de la vulva de coloración pálida a rosa oscuro (Wilson et ál., 2021).

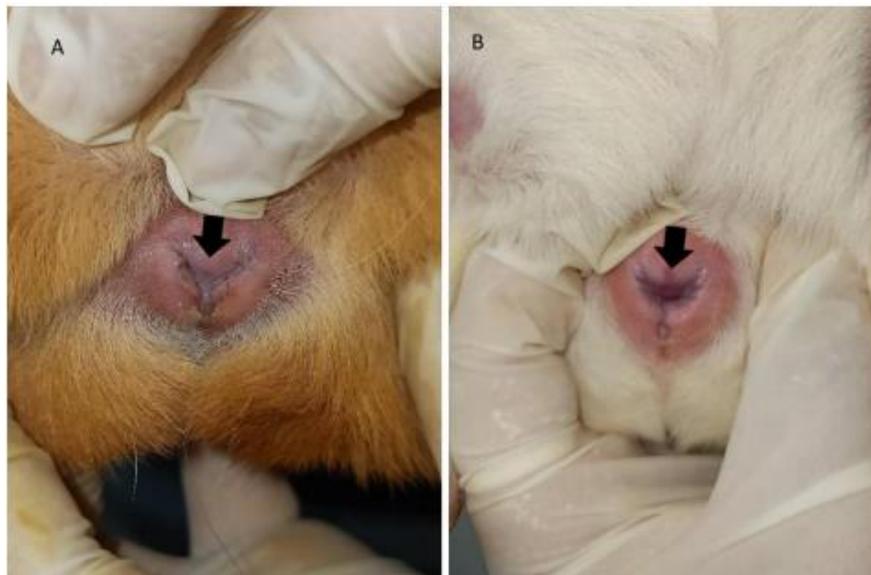


Figura 5: Perforación de la membrana vaginal. Membrana cerrada (A) y membrana perforada o abierta (B). Tomado de Rivas, (2022).

3.3.4. Control hormonal del ciclo estral en la cobaya

3.3.4.1. Protocolos de sincronización

La sincronización involucra el control o la manipulación del ciclo estral con el propósito de que las hembras expresen estró aproximadamente al mismo tiempo. La sincronización debe ajustarse a las consideraciones de cada especie. (Oñate, 2008). Los tratamientos para la manipulación del ciclo estral se basan en la utilización de hormonas exógenas como progestágenos y/o prostaglandinas (Salcedo, 2016). La progesterona exógena (P_4) ayuda a mantener niveles altos de la misma, bloqueando la ovulación, con la finalidad de generar un nuevo ciclo al retiro de la progesterona (Grégoire et ál., 2010). Así, el uso de progestágenos en cobayos logra tener una tasa de sincronización del celo de hasta un 95% (Grégoire, 2012a). Por otra parte, el uso de prostaglandinas en cobayos tiene resultados no deseables, dado que, estas hormonas usadas por sí solas no responden adecuadamente para controlar el ciclo estral (Obregón, 2009).

3.3.5. Protocolos de superovulación en cobayas

Se denomina superovulación al aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie que en el caso de la cobaya son mínimo de 3,14 por ciclo (Araníbar y Echevería, 2014). La superovulación se consigue mediante el uso de hormonas exógenas permitiendo la producción de varios embriones en el mismo ciclo estral (Mogollón y Burla, 2013).

3.3.5.1. Hormonas aplicadas en protocolos de superovulación

3.3.5.1.1. Hormona luteinizante ovina (o-LH)

Entre los estudios que han tenido resultados favorables con esta hormona se encuentra el de Garza, Shaban, y Terranova. (1984) lo cuales realizaron una superovulación con o-LH en seis cobayas cíclicas, donde primero observaron la apertura de la membrana vaginal y definieron al día de la ovulación como día 1 del ciclo. Luego, al día 12 incorporaron mini bombas osmóticas de manera subcutánea (Figura 6) utilizando anestesia en las cobayas, estas mini bombas

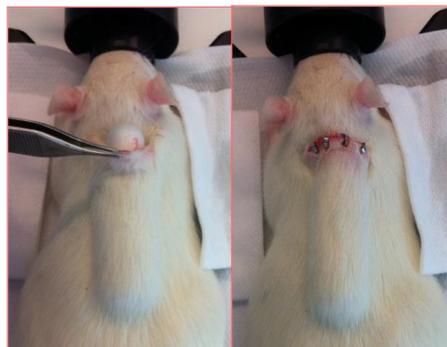


Figura 6: Incorporación de mini bombas osmóticas subcutáneas en animales de laboratorio. Tomado de Alzet, (2014)

contenían 1mg de o-LH suplementada con Solución Buffer Fosfato (PBS). Los resultados que obtuvieron fueron de $5,3 \pm 0,7$ óvulos, en comparación con el grupo control ($2,7 \pm 0,7$ óvulos).

3.3.5.1.2. Gonadotropina coriónica equina (eCG)

Hay diferentes investigaciones que han utilizado eCG para superovulación en cobayas Barahona y Quishpe. (2012) usaron 16 cobayas primerizas y las dividieron en cuatro grupos (3 experimentales y un testigo) para aplicar la hormona en dosis de 10, 20 y 30 UI vía subcutánea, como resultados obtuvieron que la dosis más alta de eCG fue más efectiva, donde observaron un promedio de hasta 5 gazapos nacidos por madre, en comparación con el control que fue de dos. Asimismo, Li et ál. (2015) utilizaron 36 cobayas, donde consideraron la observación de la apertura de la membrana vaginal como primer día del ciclo, luego las cobayas fueron divididas aleatoriamente en tres grupos de 12 animales cada uno; y al día 12 del ciclo aplicaron 20 UI al grupo 1, 50 UI al grupo 2 y solución salina al tercer grupo que correspondía al control. Obtuvieron como resultados que eCG aplicada en el día 12 promueve la luteinización de las células de la granulosa pero no la superovulación en cobayas.

3.3.5.1.3. Gonadotropina coriónica humana (hCG)

Susuki et ál. (2003) aplicaron hCG en cobayas en donde primero observaron diariamente la apertura de la membrana vaginal para establecer el día de la ovulación como día 1. Luego inyectaron de forma subcutánea hCG a una dosis de 5UI/kg/día los días 6,7y 8 (mediados de la fase luteal) y los días 14,15 y 16 (periodo preovulatorio). Una vez que las hembras exhibieron apertura de membrana, fueron juntadas con los machos y a los 4 días después del apareamiento, los embriones fueron colectados mediante *flushing* del útero y oviductos. Como resultados obtuvieron que las tres cobayas que recibieron hCG a mediados de la fase luteal, no mostraron ovulación, mientras que las 10 cobayas que recibieron la dosis en el periodo preovulatorio tuvieron ovulación y fueron juntadas con los machos. El número de ovocitos recuperados de todas las hembras fue alrededor de $5,4 \pm 1,56$.

3.3.5.1.4. Hormona folículo estimulante (FSH)

Al administrar FSH exógena se incrementa la concentración endógena de ésta, lo que favorece el crecimiento folicular, la diferenciación, la maduración y la ovulación, siendo necesario al final de este tratamiento con FSH la administración de una dosis de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de gonadotropina coriónica humana (hCG) para que provoque la ovulación (Edwards et ál., 2005). La hormona FSH purificada (pFSH) es una de las FSH exógenas que se obtiene de la glándula hipofisaria del cerdo, esta posee una vida media corta y

debe ser administrada en intervalos de 12 horas, por lo tanto, se necesita mayor tiempo en su aplicación (Popova et ál., 2002). Es así que el empleo de pFSH se realiza en la mayoría de los protocolos de superovulación tanto en animales de gran tamaño (Cuello et ál., 2004; Duenhas et ál., 2016; Resendiz, 2022; Vega et ál., 2019), así como en pequeños es de distribución mundial (Chang et ál., 2021).

Soares et ál. (1996) investigaron el efecto de diferentes gonadotropinas en la superovulación de cobayas, trataron un total de 60 animales divididos en 10 grupos de 6 hembras cada uno y aplicaron distintas hormonas en dos fases. La primera fase se formó por 6 grupos donde recibieron diferentes tratamientos: eCG (grupo 1), pFSH en dosis única (grupo 2), pFSH en tres dosis (grupo 3), FSH-h (grupo 4), gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Grupo 5) y solución de NaCl al 0,9% (grupo control). De igual manera, la segunda fase se formó por 4 grupos empleando distintos tratamientos a los cuales también se aplicó PGF2 α : 22 UI de FSH-h (grupo 1), 15 UI de FSH-h (grupo 2), hMG (grupo 3) y solución de NaCl al 0,9% (grupo control). Los resultados de la 1° fase indicaron que los primeros tres grupos bloquearon la ovulación, donde pFSH indujo luteinización folicular temprana. Para la 2° fase, hubo superovulación de dos cobayas en los dos grupos de FSH-h.

3.3.6. Desarrollo embrionario

Luego de la ovulación, los ovocitos viajan hacia el ámpula, en 3 a 4 horas a la mitad del oviducto permaneciendo aquí durante 30 horas. Se estima que la fecundación tiene lugar entre 1 y 2 horas (Grégoire, 2012b) 72-84 horas luego de la fertilización se desarrolla un embrión de 8-16 células, el cual alcanza el lumen uterino y se implanta a nivel de los cuernos uterinos alrededor de 144 horas (6 días) (Chavatte-Palmer y Guillomot, 2007). A los 25 días se puede diagnosticar la presencia del embrión a través de la ecografía (Alegría, 2015; Tupiza, 2017).

Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Físicos

- Guantes de nitrilo
- Mandil
- Rasuradora
- Frascos ámbar estériles de 30ml
- Equipo de disección
- Caja de Bisturí N°24
- Bandeja
- Papel secante
- Catéteres 30G
- Jeringas de 1ml, 5ml, 10ml y 20ml
- Marcador permanente
- Tubos Eppendorf
- Fundas de basura
- Cámara
- Esferos
- Libreta de anotaciones

4.1.2. Químicos

- Altrenogest (progestágeno sintético)
- Folltropin (hormona folículo estimulante)
- Fertagyl (Gonadorelina)
- Solución salina taponada de fosfato
- Solución jabonosa de yodo
- Lactato de Ringer

4.1.3. Biológicos

- Cuyes (*Cavia porcellus*): 20 hembras y 4 machos

4.1.4. Laboratorio

- Cajas Petri
- Cajas de búsqueda cuadriculadas
- Platina de calefacción
- Estereomicroscopio
- Gradilla de laboratorio

4.2. Métodos

4.2.1. Área de estudio

La presente investigación se realizó de manera simultánea en la granja de Irquis y en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Cuenca. Este último; está localizado 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 $-79^{\circ}4'31''$), a una altitud de 2.663 m.s.n.m. La precipitación media anual es de 789 mm; las temperaturas oscilan entre 10 y 15 °C (Figura 7).

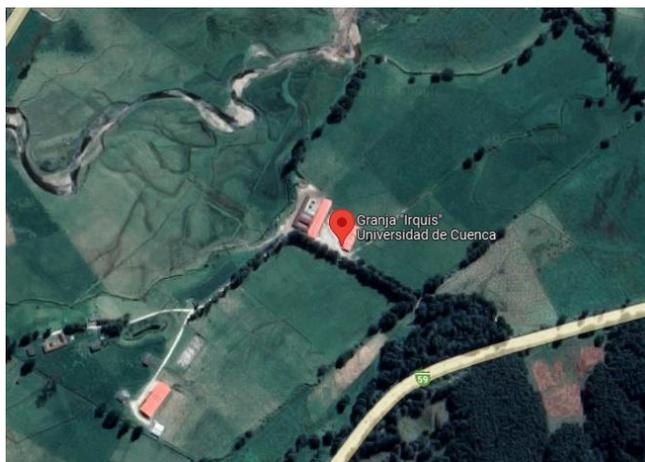


Figura 7: Geolocalización de Granja Irquis de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Tomado de Google maps, 2023.

4.2.2. Preparación de las unidades experimentales

Se utilizó un total de 21 hembras multíparas, con edad promedio de 80 ± 15 días y un peso entre de 780 ± 20 gramos, provenientes de un núcleo de cobayos de diferentes cruces de líneas Perú, Inti y Andina. De estas 21 hembras, una murió y los 20 restantes fueron distribuidas en los tres tratamientos.

Las hembras estuvieron en un periodo de adaptación de diez días, que incluyó un manejo alimenticio similar, que consistió en suministrar un concentrado formulado siguiendo las especificaciones nutricionales para cumplir con el 100% de los requerimientos esta especie según "Guinea Pig Diet 5025, LabDiet, St. Louis, MO" y NRC. (1995). La alimentación fue decreciente con forraje y creciente con el concentrado preparado, hasta que el concentrado se lo administro como única dieta a una ración diaria de 60 gramos para cada animal por día.

Durante este periodo las hembras fueron alojadas en una jaula de 1x1,5 m. Después de este periodo de adaptación, las hembras fueron distribuidas de manera aleatoria en jaulas que estaba dividida en tres secciones, una para cada grupo experimental, cada sección permitió albergar a 3 animales (Anexo A).

Todas las hembras fueron sometidas a un protocolo único de sincronización que consistió en la administración de Altrenogest a una dosis de 0,22 mg/kg, (Regumate®, MSD, España), vía oral durante 15 días. Las hembras sincronizadas fueron aleatoriamente asignadas a los 3 tratamientos o grupos que se describen a continuación:

Grupo 1 (n=7); recibieron 15 UI de pFSH (FSH, Folltropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá), en la mañana y 15 UI en la tarde los días 13, 14 y 15 del protocolo, que fue día del retiro de la fuente de progesterona. Grupo 2 (n=7), después del retiro de P_4 (día 15), recibió la misma dosis de pFSH, 15 UI en la mañana y 15 UI en la tarde los días 15, 16 y 17. Grupo 3 (n=6) no recibió ninguna dosis de pFSH, considerado el grupo control (Figura 8).

Asimismo, 12 horas después de la última administración de pFSH las hembras de los grupos 1 y 2 recibieron una dosis de 30 UI de hormona liberadora de gonadotropinas (Gonadorelina, Fertagyl MSD Salud Animal, S.A. de C.V, México) por vía intraperitoneal, para estimular la ovulación en todos los folículos.

El día del retiro del progestágeno (día 15), se introdujo al macho en una relación de 1:1 para favorecer la monta y asegurar la fertilización; además, desde el retiro de P_4 a todas las hembras

se les revisó diariamente la apertura de la membrana vaginal, que fue la referencia para determinar el inicio de celo y el apareamiento.

Luego de 96 ± 24 horas (4 ± 1 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), se valoró el número y diámetro de folículos normales y cuerpos lúteos.

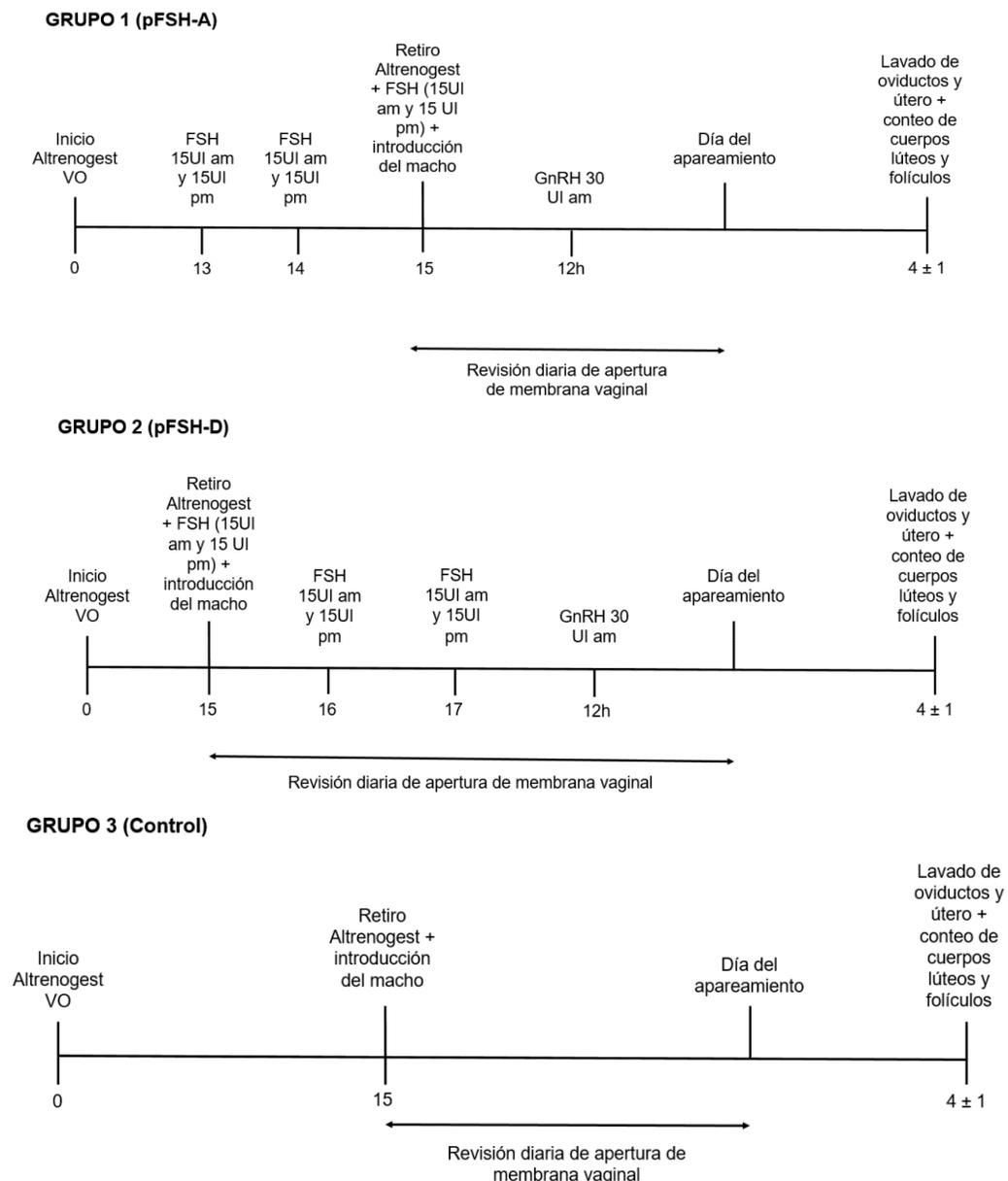


Figura 8: Unidades experimentales. Aplicación de pFSH antes del retiro de P_4 (Grupo 1; pFSH-A). Aplicación de pFSH después del retiro de P_4 (Grupo 2; pFSH-D). Grupo sin aplicación de pFSH (Grupo 3; control).

4.2.3. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal

Se inició el monitoreo de la apertura de membrana vaginal (Figura 11; Anexo B) a partir del día 15 para todos los grupos, después de la última administración de P₄ (6:30 am); en el caso del grupo 1, una vez administrada la P₄, se colocó la dosis intraperitoneal de pFSH, posteriormente se revisó la apertura de la membrana y finalmente los machos fueron ubicados en las respectivas jaulas. Asimismo, en la tarde nuevamente se revisó la apertura de la membrana (6:30 pm). Para este procedimiento se siguió la metodología propuesta por Wilson et ál. (2021), que 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” (Figura 9C y 9D); al visualizar la apertura de la membrana vaginal, se registró la fecha y la hora en la que se observó por primera vez perforada.

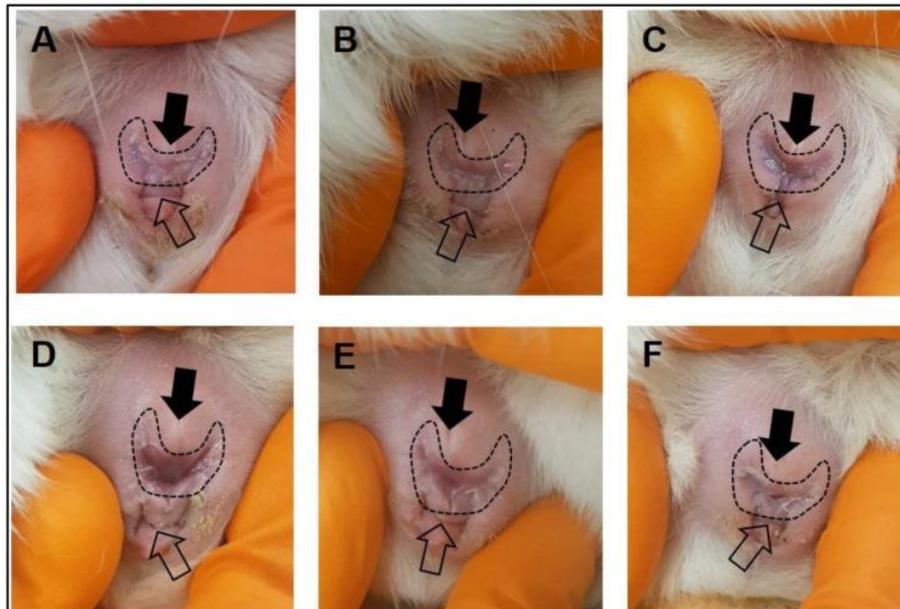


Figura 9. Monitoreo de la apertura de la membrana vaginal (AMV) en cobayas. Durante el periodo del ciclo estral la membrana se encuentra cerrada (A, B). La membrana cambia de color y empieza a perforarse cuatro a cinco días antes de ovulación (C). Al momento de ovulación, la membrana se perfora y aumenta las secreciones vaginales de moco (D). La membrana se empieza a cerrar después de la ovulación (E, F). Tomado de Wilson et al., (2021).



Figura 10: Revisión de la apertura de la membrana vaginal. A: membrana vaginal abierta. B: membrana vaginal cerrada. Fuente: propia.

4.2.4. Administración de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

Para la administración de estas dos hormonas se utilizó la vía intraperitoneal siguiendo la metodología desarrollada por Turner et ál. (2011) y consistió en colocar al animal en posición decúbito dorsal, con su cabeza ligeramente inclinada hacia abajo (esto ayuda a desplazar los órganos abdominales, evitando así la perforación de los mismos) (Figura 11). Se localiza la cavidad peritoneal en el cuadrante inferior del abdomen, lateral a la línea media, y se inserta la aguja en un ángulo de 45° con respecto a la piel, una vez administrada la dosis se da un suave masaje en la zona.

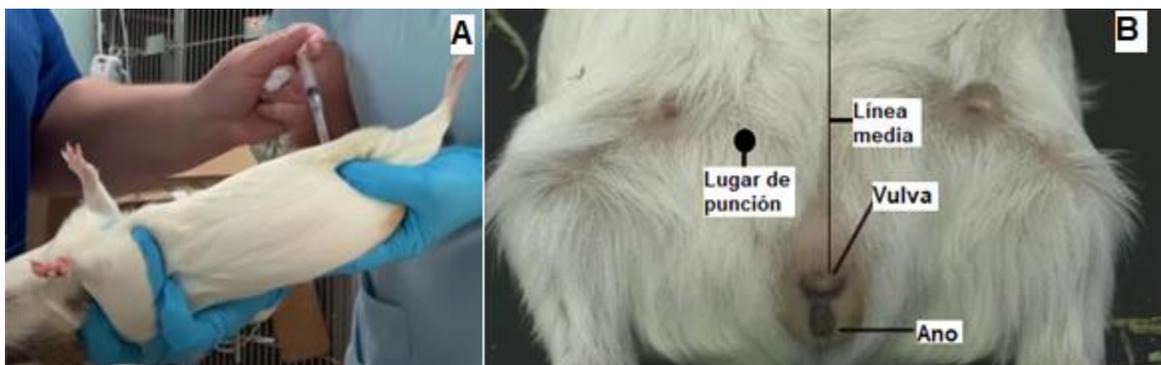


Figura 11: Inyección intraperitoneal en cobayas (*Cavia porcellus*): ubicación del animal (A) y lugar de inyección (B). Adaptado de Kilgallon, (2020); Meara, (2009).

4.2.5. Lavado de oviducto, útero y recuperación de estructuras

Todas las hembras fueron sacrificadas 96 ± 24 horas 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 (Euthanex®, INVET, Colombia). El principal efecto de este fármaco es muerte cerebral junto con paro respiratorio y colapso circulatorio (Litter, 2015).

Para el lavado del tracto reproductor se siguió la metodología descrita por Susuki *et al.* (2003) que consistió brevemente en rasurar la zona del abdomen y desinfectar con una solución jabonosa de yodo, luego colocar a las hembras en decúbito dorsal y realizar una incisión de 4 cm a lo largo de la línea alba para localizar el tracto reproductivo y extraer el útero y los ovarios (Anexo C). 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. (Anexo D).

Para el lavado de los oviductos y útero se utilizó la misma de solución salina buferada de fosfato. Las estructuras se recolectaron mediante un flushing de los oviductos y cuernos uterinos (Figura 12; Anexo E). Este procedimiento consistió en localizar la zona del infundíbulo, abrirlo e introducir una aguja hipodérmica 30 G (0,30 mm de diámetro), fijar la aguja y adaptarla a una jeringa para lavar por tres ocasiones, este mismo procedimiento se realizó en los cuernos uterinos.

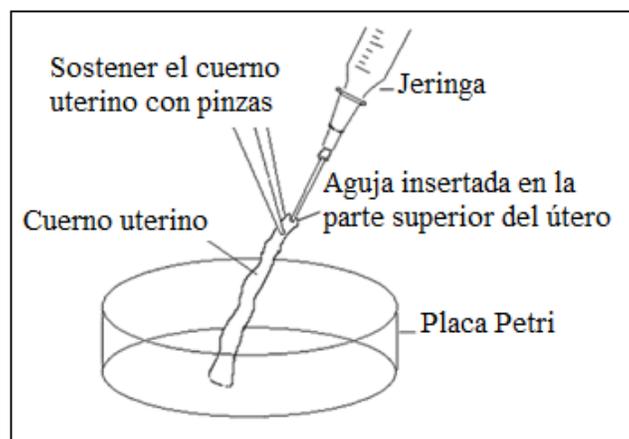


Figura 12: Metodología de Flushing de los cuernos uterinos en animales de laboratorio. Adaptado de Deb, Reese, & Paria, (2006)

4.2.6. Evaluación del desarrollo y calidad de estructuras colectadas

La valoración y clasificación morfológica de las estructuras se basó en la metodología descrita por Shi et ál. (2000), que consistió en evaluar las estructuras bajo la luz de un estereomicroscopio con un lente de aumento de 50 a 100x (Anexo F), y clasificarlas en primera instancia en ovocitos sin fecundar y embriones.

Luego, de la primera clasificación, se evaluó al embrión 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, 1944; Seidel, 1998), y adaptándolas a nuestro estudio; según las indicaciones de Shi et ál. (2000) y Suzuki et ál. (1993) en estructuras aptas y no aptas.

4.2.7. Volumen ovárico, número y diámetro de folículos y cuerpos lúteos

Los ovarios recuperados fueron colocados sobre un papel milimétrico y medidos bajo el lente de un estereomicroscopio (50 a 100x OLYMPUS SZ61) (Anexo G). Y se procedió a tomar fotografías de estos para posteriormente medir con mayor precisión en un programa informático (ImageJ, Java; Anexo I).

Para valorar la respuesta al tratamiento superovulatorio, se cuantificó el número y se midió y el diámetro de los cuerpos lúteos y folículos en la superficie ovárica (Anexo H). En este mismo sentido, se valoró el diámetro de cada ovario recuperado y determinar el volumen ovárico en mm^3 , para esto se utilizó la metodología descrita por (Penitente-Filho et ál., 2015), que consistió en medir el ovario en tres planos (largo, ancho y profundidad) como se puede observar en la Figura 13 y posterior aplicar la siguiente formula: **Volumen ovárico (mm^3) = 0,5 x D1 x D2 x D3.**

Finalmente, para hallar el diámetro del cuerpo lúteo y folículos fueron medidos en dos planos (largo x ancho, Figura 14), y se obtuvo mediante la media aritmética de ambas medidas: **Diámetro (mm) = (D1+D2) / 2** y expresado en mm (Penitente-Filho et ál., 2015).

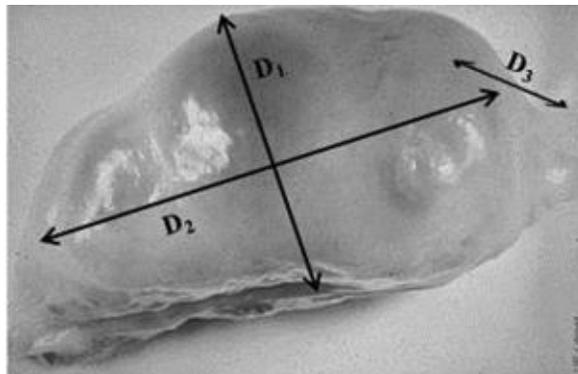


Figura 14. Esquemización de la medición del volumen ovárico. Tomado de Penitente-Filho et al., (2015)

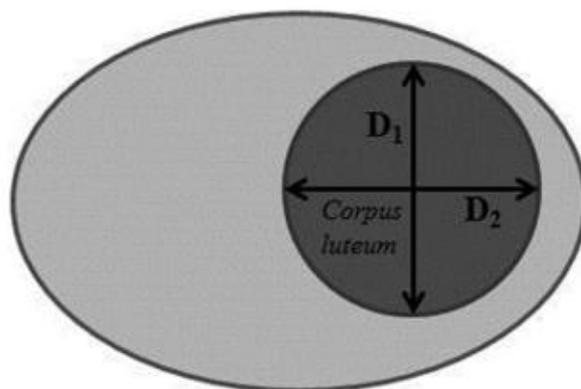


Figura 13. Esquemización de la medición del diámetro del cuerpo lúteo. Adaptado de Penitente-Filho et al., (2015)

4.2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base en Excel, y posteriormente se analizaron mediante el paquete estadístico STATISTICAS® 12.0 (StatSolf, Tulsa, Oklahoma, EE. UU.). Se realizó una prueba de Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos numéricos de todas las variables (muestra menor a 50). Los efectos de la administración de la hormona folículo estimulante porcina (p-FSH) sobre la respuesta (número de cuerpos lúteos, folículos y estructuras recolectadas) y características morfométricas ováricas (diámetro de cuerpos lúteos y folículos y volumen ovárico) se analizaron mediante un análisis ANOVA y para determinar las diferencias entre grupos, se utilizó la prueba Post-Hoc de 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 $P < 0,05$.

Resultados

5.1. Clasificación morfológica de las estructuras recuperadas

Inmediatamente después del lavado del útero y oviductos, se procedió a valorar y clasificar morfológicamente las estructuras recuperadas (Tabla 2). En total se obtuvieron 5 estructuras de las 20 hembras a las que se aplicó el protocolo sincronización y superovulación; las 5 estructuras colectadas pertenecieron al grupo control, de estas 3 fueron clasificadas como embriones aptos.

Tabla 2: Clasificación de estructuras recuperadas después del lavado.

<u>Tratamientos</u>	<u>n</u>	<u>T. Est.</u>	<u>Tipo. Est.</u>				<u>Cal. Est</u>		<u>Cla. Est.</u>	
			<u>UFO</u>	<u>M</u>	<u>B</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>NA</u>		
<u>pFSH-A</u>	<u>7</u>	<u>0</u>	-	-	-	-	-	-	-	
<u>pFSH-D</u>	<u>7</u>	<u>0</u>	-	-	-	-	-	-	-	
<u>Control</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	-	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	

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

5.2. Respuesta ovárica de cobayas sincronizadas y superovuladas

Las diferentes características de las hembras en las que se incluyen apertura de la membrana vaginal, número y diámetro de estructuras ováricas se resumen en la tabla 3. A la revisión de apertura de membrana vaginal (AMV) de todas las cobayas después del retiro de la fuente de progesterona, mostraron AMV a las $52,80 \pm 30,75$ horas que fue considerado como el día de inicio del celo (Tabla 3).

Tabla 3: Valores medios y desviación estándar de las distintas variables sobre la respuesta ovárica de las cobayas sincronizadas y superovuladas con hormona pFSH.

Variables	n	X±DE	95% Intervalo de confianza	
			Inferior	Superior
AMV-P ₄ (horas)	20	52,80 ± 30,75	38,41	67,19
AMV-pFSH (horas)	14	86,57 ± 37,70	64,80	108,34
VO (mm ³)	20	32,43 ± 14,13	25,81	39,05
FOLs	20	6,35 ± 6,97	3,08	9,61
D-FOLs (mm)	20	0,435 ± 0,256	0,31	0,55
CLs	20	2,15 ± 1,30	1,53	2,76
D-CLs (mm)	20	0,475 ± 0,234	0,36	0,58

n=Número total de hembras. **AMV-P₄**= Horas transcurridas desde el retiro de la fuente de progestágeno hasta la apertura de la membrana vaginal (AMV). **AMV-pFSH**= Número de horas transcurridas desde la aplicación de pFSH hasta AMV. **VO**= Volumen ovárico. **FOLs**= Total de folículos encontrados. **D-FOLs**= Diámetro folicular. **CLs**= Total de cuerpos lúteos encontrados. **D-CLs**= Diámetro de cuerpos lúteos.

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 3. Durante la evaluación de la apertura de la membrana vaginal después del retiro de la fuente de progesterona, todas las hembras de los tres tratamientos respondieron en periodos de tiempo similares, sin presentar diferencias significativas entre las mismas (pFSH-A 58,29 ± 11,54, pFSH-D 61,71 ± 11,54 y C 36,00 ± 12,00 horas $p > 0,05$, Figura 15 A), sin embargo, a la revisión de la apertura de la membrana vaginal post aplicación de la hormona pFSH, las hembras del grupo pFSH-A presentaron la AMV en mayor tiempo en comparación con el grupo pFSH-D (111,43 ± 10,04 vs. 61,71 ± 11,54 horas; $p < 0,05$, Figura 15 B).

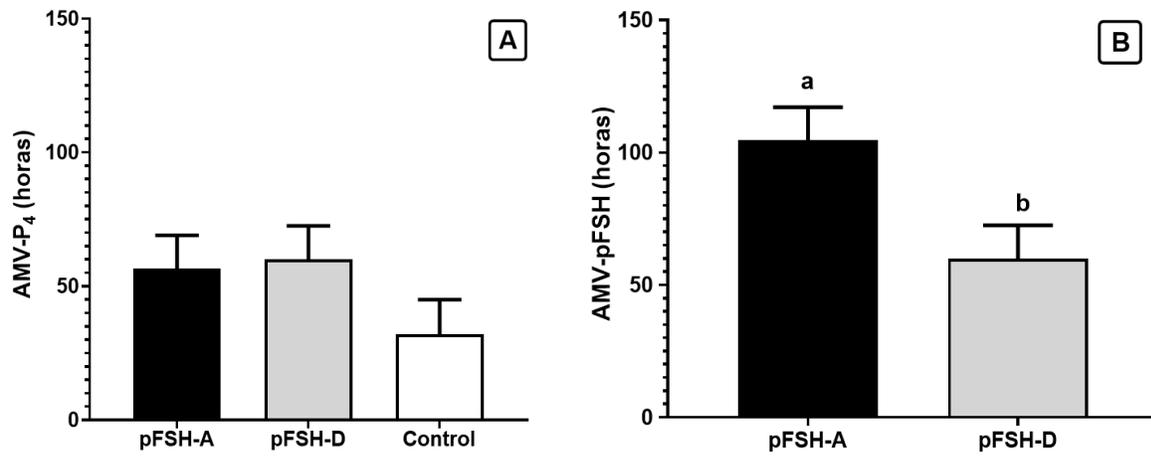


Figura 15. Periodo de tiempo de la apertura de la membrana vaginal de cobayas desde el retiro de la fuente de progesterona (Altrenogest) hasta la manifestación de celo (Figura 14 A.) Monitoreo de la apertura de membrana vaginal de cobayas desde el inicio de la aplicación del tratamiento con hormona folículo estimulante porcina (pFSH) hasta la manifestación de celo (Figura 14 B). Grupo pFSH-A: cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de pFSH antes del retiro de la fuente progesterona. Grupo pFSH-D: cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de pFSH después del retiro de la fuente progesterona. Grupo Control: cobayas sin aplicación de pFSH. Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$)

La evaluación de las características morfométricas de ambos ovarios demostró que el valor medio del volumen ovárico de todas las hembras del estudio fue de $32,43 \pm 14,13 \text{ mm}^3$. Asimismo, las hembras de ambos grupos que recibieron pFSH tuvieron un volumen ovárico similar entre ellos y presentaron un volumen mayor en comparación con el grupo control (pFSH-A $41,20 \pm 6,83$, pFSH-D $32,79 \pm 3,36$ vs. C $21,78 \pm 2,15 \text{ mm}^3$; $p < 0,05$ Figura 16).

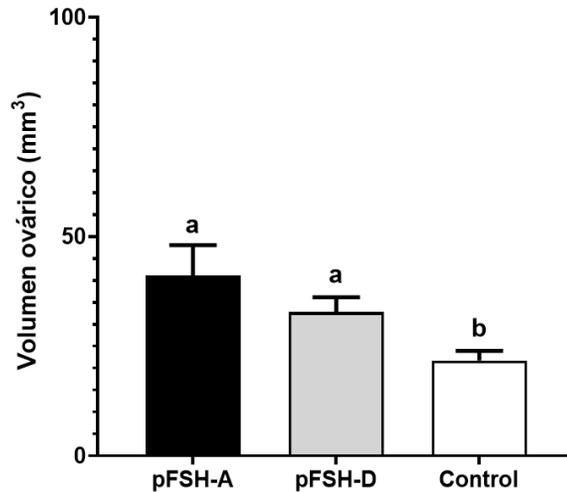


Figura 16. Volumen ovárico en mm^3 (VO) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con pFSH. Grupo pFSH-A: cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de pFSH antes del retiro de progesterona. Grupo pFSH-D: cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de pFSH después del retiro de progesterona. Grupo Control: cobayas sin aplicación de pFSH. Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos ($a-b$ $p < 0,05$).

El número total de folículos observados al momento del sacrificio de las cobayas no fue diferente entre las hembras de los tres tratamientos (pFSH-A $7,71 \pm 3,88$; pFSH-D $8,57 \pm 1,6$; Control $2,16 \pm 0,98$; $p > 0,05$, Figura 17 A), a pesar de observar un mayor número de folículos en ambos grupos que recibieron pFSH en comparación con el grupo control. Sin embargo, al observar el diámetro de folicular, se determinó que las hembras a las que se les administró pFSH antes y después del retiro de la fuente de progesterona tuvieron un diámetro similar entre ellas y mayor en comparación con el grupo control (pFSH-A $0,51 \pm 0,09$; pFSH-D $0,49 \pm 0,09$ vs. Control $0,27 \pm 0,08$ mm; $p < 0,05$, Figura 17 B).

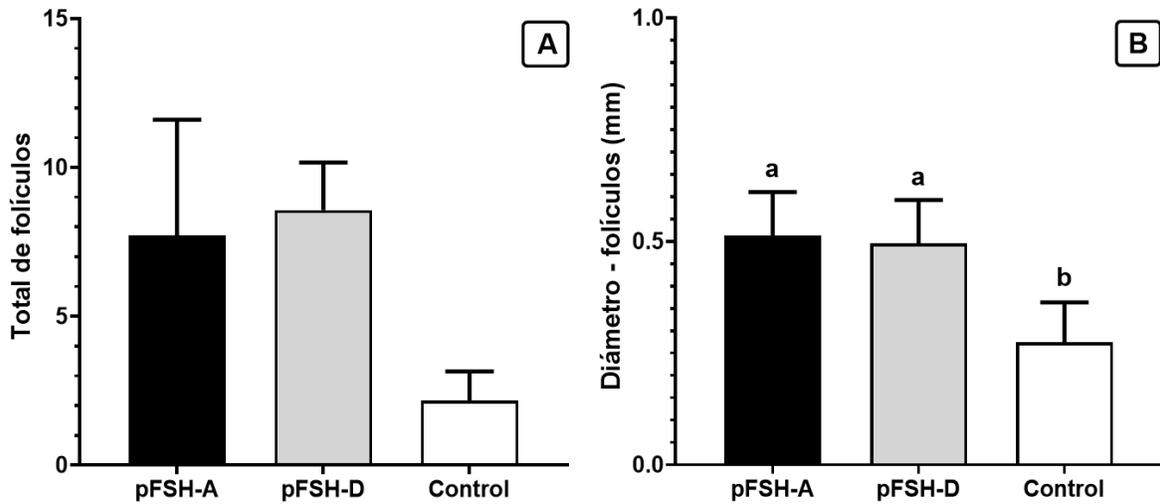


Figura 17. Número total de folículos (panel A) y diámetro folicular (panel B) de cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con pFSH. Grupo pFSH-A: cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de pFSH antes del retiro de progesterona. Grupo pFSH-D: cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de pFSH después del retiro de progesterona. Grupo Control: cobayas sin aplicación de pFSH. Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$).

El número total de cuerpos lúteos (CLs) encontrados en la evaluación de los ovarios después del sacrificio no difirió entre los tratamientos (pFSH-A $1,85 \pm 0,45$; pFSH-D $1,71 \pm 0,52$; Control $3 \pm 0,44$; $p > 0,05$ Figura 18 A). Asimismo, no se reportó ninguna diferencia significativa entre tratamientos para la variable diámetro de cuerpos lúteos (pFSH-A $0,47 \pm 0,09$; pFSH-D $0,35 \pm 0,09$; Control $0,61 \pm 0,04$ mm; $p > 0,05$, Figura 18 B).

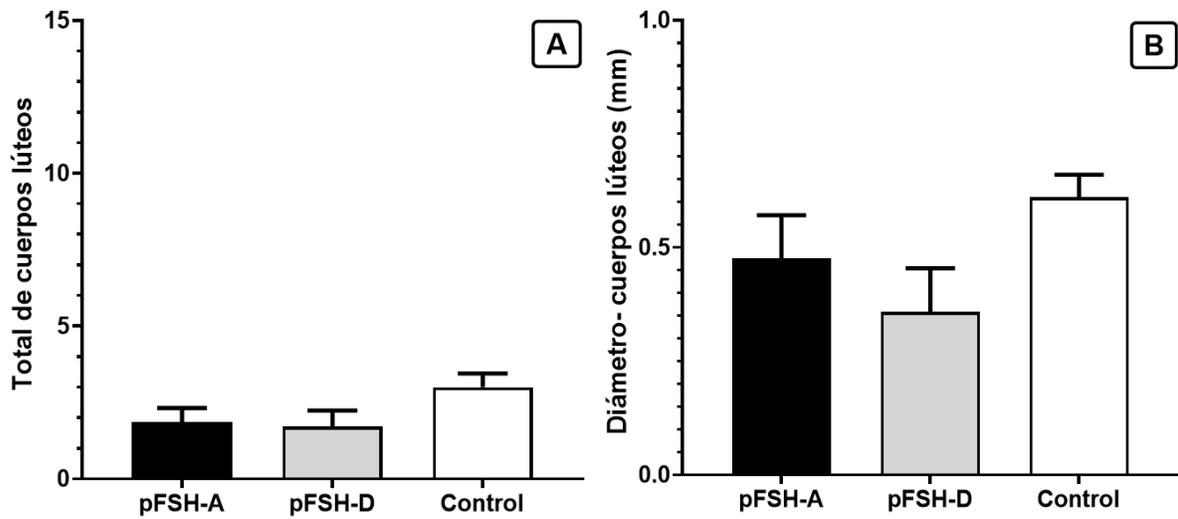


Figura 18: Número total de cuerpos lúteos (panel A) y diámetro de cuerpos lúteos (panel B) en cobayas sometidas a un tratamiento de superovulación con pFSH. Grupo pFSH-A: cobayas a las que se les aplicó diferentes dosis de pFSH antes del retiro de progesterona. Grupo pFSH-D: cobayas a las que se le aplicó diferentes dosis de pFSH después del retiro de progesterona. Grupo Control: cobayas sin aplicación de pFSH. Diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas entre los grupos (a-b $p < 0,05$).

Discusión

Los resultados de la presente investigación indican que la administración intraperitoneal de pFSH antes o después del retiro de la fuente de progesterona como parte de un protocolo de sincronización y superovulación, no tuvo efecto sobre la respuesta ovárica en las cobayas y, por ende, tampoco sobre calidad, tipo y número de estructuras recuperadas. No obstante, a pesar de no tener un efecto sobre la respuesta ovárica, si se observaron variaciones en las características morfológicas del ovario, específicamente en el volumen ovárico, que se explica por un diámetro mayor de los folículos en los grupos de pFSH, en comparación con el grupo control.

Se obtuvo un total de cinco estructuras del grupo control, estos se encontraron en un estadio de desarrollo de mórula, y se obtuvieron en el día 4 ± 1 (96 ± 24 horas); después 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. Este periodo de tiempo concuerda con los trabajos de Chavatte-Palmer y Guillomot. (2007) donde afirmaron que en cobayas se pueden observar embriones a partir de 8 células cuando se realiza el *flushing* de los cuernos uterinos a los 3,5 días post-fertilización. No obstante, otros estudios sugieren que las estructuras pueden visualizarse a partir de 1 hasta el 5 días después de la copulación (Takahashi y Division, 1999) y obtener embriones en estadios de desarrollo de entre dos a ocho células hasta mórulas de 16 a 32 células (Dorsch, Glage, y Hedrich, 2008; Cañón, 2018). Por lo tanto, el día de lavado de oviductos y útero en nuestro estudio se encontró dentro de una ventana de tiempo adecuado para obtener estructuras antes de la implantación.

Reed y Hounslow. (1971) demostraron que la administración de FSH humana (FSH-h) en cobayas (4UI/animal) en dosis única, cuatro días antes de la siguiente ovulación; generó un aumento en el número y tamaño de folículos maduros en comparación con los animales no tratados, sin embargo, no observaron una respuesta superovulatoria satisfactoria, que fue medida en el número de estructuras colectadas y de cuerpos lúteos observados, lo que indica que el tratamiento con FSH no tiene efecto en inducir la ovulación. Al igual que en el estudio mencionado, no se logró recuperar ninguna estructura de los grupos a los que se les administró la hormona (pFSH-A y pFSH-D) a pesar de que la dosis utilizada fue mayor (30 UI/animal).

La administración de pFSH en ratas, a una dosis de 2,5 UI totales mediante bombas de infusión por un periodo de 60h (1 UI/día) en comparación con inyecciones subcutáneas dos veces al día (0,5 UI cada una), demostró tener una mejor respuesta superovulatoria ya que respondieron todas las hembras sometidas al tratamiento por bombas de infusión (8/8) obteniéndose una media de 67 ± 10 estructuras recuperadas por rata, de los cuales 51 ± 8 fueron mórulas y blastocistos de apariencia normal, mientras que con el tratamiento de inyecciones múltiples se obtuvo respuesta en solo 2/8 ratas; lo que sugiere que para lograr un crecimiento folicular adecuado y por ende una mejor respuesta superovulatoria, se debe mantener niveles altos y constantes de FSH en sangre (Armstrong y Opavsky, 1988). En general la vida media de la FSH en sangre es de aproximadamente de 2 a 4 horas (Obregón, 2009), mientras que la pFSH (Folotropin-V) utilizada en el presente estudio, tiene una vida media de 5 horas y es indetectable en el flujo sanguíneo 12 horas después de la inyección (Cimavet, 2017). Por lo tanto, sería adecuada la administración de una tercera dosis por día con un intervalo de tiempo menor, y así lograr que los niveles de FSH se mantengan altos por un periodo de tiempo más largo. Sin embargo, para hacer esta afirmación es necesario el desarrollo de más estudios específicos que confirmen esta hipótesis.

Otros trabajos realizados en ratas indican que pFSH combinado en pequeñas dosis de hCG, incrementan significativamente la respuesta superovulatoria (Armstrong et ál., 1989; Hamilton y Armstrong, 1991), esta mejor respuesta obtenida por la combinación de pFSH y hCG se debe a que en los estudios mencionados, la preparación de pFSH utilizada tenía poca actividad de LH (<0,01%) y la LH endógena de los animales reflejaba ser inadecuada para generar la sinergia requerida para permitir la superovulación; por lo que pequeñas dosis de hCG ayudarían al aumento de la actividad de LH superando así la deficiencia de la misma (Armstrong et ál., 1989). Así también, en comparación con LH, hCG se podría considerar más efectiva por una vida media más prolongada (8 a 12 horas) que LH (30 minutos) (Filicori, 2011; Barahona y Quishpe, 2012). Por lo tanto, se podría probar tratamientos de pFSH en combinación con otras hormonas en cobayas para estudios posteriores.

En nuestro estudio, para la valoración de la apertura de la membrana vaginal (AMV) se tomó como referencia el momento de la aplicación de la hormona pFSH y el momento del retiro de la fuente de progesterona. Los resultados de la evaluación de la AMV confirmaron que la administración de pFSH podría tener un efecto sobre AMV. Las hembras a las que

se les aplicó FSH antes del retiro de la fuente de progesterona (pFSH-A) presentaron la AMV en un tiempo mayor ($111,43 \pm 10,04$ vs. $61,71 \pm 11,54$ para pFSH-D), lo que explica el estradiol producido por los folículos en desarrollo influye en la manifestación de la conducta estral, y este desarrollo pudo ser inhibido por niveles altos de progesterona en este grupo (pFSH-A) lo que ocasionó un retraso del crecimiento de folículos, específicamente antrales y preovulatorios y por ende fue necesario mayor tiempo para mostrar conducta estral (Labhsetwar y Diamond, 1970; Long et ál., 2021); los folículos antrales y preovulatorios tienen el desarrollo de más receptores de LH, lo que hace adquiera mayor respuesta a la misma y reduzca la dependencia de FSH (Zelevnik, 2004). Sin embargo la secreción de P_4 induce retroalimentación negativa a la hipófisis, disminuyendo así la frecuencia de pulso de GnRH y por lo tanto de LH (Skinner, Caraty, y Allingham, 2001). Lo que explica el bloqueo del desarrollo de los folículos preovulatorios, sugiriendo así que el desarrollo folicular está regulado por los niveles de progesterona circulante (Telfer, Gosden, y Faddy, 1991). No obstante, al valorar la AMV desde el retiro de la fuente de progesterona sin considerar la administración de FSH, todas las hembras mostraron AMV a las $52,80 \pm 30,75$ ($2,1 \pm 1,4$ días), resultados que concuerdan con los publicados en otros estudios en los que se administró por 15 días un progestágeno sintético (altrenogest) a una dosis de 0,22 mg/kg (Grégoire et ál., 2012a; Ferrin y Murudumbay, 2022).

Las características morfológicas de los ovarios pueden verse afectadas por algunos factores fisiológicos y patológicos (Fernández et ál., 2022; Pilny, 2014). Se ha observado que la administración de altas dosis de hormonas gonadotrópicas hipofisarias (por ejemplo FSH) y no hipofisarias (eCG) puede ocasionar un cambio en algunas características ováricas, 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 (Reviere y Mauléon, 1973; Li et ál., 2015).

En nuestro estudio se observó que las características morfológicas del ovario presentaron variaciones en cuanto al volumen, es decir, que la administración de pFSH provocó un aumento en el volumen ovárico. Estos resultados guardan similitud con el estudio de Wei et ál. (2017), quienes observaron un mayor tamaño de los ovarios de ratones sometidos a un tratamiento con pFSH a una dosis de 20UI, en comparación con el grupo control en el que administraron 0,5 ml de solución salina (pFSH $0,352 \pm 0,081 \mu\text{m}$ vs. Control $0,290 \pm 0,018 \mu\text{m}$). Estas variaciones observadas en nuestro estudio en cuanto al volumen ovárico como consecuencia de la administración de 30UI de FSH diaria en comparación con

aquellas hembras sin estimulación hormonal, estarían relacionadas principalmente con cambios en los componentes somáticos de los folículos durante la fase de previa a la ovulación, como fenómenos de crecimiento y diferenciación folicular (Richards, 1980).

Asimismo, otra evidencia para un mayor volumen ovárico debido a la administración de pFSH sería que esta hormona promueve la proliferación y diferenciación de folículos pre-antrales en sus primeras etapas de desarrollo, induciendo así el crecimiento y maduración de los folículos, pero sin generar una respuesta superovulatoria (Candelaria, Rabaglino, y Denicol, 2020; Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006). Sin embargo, el volumen ovárico de todas las hembras se encontró dentro del rango de 6-36 mm³ (3-6 mm x 2-4 mm x 2-3 mm) para cobayas (Hargaden y Singer, 2012).

La administración de 30 UI de pFSH no influyó estadísticamente sobre el número de folículos; sin embargo, el diámetro de estos se vio afectado, siendo este mayor en las cobayas tratadas con pFSH que en las de grupo control (pFSH-A $0,51 \pm 0,09$; pFSH-D $0,49 \pm 0,09$ vs. Control $0,27 \pm 0,08$), lo que sugiere que la aplicación de pFSH podría mejorar el tamaño del folículo preovulatorio sin tener un efecto superovulatorio. Como se mencionó anteriormente, la FSH induce la maduración de los folículos, esto lo hace a través del receptor FSH-R que se encuentra específicamente en las células de la granulosa de folículos pre-antrales (Wang et ál., 2020) y antrales (Ferreira et ál., 2020); además, la FSH ayuda a la proliferación de las células de la granulosa impidiendo así la atresia folicular (Franco y Uribe, 2012; Fortune, 2003).

Con relación al número y diámetro de los cuerpos lúteos (CLs), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de pFSH y control. El número de CLs observados fue similar al estudio de Aranibar & Echevería, (2014) donde encontraron $2,8 \pm 0,9$ en cobayas de la raza Perú, es decir, el número de CLs fueron el reflejo de la cantidad de folículos que llegaron a ovular, y como se dijo anteriormente, el tratamiento con pFSH en la cobaya no ocasionó un aumento en el número de folículos.

Conclusiones

La administración intraperitoneal de una dosis total de 90 UI de la hormona folículo estimulante porcina (pFSH) antes y después del retiro de una fuente de progesterona (P_4) en cobayas sincronizadas no causó un efecto sobre el número y diámetro de cuerpos lúteos; y por consiguiente sobre el número, tipo y calidad de estructuras recuperadas.

La aplicación intraperitoneal diaria de 30 UI de pFSH, pudo influir en que las hembras demostraran conducta estral (celo) en un periodo de tiempo más corto.

La administración de pFSH a cobayas ocasionó una modificación del diámetro folicular y volumen ovárico, lo que sugiere que la administración de pFSH como parte del tratamiento de superovulación pudiera alterar la morfología.

Referencias

- Alegría, R. A. (2015). *Caracterización de la función vascular de un modelo de restricción de crecimiento intra-uterino por oclusión progresiva de arterias uterinas en cobayas* [tesis de pregrado, Universidad de Chile]. Repositorio académico de la Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131855>
- Aliaga, L., Moncayo, R., Rico, E., y Caycedo, A. (2009). *Producción de cuyes* (1.^a ed.). Universidad Católica Sedes Sapientiae.
- Alzet. (2014). *Alzet osmotic pumps*. Consultado el 20 de febrero del 2023. <https://epos.myesr.org/posterimage/esr/ecr2014/121163/mediagallery/538676?deliveroriginal=1>
- Araníbar, E., y Echevería, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estrual en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 25(1), 29–36.
- Armstrong, D. T. y Opavsky, M. A. (1988). Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone [Superovulación de ratas inmaduras por infusión continua de la hormona folículo estimulante]. *Biology of Reproduction*, 39(3), 511–518. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.3.511>
- Armstrong, D. T., Siuda, A., Opavsky, M. A. y Chandrasekhar, Y. (1989). Bimodal effects of luteinizing hormone and role of androgens in modifying superovulatory responses of rats to infusion with purified porcine follicle-stimulating hormone [Efectos bimodales de la hormona luteinizante y el papel de los andrógenos en la modificación de las respuestas de superovulación de ratas a la infusión con la hormona folículo estimulante porcina purificada]. *Biology of Reproduction*, 41(1), 54–62. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.1.54>
- Ataucusi, S.(2015). *Manejo técnico de la crianza de cuyes en la sierra del Perú*. (1.^aed).Perú: Cáritas del Perú. <https://draapurimac.gob.pe/sites/default/files/revistas/MANUAL%20CUY%20PDF.pdf>
- Aucapiña, C. y Marín, Á. (2016). *Efecto de a extirpación de las espículas del glande del cuy como técnica de esterilización reproductiva y su influencia en agresividad y ganancia de peso en comparación con un método químico (alcohol yodado 2%)* [Tesis de

pregrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional UCUENCA. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24782/3/1.TESIS%20CUYES.pdf>

Avilés, D. F., Martínez, A. M., Landi, V. y Delgado, J. V. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*): un recurso andino de interés agroalimentario. *Recursos Genéticos Animales*, 55, 87–91. <https://doi.org/10.1017/s2078633614000368>

Barahona, C. y Quishpe, O. (2012). *Inducción de superovulación en cobayas primerizas, usando gonadotropina sérica con tres dosis diferentes* [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Digital UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/653>

Bland, K. P. (1980). Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle [Crecimiento folicular bifásico en el ciclo estral de la cobaya]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60(1), 73–76. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600073>

Briscoe, T. A., Rehn, A. E., Dieni, S., Duncan, J. R., Wlodek, M. E., Owens, J. A. y Rees, S. M. (2004). Cardiovascular and renal disease in the adolescent guinea pig after chronic placental insufficiency [Enfermedad cardiovascular y renal en la cobaya joven tras una insuficiencia placentaria crónica]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191(3), 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.01.050>

Candelaria, J., Rabaglino, M. y Denicol, A. (2020, noviembre). Ovarian preantral follicles are responsive to FSH as early as the primary stage of development [Los folículos preantrales ováricos responden a FSH en la primera etapa de desarrollo]. *Journal of Endocrinology*, 247(2), 153-168. <https://doi.org/10.1530/JOE-20-0126>

Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y., García-García, R., Lorenzo, P., Rebollar, P. y Arias-Álvarez, M. (2015). Effect of epidermal growth factor on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of guinea pig oocytes [Efecto del factor de crecimiento epidérmico en la maduración nuclear y citoplasmática in vitro de ovocitos de cobayas]. *Developmental Biology and Physiology of Reproduction*, 72(1), 793. https://www.researchgate.net/publication/330144360_Effect_of_epidermal_growth_factor_on_nuclear_and_cytoplasmic_in_vitro_maturation_of_guinea_pig_oocytes

Cañón, K. (2018). *Caracterización del sistema EGF e IGF-1 en el ovario y su papel en la*

maduración in vitro de los oocitos de cobaya [Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid]. Repositorio Institucional de la UCM. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/50025/1/T40613.pdf>

Cerna, C., Deza, E. y Lluén, B. (1995). *Reproducción de los animales domésticos*. (1.ª ed). Perú: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Chang, A. M., Chen, C. C., Hou, D. L., Ke, G. M. y Lee, J. W. (2021). Effects of a recombinant gonadotropin-releasing hormone vaccine on reproductive function in adult male ICR mice [Efectos de una vacuna de la hormona liberadora de gonadotropinas recombinante sobre la función reproductiva en ratones ICR macho adultos]. *Vaccines*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080808>

Chauca, C. E. (2021). *Evaluación de parámetros zootécnicos de gazapos de cobayos en producción con la aplicación de gazaperas* [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana]. Repositorio Institucional de la UPS. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/21486>

Chauca de Saldivar, L. (1997). *Producción de cuyes (Cavia porcellus)*. FAO. Consultado el 20 de febrero del 2023. https://redmujeres.org/wp-content/uploads/2019/01/produccion_cuyes.pdf

Chavatte-Palmer, P. y Guillomot, M. (2007). Comparative implantation and placentation [Implantación comparativa y placentación]. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 64(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000101742>

Cimavet. (2017). *Folltropin 700 UI polvo y disolvente para solución inyectable*. Departamento de medicamentos veterinarios. Consultado el 7 de marzo del 2023. https://www.vetoquinol.es/sites/spcountry/files/ft_1604_esp_folltropin.pdf

Cuello, C., Gil, M., Parrilla, I., Martínez, C., Roca, J. y Martínez, E. (2004). *Efecto de la superovulación de cerdas Duroc multíparas con eCG sobre la respuesta ovárica y desarrollo embrionario el día 6 de gestación*. Universidad de Murcia. Consultado el 20 de febrero del 2023. http://academiadeporcino-msdanimalhealth.com/Repropig9/assets/resources/9_Superovulacion.pdf

Deb, K., Reese, J. y Paria, B. C. (2006, febrero). Methodologies to study implantation in mice [Metodologías para estudiar la implantación en ratones]. *Methods in Molecular*

Medicine, 121, 9–34. <https://doi.org/10.1385/1-59259-983-4:007>

Dorsch, M. M., Glage, S. y Hedrich, H. J. (2008). Collection and cryopreservation of preimplantation embryos of *Cavia porcellus* [Recolección y crioconservación de la preimplantación de embriones de *Cavia porcellus*]. *Laboratory Animals*, 42(4), 489–494. <https://doi.org/10.1258/la.2007.007011>

Duenhas, A., Adalgiza, M., Urt, G., Bosco, J., Filho, M. y Nagao, I. (2016). Ovarian overstimulation in ewes with single dose [Sobreestimulación ovárica en ovejas con dosis única]. *Revista Agrarian*, 9, 280–286. <https://ojs.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/view/4347>

Edwards, L. J., Kind, K. L., Armstrong, D. T. y Thompson, J. G. (2005). Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice [Efectos de la hormona folículo estimulante humana recombinante sobre el desarrollo embrionario en ratones]. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 288(5 51-5), 845–851. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00398.2004>

FAO. (2000). *Alimentación de cuyes y conejos*. Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares. Consultado el 07 de marzo del 2023. <https://www.fao.org/3/V5290S/v5290s45.htm>

Fernández, A. (2020). *Sexado, celo y apareamiento: Reproducción de la cobaya* [video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=NkX4oDaYyig>

Fernández, E., Rosales, C., Garzón, J., Argudo, D., Ayala, L., Guevara, G., Maldonado, J. y Perea, F. (2022). Características morfológicas e histológicas de los ovarios de dos grupos genéticos de cuyes (*Cavia porcellus*) de América del Sur. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 33(4), 1–11. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i4.23349>

Ferreira, A., Sá, N., Cadenas, J., Correia, H., Guerreiro, D., Alves, B., Lima, L., Celestino, J., Rodrigues, A., Gastal, E. y Figueiredo, J. (2020). Pituitary porcine FSH, and recombinant bovine and human FSH differentially affect growth and relative abundances of mRNA transcripts of preantral and early developing antral follicles in goats [La FSH hipofisiaria porcina y la FSH recombinante bovina y humana afectan diferencialmente el crecimiento y las transcripciones de ARNm de folículos preantrales

- y antrales de desarrollo temprano en cabras]. *Animal Reproduction Science*, 219, 106461. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106461>
- Ferrin, E. y Murudumbay, R. (2022). *Evaluación de la eficiencia de la administración oral de progesterona en la sincronización del celo en cobayas* [Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Insitucional UCUENCA. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/40179>
- Filicori, M. (2011, 21 de junio). *Unitary combination of FSH and hCG* [Combinación unitaria de FSH y hCG]. United States Patent. Consultado el 6 de febrero del 2023. <https://patentimages.storage.googleapis.com/2f/75/e3/3f6613395442e8/US7964562.pdf>
- Fortune, J. (2003). The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles [Las primeras etapas del desarrollo folicular: activación de folículos primordiales y crecimiento de los folículos preantrales]. *Animal Reproduction Science*, 78(3–4), 135–163. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)
- Franco, J. y Uribe, L. (2012, 14 de marzo). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Scielo*, (1), 41–56. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502012000100006
- Garza, F., Shaban, M. A. y Terranova, P. F. (1984). Luteinizing hormone increases the number of ova shed in the cyclic hamster and guinea-pig [La hormona luteinizante aumenta el número de óvulos derramados en el hámster cíclico y el cobayo]. *Journal of Endocrinology*, 101(3), 289–298. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1010289>
- Gavilanez, F. (2014). *Análisis de la progenies F2 y F3 de cuatro cruzamientos entre grupos raciales de cuyes (Cavia porcellus), Macabeo y Peruano mejorado* [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio digital UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2861>
- González, E. E., Ochoa, H., Calderón, Á. E. y Cordero, F. B. (2019). *Evaluación de bloques nutricionales en la alimentación de cobayos (Cavia porcellus) en etapas de crecimiento y engorde* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio digital UNL.

<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/21680>

Google. (s.f.). [Granja Irquis Universidad de Cuenca]. Consultado el 20 de febrero del 2023.

[https://www.google.com.ec/maps/place/Granja+%22Irquis%22+Universidad+de+Cuenca/@-3.0801834,-](https://www.google.com.ec/maps/place/Granja+%22Irquis%22+Universidad+de+Cuenca/@-3.0801834,-79.0753254,783m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x91ccdf02b13aef25:0x8ec02e379b772836!8m2!3d-3.0803175!4d-79.0753884?hl=es)

[79.0753254,783m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x91ccdf02b13aef25:0x8ec02e379b772836!8m2!3d-3.0803175!4d-79.0753884?hl=es](https://www.google.com.ec/maps/place/Granja+%22Irquis%22+Universidad+de+Cuenca/@-3.0801834,-79.0753254,783m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x91ccdf02b13aef25:0x8ec02e379b772836!8m2!3d-3.0803175!4d-79.0753884?hl=es)

Grégoire, A., Allard, A., Huamán, E., León, S., Silva, R. M., Buff, S., Berard, M. y Joly, T. (2012a). Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*) [Control del ciclo estral en la cobaya (*Cavia porcellus*). *Theriogenology*, 78(4), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>

Grégoire, Anne. (2012b, 25 de septiembre). *Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (Cavia porcellus): production et congélation des embryons* [Criopreservación de recursos genéticos en el cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones] [Tesis doctoral, Université de Lyon]. <https://theses.hal.science/tel-00981743/document>

Grégoire, A., Joly, T., Huamán, E., Silva, R. y León, S. (2010). Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones. *Bulletin de l'Institut Français d'études Andines*, 39(1), 185–188. <https://doi.org/10.4000/bifea.2164>

Guerrini, A. (2003). *Experimenting with Humans and Animals [Experimentando con humanos y animales]* (Galen to Animal Rights, ed). Reino Unido: The Johns Hopkins University Press.

Hamilton, G. S. y Armstrong, D. T. (1991). The superovulation of synchronous adult rats using follicle-stimulating hormone delivered by continuous infusion [La superovulación de ratas adultas sincronizadas usando la hormona folículo estimulante administrada por infusión continua]. *Biology of Reproduction*, 44(5), 851–856. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.5.851>

Hamilton, G. S. y 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 [El desarrollo bimodular de los folículos ováricos en cobayos cíclicos y las

- diferencias entre los folículos antrales desarrollados en diferentes fases del ciclo]. *Canadian Journal of Zoology*, 68(5), 1031–1036. <https://doi.org/10.1139/z90-150>
- Hargaden, M. y Singer, L. (2012). Anatomy, Physiology, and Behavior [Anatomía, fisiología y comportamiento]. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 575–602. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1>
- Hunzicker-Dunn, M. y Maizels, E. (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase [Vías de señalización de FSH en células inmaduras de la granulosa que regulan la expresión del gen diana: ramificación a partir de la proteína quinasa]. *Cellular Signalling*, 18(9), 1351–1359. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.02.011>
- Hutz, R., Bejvan, S., Durning, M. y Dierschke, D. (1990). Changes in follicular populations, in serum estrogen and progesterone, and in ovarian steroid secretion in vitro during the guinea pig estrous cycle [Cambios en las poblaciones foliculares, estrógeno y progesterona en suero y en la secreción de esteroides ováricos in vitro durante el ciclo estral de cobayas]. *Biology of Reproduction*, 42(2), 266–272. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.2.266>
- Ishii, O. (1920). Observations on the sexual cycle of the guinea pig [Observaciones del ciclo sexual del cobayo]. *The University of Chicago Press*, 38(4), 237–250. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.2307/1536328>
- Kilgallon, J. (2020). *Restraint of guinea pig for IP injection* [Sujeción del cobayo para inyección IP] [video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=ZGxlt5-H-E4>
- Kuhne, W. y Mendoza, A. S. (1992). Scanning Electron Microscope Investigations on the Vaginal Epithelium of the Guinea Pig during the Estrous Cycle [Investigaciones con microscopio electrónico en el epitelio vaginal de la cobaya durante el ciclo estral]. *Archives of Histology and Cytology*, 55, 205–210. https://doi.org/10.1679/aohc.55.Suppl_205
- Labhsetwar, A. P. y Diamond, M. (1970). Ovarian changes in the guinea pig during various reproductive stages and steroid treatments [Cambios ováricos en la cobaya durante varias etapas reproductivas y tratamientos esteroides]. *Biology of Reproduction*, 2(1), 53–57. <https://doi.org/10.1095/biolreprod2.1.53>

- Lejeune, M. y Touraine, J. L. (2009). *Sur l'expérimentation animale en Europe Quelles alternatives ? Quelle éthique ? Quelle gouvernance ? [Sobre la experimentación animal en Europa, ¿Qué alternativas? ¿Qué ética? ¿Qué gobernanza?]*. Composition de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Consultado el 6 de marzo del 2023. <https://www.assemblee-nationale.fr/13/pdf/rap-off/i2145.pdf>
- Li, J. rong, Wang, W. y Shi, F. xiong. (2015). Induction of follicular luteinization by equine chorionic gonadotropin in cyclic guinea pigs [Inducción de luteinización folicular mediante la gonadotropina coriónica equina en cobayas cíclicas]. *Journal of Zhejiang University: Science B*. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1631%2Fjzus.B1500046>
- Litter, M. (1986). *Farmacología experimental* (3.^a ed). Argentina: El Ateneo.
- Long, H., Yu, W., Yu, S., Yin, M., Wu, L., Chen, Q., Cai, R., Suo, L., wang, L., Lyu, Q. y Kuang, Y. (2021). Progesterone affects clinic oocyte yields by coordinating with follicle stimulating hormone via PI3K/AKT and MAPK pathways [La progesterona afecta la producción clínica de ovocitos al coordinarse con la hormona folículo estimulante a través de las vías PI3K/AKT y MAPK]. *Journal of Advanced Research*, 33, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.02.008>
- Luna, F., Cortés, M., Flores, M., Hernández, B., Trujillo, A. y Domínguez, R. (2003). The effects of superior ovarian nerve sectioning on ovulation in the guinea pig [Los efectos de la sección del nervio ovárico superior sobre la ovulación de la cobaya]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-61>
- Meara, O. (2009). *Sexing guinea pigs (guinea pig gender determination) [Sexado de cobayos (determinación del género de cobayos)]*. Pet informed. Consultado el 7 de marzo del 2023. <http://www.pet-informed-veterinary-advice-online.com/sexing-guinea-pigs.html>
- Mogollón, É. y Burla, A. (2013). Superovulación de hembras bovinas : alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus* 9 (18), 37-47. <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.545>
- Montes, T. (2012). *Asistencia técnica dirigida en crianza tecnificada de cuyes*. UNALM. Consultado el 20 de febrero del 2023. <https://www.agrobanco.com.pe/wp->

content/uploads/2017/07/ASISTENCIA_TECNICA_EN_CRIANZA_TECNIFICADA_D
E_CUYES.pdf

Noonan, D. (1994, septiembre). The Guinea Pig, *Cavia porcellus* [El cobayo, *Cavia porcellus*]. *Handbook of Genetics*, 275–307. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4470-4_13

Obregón, A. (2009). *Utilización de dos métodos de sincronización de celos en cuyas multíparas* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Dirección de bibliotecas y recursos para el aprendizaje y la investigación ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1393/1/17T0890.pdf>

Oñate, C. (2008). *Evaluación de dos métodos de sincronización del estro en cuyes* [Tesis de pregrado, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo]. Dirección de bibliotecas y recursos para el aprendizaje y la investigación ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/1612>

Penitente-Filho, J. M., Jimenez, C., Moreira, A., Carrascal, E., Azevedo, J.L., Oliveira, C., Albani, F. y Alves, C. (2015). Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes [Influencia del cuerpo lúteo y el volumen ovárico en el número y calidad de los ovocitos bovinos]. *Animal Science Journal*, 86(2), 148–152. <https://doi.org/10.1111/asj.12261>

Pilny, A. (2014). Ovarian Cystic Disease in Guinea Pigs [Enfermedad del ovario cístico en cobayas]. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 17(1), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.09.003>

Pino, T. (2015). *Descripción histológica de ovarios y testículos de cuyes (Cavia porcellus) a los dos meses de edad, suplementados con nucleótidos* [Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santa María]. Repositorio Institucional UCSM. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/3082>

Popova, E., Krivokharchenko, A., Ganten, D. y Bader, M. (2002). Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats [Comparación entre la superovulación inducida por PMSG y FSH para la generación de ratas transgénicas]. *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 [Superovulación y recuperación de embriones en la cobaya]*. Szent Istvan University. Consultado el 20 de enero del 2022. <http://www.huveta.hu/handle/10832/973>
- Quenta, E. (2020). *Evaluación de los parámetros productivos bajo cinco protocolos de sincronización de celo en cuyes (Cavia Aparea Porcellus) en la estación experimental de Patacamaya* [Tesis de pregrado, Universidad Mayor de San Andrés]. Repositorio Institucional UMSA. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/25507>
- Rawson, J., Galey, C., Weinberg, L. y Hodgson, B. (1979). Effects of Gonadotropins on Follicular Development, Ovulation and Atresia in the Mature Guinea Pig [Efectos de las gonadotropinas sobre el desarrollo folicular, la ovulación y atresia en el cuy maduro]. *Horm Res*, 10 (1), 25-36. <https://doi.org/10.1159/000178986>
- Reed, M. y Hounslow, W. (1971, febrero). Induction of ovulation in the guinea-pig [Inducción de ovulación en la cobaya]. *Endocrinology*, 49 (2), 203-11. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.1998.tb00843.x>
- Resendiz-Aguilar, O. (2022). Evaluación de dos protocolos para transferencia de embriones en ovejas Obispo de la Montaña de Guerrero. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.19136/era.a9n1.2847>
- Reviere, M. y Mauléon, P. (1973). Effets Des Hormones Gonadotropes Sur L'Ovaire De Ratte Immature [Efectos de las hormonas gonadotrópicas en el ovario de la rata inmadura]. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 13, 177–193. <https://doi.org/10.1051/rnd:19730516>
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation [Maduración de los folículos ováricos: acciones e interacciones de las hormonas pituitarias y ováricas en la diferenciación de células foliculares]. *Physiological Reviews*, 60(1), 51–89. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.1.51>
- Rivas, K. (2022). *Momento de ovulación en el cuy hembra (Cavia porcellus): precisión de la histología ovárica y citología vaginal* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional BAN. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/5550>
- S.E.A ANIMALARIO OMG. (2005). *Eutanasia (rata, ratón, hámster y cobayo)*. Animalario

OMG. Consultado el 30 de octubre del 2022.
<https://nucleus.usal.es/sites/default/files/servicios/sea/formularios/EutanasiaPNSEA4.pdf>

Salcedo, J. (2016). *Sincronización de celo en cuyes (Cavia porcellus) mediante el uso de hormonas y su efecto sobre la tasa reproductiva* [Tesis de pregrado, Universidad de Alas Peruanas] Repositorio Institucional UAP.
<https://repositorio.uap.edu.pe/handle/20.500.12990/1389>

Sánchez, C. (2002). *Crianza y comercialización de cuyes* (1.^a ed). Perú: Ripalme.

Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., Watanabe, G., Tsonis, C. G., Suzuki, A. K. y Taya, K. (2000). Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs [Inducción de superovulación mediante la vacuna inhibina en cobayas cíclicas]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 1–7. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1180001>

Skinner, D. C., Caraty, A. y Allingham, R. (2001). Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: No colocalization with gonadotropin-releasing neurons [Desenmascarando el receptor de progesterona en el área preóptica e hipotálamo de la oveja: no colocación con neuronas liberadoras de gonadotropina]. *Endocrinology*, 142(2), 573–579.
<https://doi.org/10.1210/endo.142.2.7956>

Soares, J., Bernabe, V., Visintin, J., Fituco, E. y Bernabe, R. (1996). Efeito de diferentes gonadotrofinas sobre o crescimento folicular e a ovulação na cobaia (Cavia porcellus) [Efecto de diferentes gonadotropinas sobre el crecimiento folicular y la ovulación en la cobaya]. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 33 (2), 110-4.
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-257079?src=similardocs>

Solís, R. J. y Chávez, P. N. (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* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Institucional UTC.
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2895>

Stringfellow, D. A. y Seidel, S. M. (1998). *Manual of the international embryo transfer society* [Manual de la sociedad internacional de la transferencia de embriones]. The Society.

- Sunday, S., Hussein, G., Silas, T. y Musa, T. (2010). Effect of Sex on Linear Body Measurements of Guinea Pig (*Cavia porcellus*) [Efecto del sexo en las medidas corporales lineales del cobayo (*Cavia porcellus*)]. *Department of Animal Production* 14(1), 61–65. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/AUJT/10817637.pdf>
- Susuki, O., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y. y Matsuda, J. (2003). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies [Optimización de la inducción de superovulación con gonadotropina menopáusica humana en cobayas basado en ondas foliculares y homologías de receptores de FSH]. *Molecular Reproduction and Development*, 64(2), 219–225. <https://doi.org/10.1002/mrd.10242>
- Suzuki, Ogura, A., Asano, T., Noguchi, Y., Yamamoto, Y. y Oike, M. (1993). Development of preimplantation guinea-pig embryos in serum-free media [Desarrollo de la preimplantación de embriones de cobayas en medios libres de suero]. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(4), 425–432. <https://doi.org/10.1071/RD9930425>
- Swanson, A., Mehta, V., Ofir, K., Rowe, M., Rossi, C., Ginsberg, Y., Griffin, H., Barker, H., White, T., Boyd, M. y David, A. (2017). The use of ultrasound to assess fetal growth in a guinea pig model of fetal growth restriction [El uso de ultrasonido para evaluar el crecimiento fetal en un modelo de cobayo de restricción de crecimiento fetal]. *Laboratory Animals*, 51(2), 181–190. <https://doi.org/10.1177/0023677216637506>
- Takahashi, W. y Division, T. (1999). Conception rate with and embryo development in guinea pigs with synchronized estrus induced by progesterone implant. *Jikken Dobutsu*, 43(1), 95–99. https://doi.org/10.1538/expanim1978.43.1_95
- Tarrillo, B. P., Mirez, K. F. y Bernal, W. (2018). Uso de alimento peletizado en crecimiento- engorde de cuyes mejorados (*Cavia porcellus*) en Chota. *Revista Ciencia Nor@andina*, 1 (2), 36-43. https://www.researchgate.net/publication/327186594_USO_DE_PELETIZADO_EN_CRECIMIENTO-_ENGORDE_DE_CUYES
- Taylor, D. y Lee, V. (2012). Guinea Pigs as Experimental Models [Cobayos como modelos experimentales]. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 705-744. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0>

- Telfer, E., Gosden, R. G. y Faddy, M. J. (1991). Impact of exogenous progesterone on ovarian follicular dynamics and function in mice [Impacto de la progesterona exógena en la dinámica y función folicular ovárica en ratones]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 93(2), 263–269. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930263>
- Torres, G. y Pianzola, N. (2014, 30 de enero). *¿En qué se parecen los ratones y los humanos?*. BBC Mundo Ciencia. Consultado el 05 de junio del 2022. https://www.bbc.com/mundo/noticias/2014/02/140130_salud_laboratorio_ratones_gtg#:~:text=El genoma de un ratón,de Recursos Biológicos del laboratorio.
- Tresidder, D. (1922). Oestrus and Fecundity in the Guinea Pig [Estro y fecundidad en la cobaya]. *American Society of Naturalists*, 56(645), 347–359. <https://www.jstor.org/stable/2456275>
- Tupiza, M. (2017). *Diagnóstico ecográfico de gestación en cobayas* [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Digital UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/11619>
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C. y Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider [Administración de sustancias a animales de laboratorio: vías de administración y factores a considerar]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 600–613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189662/pdf/jaalas2011000600.pdf>
- Vaca, M. (2016). *Parámetros reproductivos de cuyes (Cavia porcellus) con polidactilia en Quiroga, Cotacachi, provincia de Imbabura* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. Repositorio Digital UTN. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/5964>
- Vega, V. M. B., Chávez, S. P. J., Franco, C. D. M., Ramos, T. I. y Toledo, J. R. (2019). FSH in bovine superovulation [FSH en superovulación bovina]. *Bionatura*, 4(1), 812–816. <https://doi.org/10.21931/RB/2019.04.01.12>
- Vivas, J. y Carballo, D. (2009). *Especies alternativas: manual de crianza de cobayos (Cavia porcellus)*. Universidad Nacional Agraria. Consultado el 20 de enero del 2022. <http://repositorio.una.edu.ni/2472/1/RENL01V856.pdf>

- Wang, J., Liu, Z., Sun, Q., Xia, S., Cui, J., Yang, L., An, L., Zhang, J., Su, L., Su, Y. y Du, F. (2019). Combined treatment with cysteamine and leukemia inhibitory factor promotes Guinea pig oocyte meiosis in vitro [Tratamiento combinado con cisteamina y factor inhibidor de la leucemia promueve la meiosis de ovocitos de cobayos in vitro]. *American Journal of Translational Research*, 11(12), 7479–7491. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943477/>
- Wang, X., Wang, L., Sun, Y., Wu, D., Li, J., Zhu, L., Jiang, S. y Pan, X. (2020). The optimized research of the in vitro culture of preantral follicles in mice [La investigación optimizada del cultivo in vitro de folículos preantrales en ratones]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(11), 1–11. <https://doi.org/10.1002/jcla.23498>
- Wei, S., Gong, Z., Guo, H., Zhang, T. y Ma, Z. (2017). FSH and eCG impact follicles development and expression of ovarian FSHR and caspase-9 in mice [El impacto de FSH y eCG en el desarrollo de folículos y la expresión ovárica de FSHR y caspasa-9 en ratones]. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(2), 79–85. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2017.4085>
- Wilson, R. L., Lampe, K., Matuszewski, B. J., Regnault, T. R. H., & Jones, H. N. (2020). 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>
- Wilson, R., Lampe, K., Matuszewski, B., Regnault, T. y Jones, H. (2021). Time Mating Guinea Pigs by Monitoring Changes to the Vaginal Membrane throughout the Estrus Cycle and with Ultrasound Confirmation [Tiempo de apareamiento de cobayos mediante el control de cambios en la membrana vaginal a lo largo del ciclo estral y con confirmación por ultrasonido]. *Methods Protoc.* <https://doi.org/10.3390/mps4030058>.
- Zeleznik, A. J. (2004). The physiology of follicle selection [La fisiología de selección de folículos]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-31>

Anexos

Anexo A: Jaulas experimentales para sincronización de cobayas.



Anexo B: Revisión de apertura de membrana vaginal. A: abierta. B: cerrada



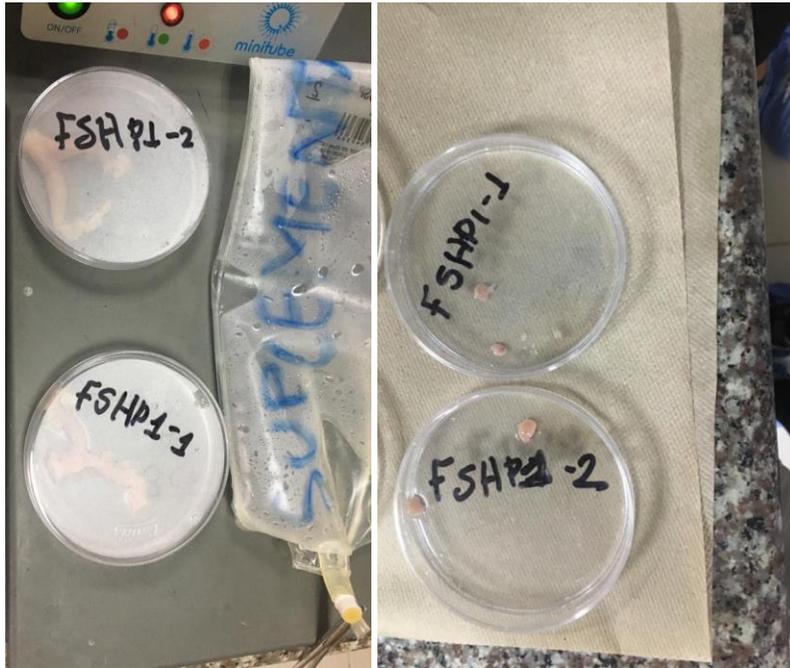
Anexo C: Localización del tracto reproductivo y extracción del útero y ovarios de las cobayas.



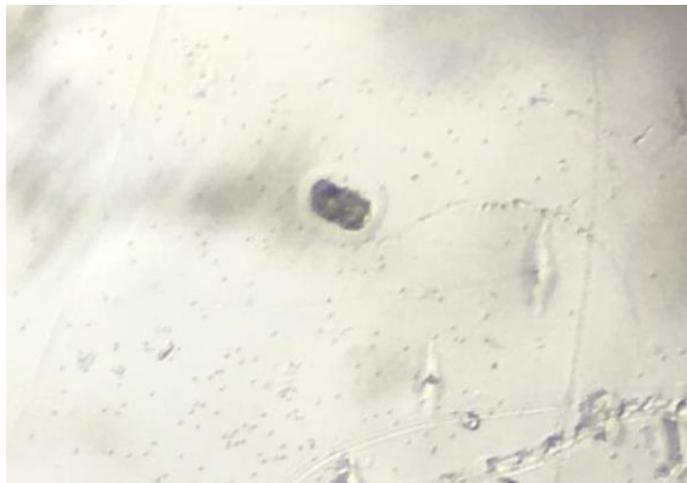
Anexo D: Lavado de oviductos para recuperación de estructuras.



Anexo E: Útero y ovarios en solución salina buffer de fosfato (PBS) mantenida a 37°C



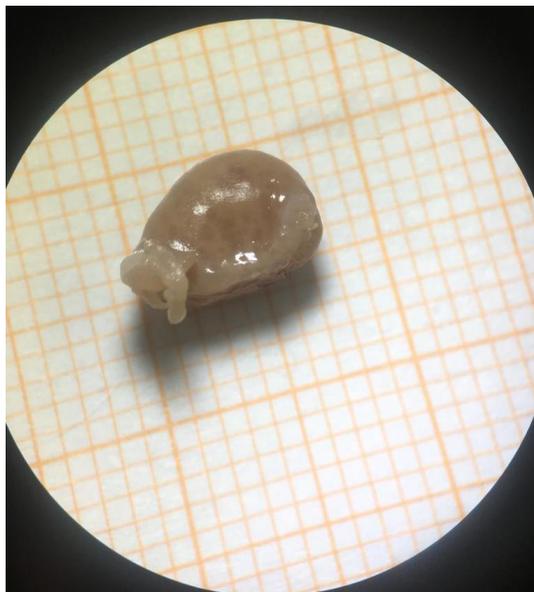
Anexo F: Evaluación de estructuras bajo la luz de un estereomicroscopio.



Anexo G: Cuantificación de folículos y cuerpos lúteos bajo el lente del estereomicroscopio.



Anexo H: Medición del diámetro ovárico, cuerpos lúteos y folículos en papel milimetrado bajo la luz de un estereomicroscopio.



Anexo I: Medición del diámetro ovárico utilizando el software Image J.

