

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA



**“MOMENTO DE OVULACIÓN EN EL CUY HEMBRA (*Cavia porcellus*):
PRECISIÓN DE LA HISTOLOGÍA OVÁRICA
Y CITOLOGÍA VAGINAL”**

Presentada por:

JOSSELIN KELLY RIVAS FLORES

Tesis para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Lima – Perú

2022

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

Document Information

| | |
|--------------------------|---|
| Analyzed document | Tesis -cuy - Josselin Rivas 2022 9 Mayo FIRMADA.docx (D136128056) |
| Submitted | 2022-05-11T01:18:00.0000000 |
| Submitted by | Armando Enrique Alvarado Malca |
| Submitter email | ealvarado@lamolina.edu.pe |
| Similarity | 12% |
| Analysis address | ealvarado.unalm@analysis.urkund.com |

Sources included in the report

| | | | |
|-----------|--|---|----------|
| SA | UNIVERSIDAD DE CUENCA.docx Document UNIVERSIDAD DE CUENCA.docx (D15288235) |  | 1 |
| SA | document.pdf Document document.pdf (D15288237) |  | 5 |
| SA | TESIS AP 25 de julio rev..docx Document TESIS AP 25 de julio rev..docx (D54966031) |  | 8 |
| SA | trabajo-de-reproduccion-completo.docx Document trabajo-de-reproduccion-completo.docx (D13617906) |  | 1 |
| SA | Asunta_Martínez_Dinámica_y_selección_folicular.pdf Document Asunta_Martínez_Dinámica_y_selección_folicular.pdf (D99103675) |  | 1 |
| W | URL: https://doi.org/10.1530/acta.0.0750569 Fetched: 2022-05-11T01:18:00.0000000 |  | 1 |
| W | URL: https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1503&sectionid=99838545 Fetched: 2022-05-11T01:18:00.0000000 |  | 1 |
| SA | CORTES BRIONES MARCELO FRANCISCO 22.docx Document CORTES BRIONES MARCELO FRANCISCO 22.docx (D15809082) |  | 1 |
| W | URL: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2099-07.2007 Fetched: 2022-05-11T01:18:00.0000000 |  | 1 |
| W | URL: https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2430&sectionid=190287163 Fetched: 2022-05-11T01:19:00.0000000 |  | 1 |
| SA | TESIS Rodrigo X. López Cabrera .docx Document TESIS Rodrigo X. López Cabrera .docx (D87751722) |  | 1 |
| W | URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024347/ Fetched: 2020-04-22T19:02:07.0300000 |  | 1 |

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE ZOOTECNIA

**“MOMENTO DE OVULACIÓN EN EL CUY HEMBRA (*Cavia porcellus*):
PRECISIÓN DE LA HISTOLOGÍA OVÁRICA
Y CITOLOGÍA VAGINAL”**

Presentada por:

JOSSELIN KELLY RIVAS FLORES

Tesis para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva
Presidente

Mg.Sc. José Sarria Bardales
Miembro

Ing. Amalia Gallegos Cárdenas
Miembro

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca
Asesor

Ph.D. Edwin Mellisho Salas
Co Asesor

DEDICATORIA

A mi madre Berta Flores que desde el cielo guía mi camino y me protege. A mi familia, en reconocimiento a todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado. A mi mamita Emerenciana, quien me crio con mucho amor. A mi tía Eufemia, mi segunda madre, quien siempre ha estado a mi lado para darme el aliento a seguir avanzando. A mi hermano, quien es mi motivación para salir adelante.

A todos ustedes, con cariño

Josselin Rivas Flores

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 417-2019-FONDECYT por permitir que se realice esta investigación.

A mi coasesor de tesis PhD. Edwin Mellisho Salas por el apoyo y enseñanza durante todo este tiempo.

Al Laboratorio de Animales Menores del Programa de Animales menores de por brindarme las instalaciones para desarrollar mi tesis

A mi familia, en especial a mi tía Eufemia que con su apoyo me ha impulsado a seguir adelante con la tesis.

A mi papá y mis hermanos menores que fueron mi inspiración.

A mis compañeros que cursan el doctorado, Deysi Dipaz, Misael Rodríguez, Katherine Caycho, y Carmina Vargas por su apoyo durante el experimento y los análisis de mis resultados.

A mis amigas Abigail y Deyanira por su apoyo moral y buenas vibras

A mis primas que me apoyaron y acompañaron en todo momento.

A todos ustedes, gracias

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| RESUMEN..... | vi |
| ABSTRACT | vii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Fisiología reproductiva del cuy | 3 |
| 2.1.1. Pubertad | 3 |
| 2.1.2. Ciclo estral | 4 |
| III. METODOLOGÍA..... | 18 |
| 3.1. Lugar y fecha..... | 18 |
| 3.2. Diseño experimental | 18 |
| 3.3. Animales y alimentación..... | 19 |
| 3.4. Sincronización de ciclo estral..... | 19 |
| 3.5. Apertura vaginal | 19 |
| 3.6. Citología vaginal..... | 20 |
| 3.7. Histología ovárica | 23 |
| 3.8. Histología vaginal | 25 |
| 3.9. Análisis estadístico..... | 27 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 28 |
| 4.1. Momento de ovulación en cuyes sincronizados | 28 |
| 4.2. Recuento de folículos antrales en cuyes sincronizados..... | 30 |
| 4.3. Correlación entre variables histológicas y citológicas | 33 |
| 4.4. Precisión de la predicción de la ovulación de las variables | 35 |
| V. CONCLUSIONES | 43 |
| VI. RECOMENDACIONES | 44 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 45 |
| VIII. ANEXOS..... | 60 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Duración de las distintas fases del ciclo estral en rata, ratón y cuy | 5 |
| Tabla 2. Clasificación y caracterización de folículos ováricos del cuy hembra (<i>Cavia porcellus</i>) (Sadeu <i>et al.</i> , 2007) | 7 |
| Tabla 3. Clasificación de células del epitelio vaginal de ratas bajo influencia de estrógeno (Montes & Luque, 1988) | 13 |
| Tabla 4. Tipos de células epiteliales y sus frecuencias relativas observadas en frotis vaginales preparados a partir de muestras recolectadas de cuy en las cuatro etapas del ciclo estral (Adaptado de Lilley <i>et al.</i> , 1997) | 14 |
| Tabla 5. Protocolo de tinción Papanicolaou modificado (Dey <i>et al.</i> , 2018c)..... | 21 |
| Tabla 6. Protocolo de tinción con Hematoxilina Eosina (Chaves <i>et al.</i> ,2008)..... | 23 |
| Tabla 7. Cambios en los porcentajes de folículos antrales atrésicos según rango de diámetro folicular (113-300, 301-500, 501-700, >700 μm) en cuyes hembras de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona..... | 33 |
| Tabla 8. Correlación de Pearson de las variables con distribución normal..... | 34 |
| Tabla 9. Correlación de Spearman de las variables con distribución no normal..... | 35 |
| Tabla 10. Valores ROC-AUC de las variables apertura, citología e histología vaginal | 37 |
| Tabla 11. Modelos predictivos de ovulación en el cuy hembra con el uso de regresión logística binaria | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ocurrencia de la primera apertura vaginal y primer estro en ratones y ratas hembra..... | 4 |
| Figura 2. Acción del estrógeno sobre las células epiteliales de la mucosa vaginal..... | 9 |
| Figura 3. Proceso de diferenciación de células que conforman la mucosa vaginal..... | 9 |
| Figura 4. Cambios en el epitelio vaginal del ratón durante el ciclo estral. | 10 |
| Figura 5. Sección histológica transversal en donde se muestra las capas que conforman el tejido vaginal del ratón (Boyd <i>et al.</i> , 2018). | 16 |
| Figura 6. Diseño experimental para predecir el momento de ovulación en el cuy hembra (<i>Cavia porcellus</i>)..... | 19 |
| Figura 7. Ausencia y presencia de apertura vaginal en el cuy hembra. | 20 |
| Figura 8. Hisopado vaginal del cuy hembra..... | 21 |
| Figura 9. Tipos de células epiteliales vaginales teñidas en tinción Papanicolaou y objetivo de 400X..... | 22 |
| Figura 10. Sección histológica de ovario del cuy hembra teñido con Hematoxilina-eosina, objetivo a 40x..... | 25 |
| Figura 11. Sección histológica con cambios morfológicos en la vagina del cuy hembra teñido con hematoxilina eosina. Objetivo a 100X. | 26 |
| Figura 12. Sección histológica de la vagina del cuy con infiltración de leucocitos en mucosa vaginal y lumen vaginal de hembra teñido con hematoxilina eosina. Objetivo a 100X. | 27 |
| Figura 13. Distribución de hembras con presencia de cuerpo lúteo en formación a las 72, 84, 96, 108, 120 y 132 horas post última dosis de progesterona. | 28 |
| Figura 14. Sección histología de ovario del cuy hembra teñido con Hematoxilina Eosina, objetivo 40X..... | 29 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Estructuras foliculares y cuerpos lúteos observados en los ovarios de los cuyes hembras a 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona..... | 30 |
| Figura 16. Secciones histológicas de ovarios de cuyes hembras teñidos en Hematoxilina Eosina, objetivo de 40X. | 31 |
| Figura 17. Porcentaje de folículos antrales según rango de diámetro folicular (113-300, 301-500, 501-700, >700 μm) en cuyes hembras de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona | 32 |
| Figura 18. Sección histológica del ovario del cuy hembra del grupo de 108 h post última dosis de progesterona, teñido en Hematoxilina Eosina, objetivo de 400X..... | 33 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1: Peso inicial de cuyes hembras distribuidos en grupos a las 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post ultima dosis de progesterona..... | 60 |
| Anexo 2: Resumen de datos obtenidos por histología ovárica, citología vaginal, histología vaginal y apertura vaginal a las 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post ultima dosis de progesterona | 61 |

RESUMEN

La citología e histología vaginal en hembras se utiliza comúnmente en roedores para clasificar las etapas del ciclo estral. Estudios iniciales reportaron una coincidencia entre la ovulación y la infiltración de leucocitos en el frotis vaginal, definiendo así la infiltración como un indicador de ovulación en cuyes (*Cavia porcellus*). El objetivo de este estudio fue comparar la precisión de las técnicas de histología y citología vaginal en el cuy para predecir la ovulación que será

determinada objetivamente por la presencia de un cuerpo lúteo en formación en el ovario. Cuyes hembras (n=36) de 5 a 6 meses de edad fueron sincronizadas con progesterona (0.22 mg/ kg de solución oral de Altrenogest, Regu-Mate Porcina®, Merck) durante 15 días. Las hembras sincronizadas se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos a diferentes momentos después de la última dosis de progesterona: 72, 84, 96, 108, 120 y 132 h, para evaluar la apertura vaginal, citología e histología vaginal. Las variables analizadas en citología fueron: porcentaje de células epiteliales parabasal (PB), intermedias (I), superficiales (S) y cornificadas (C), así como la presencia de leucocitos (LEU) y la celularidad del frotis (CF). Las variables analizadas en la histología vaginal fueron: presencia de estrato mucificado que cubre la mucosa vaginal (MUC), estrato mucificado seguido de estrato corneo que cubre la mucosa vaginal (MUC-CORN), estrato córneo que cubre la mucosa vaginal (CORN), estrato granuloso que cubre la mucosa vaginal (GRAN), estrato germinativo que cubre la mucosa vaginal (GERM) e infiltración de leucocitos en el epitelio vaginal (LE) y lumen vaginal (LL). Las variables fueron sometidas a análisis estadístico de Receiver Operating Characteristic (ROC) y al área bajo la curva (AUC) para determinar la precisión para predecir la ovulación. Los resultados indican que la ovulación inicio a las 108 h hasta las 132 h post última dosis de progesterona. Adicionalmente las variables GRAN, LE, C tuvieron una precisión de 0.88, 0.84 y 0.83 (ROC-AUC), para predecir la ovulación, respectivamente. Asimismo, el modelo matemático con variables citológicas e histológicas obtenido por regresión logística binaria para predecir la ovulación muestra una predicción correcta del 86.1% y 91.7%, respectivamente y una precisión de 0.93 y 0.97 (ROC-AUC). En conclusión, las variables histológicas y citológicas de la vagina permiten una alta precisión en la predicción de la ovulación de cuyes sincronizadas con progesterona.

Palabras claves: sincronización, ovulación, citología, histología, cuy

ABSTRACT

Vaginal cytology and histology are commonly used in rodents to classify the stages of the estrous cycle. Initial studies reported a coincidence between ovulation and leukocyte infiltration in the vaginal smear, thus defining infiltration as an indicator of ovulation in guinea pigs. The objective of this study was to study the accuracy of the use of vaginal histology and cytology to predict ovulation in guinea pig which was objectively determined by the presence of a corpus luteum in formation in the ovary. Female guinea pigs (n = 36) from 5 to 6 months of age were estrous synchronized with progesterone (0.22mg / Kg oral solution Altrenogest, Regu-Mate Porcina®, Merck) for 15 days. Synchronized females were randomly distributed into 6 groups of different times after the last dose of Altrenogest: 72 (G1), 84 (G2), 96 (G3), 108 (G4), 120 (G5) and 132h (G6) to evaluate opening, cytology, and vaginal histology. Epithelial cells were classified by cytology into parabasal(PB), intermediate(I), superficial(S), cornified(C), Leukocyte(LEU) and smear cellularity (CF). The histology of the vaginal tissue evaluated and classified into stratum mucified on vaginal mucosa (MUC), mucified stratum followed by stratum corneum on vaginal mucosa (MUC-CORN), stratum corneum on vaginal mucosa (CORN), stratum granulosum on vaginal mucosa (GRAN), stratum germinativum on vaginal mucosa (GERM) and leukocyte infiltration of the vaginal epithelium (LE) and vaginal lumen (LL). The variables were analyzed by Receiver operating characteristic (ROC) and Area under the Curve (AUC) to determine the precision of the variable to predict ovulation. The results indicate that ovulation started at 108h to 132 h post last dose of progesterone. Additionally, the variables GRAN, LE, C have an accuracy of 0.88, 0.84 and 0.83 achieved a ROC-AUC respectively to predict ovulation, with $p > 0.05$. Likewise, the mathematical model with cytological and histological variables obtained by binary logistic regression to predict ovulation shows a correct prediction of 86.1% and 91.7%, respectively, and an accuracy of 0.93 and 0.97 (ROC-AUC). In conclusion, the histological and cytological variables of the vagina allow a high precision in the prediction of ovulation in guinea pigs synchronized with progesterone.

Keywords: synchronization, ovulation, cytology, histology, guinea pig

I. INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*) es un animal nativo originario de los andes latinoamericanos (Araníbar *et al.*, 2014), siendo el Perú uno de los países con mayor población de animales. Su crianza comercial se ha ampliado exitosamente en casi la totalidad de su territorio (Chauca, 2007). Por tal motivo, la conservación de la biodiversidad genética que tenemos en nuestro país es muy importante para nuestro futuro. A fin de lograr este objetivo, se requiere entender su fisiología reproductiva; y entre ello, conocer al detalle las fases del ciclo estral y el momento de ovulación, que permite determinar el momento de cópula y el desarrollo embrionario después de la fecundación. Para luego, conservar gametos y embriones como recursos genéticos *ex situ* (Grégoire *et al.*, 2010).

El comportamiento y las características macroscópicas como la hinchazón en la vulva, secreciones vaginales son métodos poco confiables para definir las etapas del ciclo estral y determinar el momento de ovulación en roedores (Cora *et al.*, 2015). La primera caracterización de los cambios que ocurren en el canal vaginal durante el ciclo estral fue estudiada en el cuy por Stockard y Papanicolaou (1917) y sirvió como base para posteriores estudios del ciclo estral en ratas (Long & Evans, 1922) y ratones (Allen, 1922). Se han demostrado que elevados niveles de estrógenos inducen a la estratificación y cornificación del epitelio de la mucosa vaginal (Garder, 1959) y una reducción de los niveles de estrógenos conduce a su descamación (Kvinnsland & Abro, 1973; Gupta *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1997). Siendo, el estrógeno, la hormona principal que impulsa el cambio de la mucosa vaginal (Gupta *et al.*, 1989).

Comúnmente la citología y la histología vaginal se utiliza en roedores para clasificar las etapas del ciclo estral (Montes & Luque, 1988; Lilley *et al.*, 1997; Li & Davis, 2007; Gal *et al.*, 2014; Araníbar *et al.*, 2014). Estudios iniciales (Stockard & Papanicolaou, 1917) relacionaron los cambios en el frotis vaginal con eventos que se producen en el ovario de cuy y encontraron coincidencia entre la ovulación y el momento de infiltración leucocitaria en el frotis vaginal. Posteriores publicaciones realizadas por Young *et al.* (1933) y Hermreck

& Greenwals (1964) con hallazgos en el frotis vaginal indicaron que la infiltración leucocítica después de la cornificación celular está relacionada muy cercanamente con el momento de ovulación. Posteriormente, la mayoría de los estudios toman como base este criterio para los protocolos de sincronización y ovulación en cuyes (Norris & Adams, 1979; Lilley *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2003; Susuki *et al.*, 2003; Grégoire *et al.*, 2012, Aranibar *et al.*, 2014).

A la fecha, existe poca información sobre el momento de ovulación en cuyes sincronizadas en su ciclo estral y la relación que podría haber entre citología e histología vaginal con el momento de ovulación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comparar la precisión de las técnicas de histología y citología vaginal en el cuy para determinar el momento de ovulación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fisiología reproductiva del cuy

El cuy es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú (Chauca, 1997) y al igual que otro roedor como la rata (Freeman, 2006), son especies poliéstricas no estacionales con ovulación espontánea. La fisiología reproductiva de estos roedores al igual que los mamíferos es controlada por el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (Caligioni, 2009). La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) presente en el hipotálamo se libera y llega a la pituitaria anterior donde los gonadótropos son estimulados para secretar la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Freeman, 2006). Estas hormonas estimulan al ovario, promueven el crecimiento folicular y la ovulación (Sarkar *et al.*, 1976). Siendo las etapas más importantes, la pubertad, ciclo estral, gestación y parto, en las cuales se ejerce el control hipotálamo-hipófisis-ovario.

2.1.1. Pubertad

La pubertad es el período de transición donde se alcanza la competencia reproductiva (Hoffmann, 2018) y este se desencadena por una interacción compleja entre la bioquímica metabólica y neuroendocrina, siendo influenciado por factores intrínsecos y extrínsecos, como la nutrición, edad, peso corporal, genética y estación (Garverick & Smith, 1993).

La pubertad se caracteriza por cambios en la dinámica hormonal dentro del sistema hipotálamo-hipófisis. Antes de la pubertad, los niveles de FSH y LH son muy bajos debido a la supresión de secreción de GnRH en el hipotálamo a través de un mecanismo mediado por el efecto de retroalimentación negativa de los esteroides (Garverick & Smith, 1993). Se sugiere que el hipotálamo es extremadamente sensible al efecto retroalimentador negativo del estrógeno antes de la pubertad, atribuido a un mayor número de receptores de estradiol

hipotalámico. A medida que el animal se acerca a la pubertad, esta sensibilidad disminuye gradualmente, resultando en un aumento gradual de la secreción pulsátil de GnRH y niveles circulantes de FSH y LH (Ramirez & McCann, 1963; Herbison, 2016), estimulando así la maduración del folículo y la síntesis de estrógenos en los ovarios. Este crecimiento de estrógeno provocaría el primer pico preovulatorio de gonadotropina (Messinis, 2006).

En roedores los signos puberales observados son la apertura vaginal y el estro. El estradiol provoca la apoptosis de las células que forman una membrana delgada sobre la vagina, ocasionando la apertura vaginal (Li & Davis, 2007; Caligioni, 2009). En ratas, la apertura vaginal y el primer estro ocurren casi al mismo tiempo a una edad de 37.5 y 37.8 días, respectivamente (Clark & Price, 1981). En ratones, la apertura vaginal ocurre a los 29 días y 12 días después se presenta el primer estro con el inicio de la ciclicidad regular (Figura 1) (Champlin *et al.*, 1973). En cuyes la primera apertura ocurre a los 53 días y el primer estro a los 55 días (Loose & Terasawa, 1985)

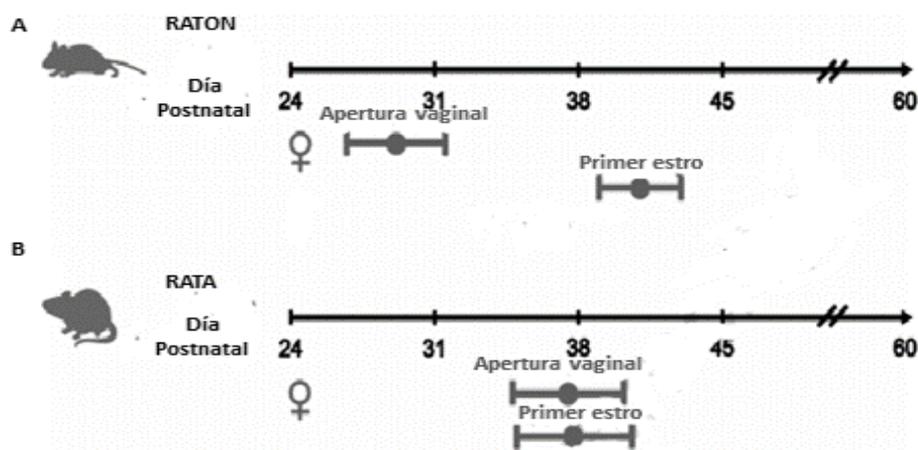


Figura 1. Ocurrencia de la primera apertura vaginal y primer estro en ratones y ratas hembra. A) En ratones la apertura vaginal ocurre a 29.12 días y el primer estro a 41.0 días, B). En ratas, la apertura vaginal ocurre al día 37.5 y el primer estro al día 37.8 **FUENTE:** Clark & Price, 1981, citado por Piekarski *et al.*, 2017

2.1.2. Ciclo estral

El ciclo estral es un conjunto de acontecimientos fisiológicos inducidos y regulados por GnRH, FSH, LH, progesterona, estradiol y prostaglandina a través de un sistema de retroalimentación positiva y negativa (Garverick & Smith, 1993).

El ciclo estral está conformado por cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro (Byers *et al.*, 2012), durante las cuales suceden una serie de cambios en las estructuras ováricas y concentraciones hormonales que conducen a la conducta de receptividad hacia el macho, ovulación y la preparación del tracto genital para la copula (Fatet *et al.*, 2011).

El proestro es el período en el que regresiona el cuerpo lúteo (luteólisis) del ciclo anterior y el período de crecimiento folicular (Guáqueta, 2009). Al producirse la luteólisis se origina una disminución de los niveles de progesterona y por efecto la retroalimentación negativa que ejercía sobre la secreción de GnRH. Asimismo, aumenta las frecuencias del pulso de LH y FSH seguida de un aumento en la secreción de estradiol producida por el crecimiento folicular (Pohler *et al.*, 2020).

Durante el estro, se continúa produciendo estrógenos. Estos elevados niveles inician el comportamiento de celo y receptividad sexual. Además, produce una retroalimentación positiva sobre el LH, desencadenando un pico preovulatorio, iniciando así la cascada de eventos intrafoliculares, desencadenando en la ovulación con la ruptura de los folículos ováricos y la liberación de ovocito (Garverick & Smith, 1993; Guáqueta, 2009).

El metaestro se caracteriza por el inicio de la formación de cuerpo lúteo a partir del folículo colapsado (cuerpo hemorrágico). Y un aumento en los niveles de progesterona debido a la luteinización de las células de la granulosa y teca (Forde *et al.*, 2011; Pohler *et al.*, 2020). El diestro es la fase del ciclo estral donde el cuerpo lúteo se desarrolla completamente y alcanza su máximo diámetro (Guáqueta, 2009) y la concentración de progesterona en sangre permanecen elevadas para la preparación del establecimiento y mantenimiento de la preñez (Niswender *et al.*, 2000). Las hembras en las que no se produjo el reconocimiento del embrión, el útero secreta prostaglandina que provocará lisis del cuerpo lúteo (Ginther, 1974), y es seguido del proestro y un ciclo subsiguiente. La duración de las distintas fases del ciclo estral en la rata, ratón y cuy se observa diferencias (ver Tabla 1).

Tabla 1. Duración de las distintas fases del ciclo estral en rata, ratón y cuy

| Especie | Rata | Ratón | Cuy |
|--------------------------|------------------------------|--------------|-----------------------------|
| Proestro | 12 horas | < 24 horas | 2-4 días |
| Estro | 12 horas | 12-48 horas | 6-11 horas |
| Metaestro | 21 horas | 24 horas | 2-4 días |
| Diestro | 57 horas | 48-72 horas | 8-10 días |
| Duración de ciclo estral | 4 días | 4-5 días | 15-17 días |
| Referencia | Paccola <i>et al.</i> (2013) | Allen (1922) | Lilley <i>et al.</i> (1997) |

a) Foliculogénesis

En mamíferos, el desarrollo folicular inicia durante la etapa fetal con la formación de folículos primordiales (Aerts & Bols, 2010). La foliculogénesis es un proceso que implica

el desarrollo de un folículo primordial en un folículo preovulatorio que liberará un ovocito en la ovulación (Garverick & Smith, 1993). Este proceso requiere de adecuadas señales intraováricas y extraováricas para completar con éxito el desarrollo folicular (Hernández *et al.*, 2012).

Las células germinales primordiales, que se encuentran en el saco vitelino migran hacia las crestas genitales en donde se formarán las futuras gónadas (Rimon-Dahari *et al.*, 2016). Durante la migración, experimentan proliferación activa y se diferencian en ovogonias. Luego entran a meiosis para iniciar la síntesis de ADN premeioico y detenerse en profase I (diploteno), denominándose ovocitos primarios (Rimon-Dahari *et al.*, 2016). Estos ovocitos se asocian y forman uniones con las células somáticas escamosas de la gónada que son consideradas precursores de la célula pre-granulosa para conformar el folículo primordial (Young & McNeilly, 2010). La transición de folículo primordial a primario está marcada por un cambio morfológico de células escamosas a cuboidales llamados células de la granulosa. Posteriormente, los folículos primarios se desarrollan para formar folículos secundarios. Estos folículos secundarios están conformados por dos a más capas de células de la granulosa y ovocitos en crecimiento. También se forma una membrana basal alrededor de la capa de células de la granulosa más externa y una capa adicional de células somáticas llamadas células de la teca que encapsula el folículo (Rimon-Dahari *et al.*, 2016).

Hasta el estadio de folículo secundario, se clasifican en folículos preantrales e independientes a las gonadotropinas y están regidas por comunicaciones bidireccionales entre el ovocito y las células somáticas a su alrededor (Rimon-Dahari *et al.*, 2016). A medida que el folículo sigue desarrollándose, se forma el folículo terciario o antral que se caracteriza por la formación del antro (espacio lleno de líquido que se unirá para formar la cavidad antral), una mayor proliferación de células de la granulosa y la teca y crecimiento del ovocito (Ozgur & Bulent, 2010). Este antro continuará aumentando de tamaño hasta adquirir las características de folículo preovulatorio. Este folículo presenta una cavidad más desarrollada, rodeada por varias capas de células de la granulosa y el ovocito se encuentra rodeado por células de la granulosa llamadas células del cúmulus (Aerts & Bols, 2010).

Sadeu *et al.* (2007) clasificaron los distintos estadios de folículos en el cuy, basándose en criterios morfológicos definidos por Pedersen & Peters (1968) (ver Tabla 2). Además, un diámetro folicular de más de 700 μm es clasificado como folículo preovulatorio en el cuy (Labhsetwar *et al.*, 1970; Hutz *et al.*, 1990; Logothetopoulos *et al.*, 1995).

Tabla 2. Clasificación y caracterización de folículos ováricos del cuy hembra (*Cavia porcellus*)

| Folículo | # folículos | N° Capas de células de la granulosa | Diámetro folicular ($\mu\text{m} \pm \text{DS}^*$) | Diámetro de Ovocito ($\mu\text{m} \pm \text{DS}$) |
|--------------------|-------------|-------------------------------------|--|---|
| Primario | 606 | 1-1.5 | 67.9 ± 10.1 | 44.8 ± 6.2 |
| Secundario pequeño | 364 | 2 | 96.5 ± 11.9 | 52.2 ± 6.0 |
| Secundario mediano | 672 | 2.5-3 | 136.5 ± 19.4 | 59.3 ± 6.7 |
| Secundario grande | 410 | >4 sin antro | 188.9 ± 29.7 | 72.8 ± 9.1 |
| Antral | 485 | Presencia de antro | 231.0 ± 56.1 | 78.9 ± 9.3 |

* DS: Desviación estándar

FUENTE: Sadeu *et al.*, 2007

b) Ovulación

La ovulación de un ovocito es un proceso estrictamente regulado por múltiples sistemas fisiológicos para asegurar su oportuna liberación desde el ovario hacia el oviducto para su posterior fecundación (Robker *et al.*, 2018).

Los folículos antrales durante su crecimiento secretan estrógeno, los cuales en niveles altos producen una retroalimentación positiva sobre GnRH, aumentando la frecuencia de los pulsos de GnRH y preparan a los gonadótropos de la pituitaria anterior para secretar LH, lo que resulta en niveles elevados y sostenidos de esta hormona (Duffy *et al.*, 2019). Este pico de LH es necesario tanto para la maduración como para la ovulación de los ovocitos. El folículo sufre una remodelación que incluye la degradación de la pared folicular y degradación de la membrana basal, además de la expansión y mucificación de células del *cumulus* que rodean al ovocito y la reanudación de la meiosis del ovocito (Acosta & Miyamoto, 2004). Una vez que se libera el ovocito, las células residuales de la granulosa y la teca sufren una reprogramación celular en la que comienzan a hipertrofiarse, absorben material lipídico y se convierten en células lúteas para crear el cuerpo lúteo (Rimon-Dahari *et al.*, 2016).

La ovulación tanto en roedores como cuyes son múltiples y espontáneas. Sin embargo, en los roedores, la ovulación está estrechamente relacionado con la hora del día e influido por el ciclo de luz y oscuridad (Everett & Sawye, 1950; Cora *et al.*, 2015). Ratas en condiciones de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, la ovulación ocurre durante las primeras horas

de la mañana del estro, aproximadamente 10 a 12 horas después del aumento de la LH (Goldman *et al.*, 2007). En ratones con las mismas condiciones de luz y oscuridad, el pico de LH se produce entre las 4 y 5 de la tarde del día del proestro y la ovulación 12 horas después, entre la 1 y las 8 de la mañana del día del estro, con marcada tendencia a localizarse en la mitad del período de oscuridad (Galassi & Gullace, 2014).

En el caso de los cuyes, existe una menor influencia de la luz sobre la ovulación por lo que la ovulación puede ocurrir durante el día o la noche (Reed *et al.*, 1979). La ovulación ocurre de 10 a 12 horas después de iniciado el estro (Myers *et al.*, 1936) y de 8 a 12 horas después de un aumento de progesterona durante la fase preovulatoria (Feder *et al.*, 1968).

c) Cambios celulares

El ciclo estral también es caracterizado por cambios morfológicos en el ovario, útero y vagina (Goldman *et al.*, 2007). Stockard & Papanicolaou (1917) y Long & Evans (1922) observaron cambios cíclicos de las células presentes en el lumen vaginal durante el ciclo estral en cuyes y ratones respectivamente. La apariencia de estas células se correlaciona con el estado de la mucosa vaginal, el útero y los ovarios y está relacionada con cambios en las concentraciones circulantes de esteroides sexuales y gonadotropinas (Goldman *et al.*, 2007).

El estrógeno es la hormona principal que impulsa cambios en la mucosa vaginal (Gimenez-Conti *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1989). Tiene la capacidad de iniciar la división celular, causar proliferación, diferenciación y exfoliación de las células (Schutte, 1967). La acción del estrógeno induce la hipertrofia de células epiteliales y diferenciación celular mediada por queratina (Figura 2). Además, suprime la infiltración de neutrófilos al minimizar el nivel de producción de citocinas.

La proliferación ocurre en las capas más profundas (capa basal) y las células se van diferenciando a medida que avanzan hacia la superficie (Gimenez-Conti *et al.*, 1994).

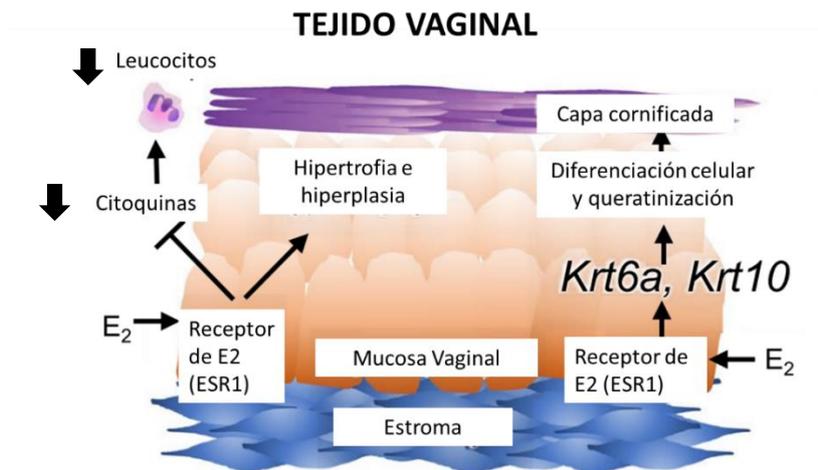


Figura 2. Acción del estrógeno sobre las células epiteliales de la mucosa vaginal
FUENTE: Adaptado de Li *et al.*, 2018).

El proceso de diferenciación es característico de los epitelios que cubren la piel y la mayoría de las mucosas superficiales (Gimenez-Conti *et al.*, 1994) e implica un aumento de tamaño y cambio morfológico de las células, la degeneración del núcleo (picnosis) y la aparición de queratina en la célula (Ver Figura 3).

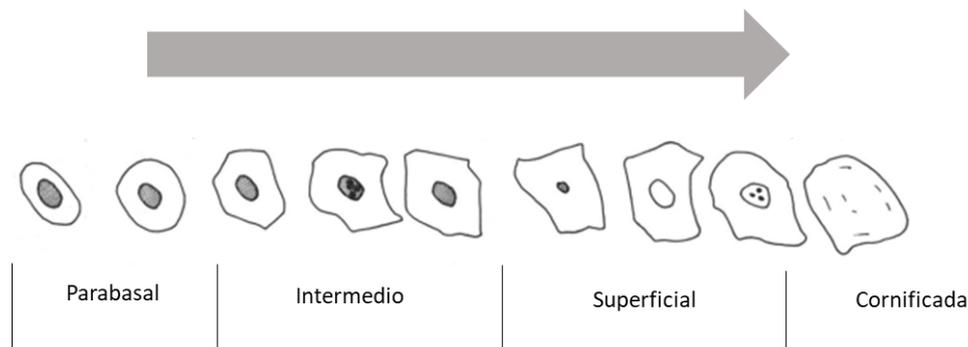


Figura 3. Proceso de diferenciación de células que conforman la mucosa vaginal
FUENTE: Adaptado de Christie *et al.*, 1972

Varios investigadores, han descrito los cambios en los estratos de la mucosa vaginal durante el ciclo estral en roedores, caracterizando los cambios histológicos (Allen, 1922; Burgo & Wislocki, 1956; Li & David, 2007; Westwood, 2008; Gal *et al.*, 2014). Indicando, que, durante el proestro, el epitelio vaginal aumenta y alcanza su mayor grosor (Burgos & Wislocki, 1956; Walmer *et al.*, 1992), formado por el estrato germinal, el estrato granuloso y estrato mucificado. A medida que aumentan los niveles de estrógeno en el proestro, las células superficiales se someten a queratinización (Montes & Luque, 1988) dando como resultado una "línea rosa" entre el estrato mucificado y granuloso (proestro tardío) (Gal *et al.*, 2014) (ver figura 4A). Seguidamente, el estro se define cuando el estrato córneo se

vuelve superficial (Westwood, 2008; Gal *et al.*, 2014) (ver Figura 4B). Posteriormente, ocurrida la ovulación, disminuye el nivel de estrógeno y al final del estro se caracteriza por el desprendimiento casi completo de estrato córneo (Westwood, 2008). Durante el metaestro se observa una deslaminación continua de las células epiteliales con una pérdida progresiva del estrato granuloso y del estrato germinativo superior (Hubscher *et al.*, 2005; Westwood, 2008) (ver Figura 4C). Además, se observa una infiltración variable y progresiva de leucocitos (Hubscher *et al.*, 2005). En el metaestro temprano se observa restos de células cornificadas presentes en el lumen vaginal (Walmer *et al.*, 1992). El inicio del diestro está marcado por el grosor de la mucosa vaginal que alcanza su nivel más bajo (Hubscher *et al.*, 2005; Westwood, 2008) filtrándose libremente los leucocitos (Allen, 1922). Los estratos externos como el estrato mucificado, córneo y granuloso están ausentes (Li & Davis, 2007) (ver Figura 4D). Al final de esta fase se observa el engrosamiento del epitelio y una notable reducción de infiltración de leucocitos (Allen, 1922; Hubscher *et al.*, 2005).

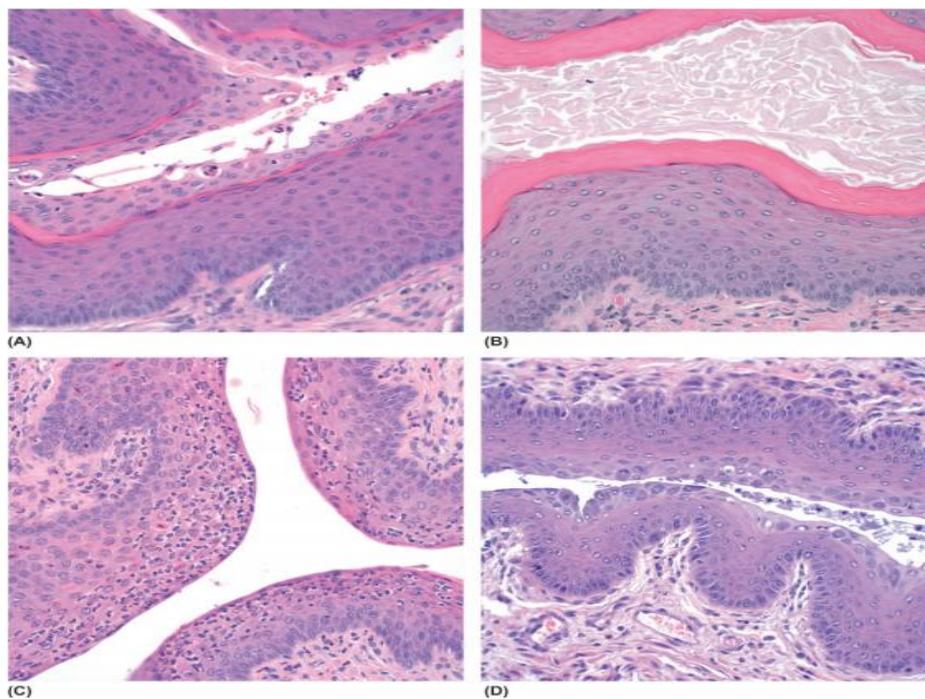


Figura 4. Cambios en el epitelio vaginal del ratón durante el ciclo estral. (A) Proestro, la mucosa tiene un grosor de 10-13 células y las capas externas se tiñen ligeramente de eosina, mientras que la capa de la granulosa muestra cornificación creciente. (B) Estro, la mucosa tiene aproximadamente un grosor de 12 células. La capa superficial nucleada se pierde y la capa cornificada se vuelve superficial. (C) Metaestro, la capa cornificada se deslaminada y los leucocitos comienzan a aparecer debajo del epitelio. (D) Diestro, la mucosa tiene un grosor de 4 a 7 células, y existe moco y leucocitos en el lumen

FUENTE: Boyd *et al.*, 2018

2.1.3. Gestación y parto

El período de gestación comprende desde la fecundación del óvulo, la implantación del embrión en la pared uterina, la formación de las membranas fetales, el crecimiento gradual del feto y su expulsión (Carson *et al.*, 2000). El período de gestación varía según las especies. En ratones el promedio es de 19 a 20.5 días (Malik *et al.*, 2021); en ratas es de 21 días (Furukawa *et al.*, 2013) y en cuyes es de 66-72 días (Martensson, 1984).

En ratas y ratones, la progesterona producida por el cuerpo lúteo es la principal fuente y es indispensable durante toda la gestación (Sanyal, 1978). En el caso de cuyes, el cuerpo lúteo produce progesterona y es la principal fuente hasta el día 18-21 días que es cuando la progesterona placentaria es suficiente para mantener la gestación (Deanesly, 1963). Después del parto, los cuyes tienen la capacidad de presentar celo postparto (Chauca *et al.*, 1992) que está asociado a la ovulación. Este celo ocurre a las dos horas de producido el parto.

2.2. Control del ciclo estral

La sincronización del celo y ovulación, son procedimientos muy importantes para la aplicación de la inseminación artificial, protocolos de superovulación y la transferencia de embriones realizados en programas de mejoramiento animal y trabajos de investigación (Pallares & Gonzales, 2009).

La sincronización del ciclo estral se realiza con la aplicación exógena de una combinación de hormonas. Habitualmente los factores luteolíticos (prostaglandina F₂ α , y sus análogos) y progestágenos (progesterona y sus análogos) son hormonas comúnmente utilizadas. La aplicación de PGF₂ α provoca la lisis del cuerpo lúteo en los mamíferos (McCracken *et al.*, 1972), dando paso a una fase folicular con ovulación. Por otro lado, las hormonas progestágenas se aplican durante varios días para imitar la actividad secretora de un cuerpo lúteo durante la fase lútea. Al retirar la hormona, inducirá una fase folicular y por lo tanto la ovulación (Pallares & Gonzales, 2009).

Uno de los protocolos de sincronización del ciclo estral en cuyes más usados consiste en la implantación de un tubo subdérmico (1 cm de largo, 0.4cm de diámetro) que contiene progesterona. Este implante se coloca independientemente del ciclo estral en el que se encuentra el animal. Durante todo el tratamiento se inhibe la ovulación y recién se produce la ovulación en el quinto o sexto día posterior a la extracción del implante (Kosaka *et al.*, 1993). Grégoire *et al.* (2012) propuso otro método en el cual administró un progestágeno

(Altrenogest equino, 0.22mg/kg) durante 15 días. Del tercer al sexto día posterior a la última dosis de Altrenogest se indujo la ovulación.

El protocolo de superovulación después de la sincronización del ciclo estral, en la mayoría de los roedores se suele usar para recolectar ovocitos maduros de los oviductos. La recolecta de suficientes ovocitos es importante para la tecnología reproductiva como fecundación in vitro, cultivo in vitro y criopreservación de embriones (Hasegawa *et al.*, 2016). Por lo tanto, se han hecho diversos estudios para optimizar regímenes prácticos de superovulación. Generalmente los protocolos de superovulación consisten en la hiperestimulación del desarrollo folicular e inducción de la ovulación (Hasegawa *et al.*, 2016). En los regímenes de superovulación se usa generalmente la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Hasegawa *et al.*, 2016).

2.3. Método de estudio a nivel celular y tisular

La célula es la unidad que conforma el tejido. Estos tejidos se integran para formar los órganos que son estructuras más complejas y que efectúan funciones esenciales. Por último, estos órganos se agrupan para constituir los sistemas. De manera que para entender todos los niveles de organización es esencial conocer a las células y los tejidos (Saavedra, 2014)

Cuando hay alteraciones de un órgano o sistema del ser vivo, se observa que estos cambios se originan a nivel celular. Para estudiar la morfología de estas células se usa la citología (estudia células aisladas) e histología (estudia la estructura y disposición de las células) (Saavedra, 2014).

2.3.1. Citología

La citología como rama de la biología, estudia el origen, desarrollo, forma, dimensión, estructura, constitución física y química de la célula, así como la relación entre ellas. Por otro lado, dentro de la anatomía patológica, la citología se encarga de diagnosticar enfermedades a través de cambios morfológicos de células que ocurren durante el transcurso de la enfermedad (Durdu, 2019). En el año 1941, George Papanicolaou demostró el valor de la citología como diagnóstico precoz de cáncer de cuello uterino, basándose en el estudio de células de la superficie de la zona de transformación cervical presentes en el frotis (Sheff & Singh, 2013).

La citología también se usa en el estudio de animales como rata y ratón (Montes & Luque, 1988; Cooper & Goldman, 1999; Pessina *et al.*, 2006), perros (Holst & Phemister, 1975) y

cuyes (Kühnel & Mendoza, 1992; Lilley *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 2003; Aranibar *et al.*, 2014), para determinar el estado del ciclo estral. La citología vaginal se basa en la determinación de cambios celulares cíclicos que ocurren en el epitelio vaginal como resultado de los niveles de hormonas reproductivas, especialmente el estrógeno (Wright & Parry, 1989).

Las células vaginales se pueden recolectar realizando un frotis del canal vaginal usando un hisopo de algodón humedecido (Byers *et al.*, 2012) o un lavado vaginal inoculando solución salina estéril en la cavidad vaginal y aspirando el contenido (Caligioni, 2009). El hisopo o el líquido se extiende uniformemente sobre el portaobjetos. El frotis se puede evaluar inmediatamente (Marcondes *et al.*, 2002; Caligioni, 2009) o se puede teñir usando tinciones como de Papanicolaou (Lilley *et al.*, 1997; Hubscher *et al.*, 2005), azul de toluidina (Cora *et al.*, 2015) entre otros. La evaluación de los frotis vaginales se realiza con un microscopio con aumento de 10 X a 40 X (Cora *et al.*, 2015).

Existen diferentes tipos de células epiteliales vaginales y se clasifican en células basales, parabasales, intermedias, superficiales y cornificadas (Christie *et al.*, 1972; Montes & Luque, 1988) como se observa en la tabla 3 y se diferencian en base al tamaño, forma y morfología del núcleo (Wright & Parry, 1989).

Tabla 3. Clasificación de células del epitelio vaginal de ratas bajo influencia de estrógeno

| Tipo de célula | Tamaño | Forma | Núcleo |
|----------------|---------|----------------|------------|
| Basal | Pequeño | Redondeado | Grande |
| Parabasal | Pequeño | Redondeado | Grande |
| Intermedio | Mediano | Oval-Poligonal | Mediano |
| Superficial | Grande | Poligonal | Picnótico |
| Cornificado | Grande | Poligonal | Sin núcleo |

FUENTE: Montes & Luque, 1988

La citología vaginal predice las fases del ciclo estral basándose en las proporciones de las células encontradas en el frotis vaginal (Goldman *et al.*, 2007; Caligioni, 2009) como se muestran en la Tabla 4. En el proestro, el frotis se caracteriza por la presencia de células

nucleadas como las células parabasales que son pequeñas, redondas con un gran núcleo e intermedias que puede tener forma redonda o contorno poligonal e irregular siendo esta última predominantemente (Montes & Luque, 1988). También se observan células superficiales que tienen bordes irregulares y núcleo picnótico. El número de leucocitos en el frotis son mínimos. El estro consiste predominantemente en células cornificadas que tienen bordes irregulares y carecen de núcleo (Long & Evans, 1922; Cora *et al.*, 2015; Marcondes *et al.*, 2002; Lilley *et al.*, 2007). Durante el metaestro se observa una mezcla de tipos celulares incluida las células cornificadas, células superficiales y células parabasales. A medida que progresa el metaestro, los leucocitos se infiltran en el epitelio vaginal y se vuelven muy numerosos, superando en número a las células epiteliales hasta diez veces (Hubscher *et al.*, 2005). La fase de diestro es la más larga y durante esta fase se muestra principalmente leucocitos y algunas células parabasales y un número reducido de células superficiales (Lilley *et al.*, 1997; Cora *et al.*, 2015).

Tabla 4. Tipos de células epiteliales y sus frecuencias relativas observadas en frotis vaginales preparados a partir de muestras recolectadas de cuy en las cuatro etapas del ciclo estral

| Estadio del ciclo estral | Célula Cornificada | Célula Superficial | Célula Intermedio | Célula Parabasal | Leucocitos |
|--------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------|
| Proestro | - | 1+ a 2+ n | 2+ a 3+ | 1+ a 2+ | 1+ |
| Estro | 4+ | - | 1+ | 1+ | 1+ |
| Metaestro | 2+ a 4+ | - | 1+ | 1+ a 2+ | 2+ a 4+ |
| Diestro | 1+ | 1+ | 1+ | 2+ a 3+ | 2+ a 3+ |

Nota: El frotis vaginal fue teñido usando el método Papanicolaou; se identificaron los tipos de células en los frotis y se determinó sus frecuencias relativas con los otros tipos de células. La frecuencia relativa de los tipos de células varió de 1+ (0 a 10%) a 4+ (80 a 100%).

FUENTE: Adaptado de Lilley *et al.*, 1997

Stockard y Papanicolaou (1917) relacionaron los cambios que se muestran en los frotices vaginales con eventos producidos en el ovario, encontrando coincidencia entre la ovulación y el momento de infiltración leucocítica en el frotis vaginal. Posteriores investigadores como Young *et al.*, (1933) y Hermreck & Greenwals (1964) tomaron la infiltración leucocítica del frotis vaginal después de encontrar en el frotis la predominancia de células cornificadas para indicar la ovulación. En base a estos estudios, muchos autores como Norris & Adams (1979), Lilley *et al.* (1997), Shi *et al.* (2000). Luna *et al.* (2003), Susuki *et al.* (2003),

Grégoire *et al.*, (2012) y Aranibar *et al.*, (2014) consideran este criterio para estimar el momento de ovulación en cuyes.

2.3.2. Histología

La histología es el estudio microscópico de material biológico y se emplea para analizar células y tejidos que componen los diversos órganos. Siendo el enfoque, el estudio de la estructura y disposición de las células optimizando funciones específicas de cada órgano (Schatten, 2007).

La técnica histológica abarca una serie secuencial de pasos a través de los cuales una muestra de tejido llega a transformarse en delgados cortes teñidos que pueden ser observados en el microscopio. El primer paso es la fijación del tejido el cual previene la actividad proteolítica y los cambios morfológicos que pueda ocurrir a las células (Dey, 2018b). El siguiente paso es proporcionar la suficiente rigidez al tejido para poder seccionarlos en capas delgadas que puedan atravesar la luz para su examen microscópico. Para lograrlo, primero se debe deshidratar el tejido por completo. Se suele usar el alcohol. Luego es necesario impregnar el tejido con un agente de transición entre la deshidratación e impregnación. Esta sustancia aclarante debería ser miscible entre ambos agentes. Generalmente se usa el xileno, siendo el siguiente paso la impregnación del tejido en un medio adecuado que proporcione una adecuada rigidez, para ello, generalmente se usa la parafina (Dey, 2018b).

Posteriormente se divide el tejido en secciones delgadas y se monta en las láminas para su posterior tinción. La hematoxilina es el colorante más usado en los laboratorios (Chan, 2014) y se usa comúnmente con la eosina para la visualización morfológica de muestras histológicas de rutina. La hematoxilina tiñe los núcleos de color negro azulado (Dey, 2018a). Para el aclarado y montaje se usa generalmente el bálsamo de Canadá. Este último paso es importante ya que mantendrá al tejido aislado del aire y deshidratado.

Los tejidos que componen el sistema reproductivo han sido estudiados histológicamente, principalmente el ovario, útero y vagina en especies como la rata (Westwood., 2008), y ratón (Li & Davis, 2007; Gal *et al.*, 2014). Los del ovario se usan para diversos estudios como el desarrollo de folículos preantrales y folículos antrales (Peddie, 1980a; Logothetopoulos *et al.*, 1995), el proceso de atresia (Takagi *et al.*, 2007) así como el desarrollo de cuerpo lúteo y su regresión (Azmi *et al.*, 1984). Con la histología también se puede interpretar la maduración del tracto genital y describir su curso durante todo el ciclo estral (Li & Davis,

2007; Boyd *et al.*, 2018). Wallmer *et al.*, (1992), Li & Davis (2007), Gal *et al.* (2014) utilizaron la histología vaginal para clasificar la etapa del ciclo estral en roedores.

Usando la histología se puede identificar al epitelio escamoso estratificado queratinizado que conforma la vagina. Este tejido está compuesto por la capa muscular (M), la lámina propia (LP) y la mucosa vaginal (VM) (Boyd *et al.*, 2018 (ver figura 5).

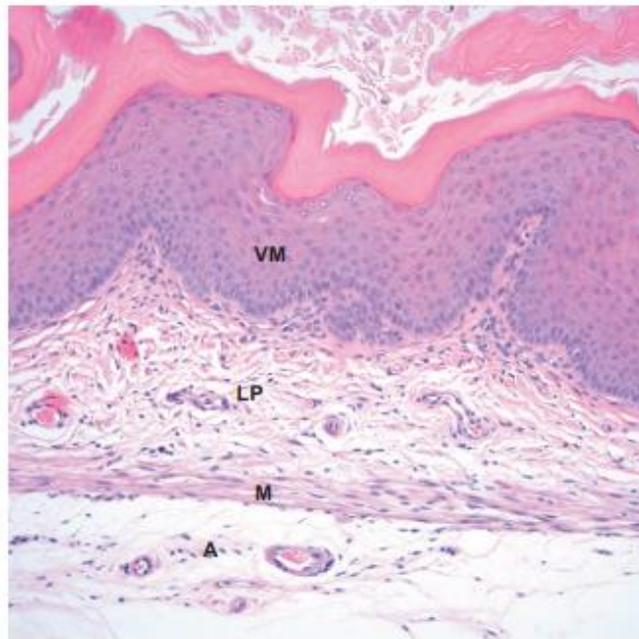


Figura 5. Sección histológica transversal en donde se muestra las capas que conforman el tejido vaginal del ratón (Boyd *et al.*, 2018). M. Capa muscular. LP. Lamina propia. VM. Mucosa vaginal.

La mucosa vaginal está conformada por distintos estratos. El estrato germinativo consiste en un estrato basal conformado por una sola capa de células epiteliales columnares y un estrato espinoso externo con múltiples capas de células poliédricas (Westwood, 2008). Estas células tienen forma cúbica y presentan un núcleo grande (Gupta *et al.*, 1989). El estrato granuloso consta de células aplanadas que contienen gránulos de queratohialina. Las células tienen forma de polígono aplanado con núcleo alargado (Gupta *et al.*, 1989). El estrato mucificado consta de células cuboides a ovoides con vacuolas citoplasmáticas que contienen mucina. El estrato corneo consta de células queratinizadas que no presentan intersticio entre ellas y se mantienen junta (Westwood, 2008)

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar y fecha

El trabajo experimental de campo y laboratorio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Animales Menores del Programa de Animales Menores, y el Laboratorio de Histología y Citología del Centro de Investigación en Tecnología de Embriones, Programa de Mejoramiento Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina. Y se desarrolló durante los meses de octubre del 2020 hasta abril del 2021.

3.2. Diseño experimental

Cuyes hembras (n=36) de 5 a 6 meses de edad fueron dosificadas con progesterona 0,06 ml de solución Altrenogest (0.22mg/Kg PV) vía oral por 15 días continuos (día 0, última dosis de Progesterona) para la sincronización de ciclo estral, siguiendo los protocolos de Grégorie *et al.* (2012) y Alvarado E. (Comunicación personal). Las hembras sincronizadas fueron distribuidas al azar en seis grupos (G1, G2, G3, G4, G5 y G6) cada uno con seis animales (ver Figura 6).

A las 72 (G1), 84 (G2), 96 (G3), 108 (G4), 120 (G5) y 132 horas (G6) después de la última dosis de Altrenogest, se evaluó la presencia de apertura vaginal y se realizó el hisopado vaginal para evaluar la presencia de células epiteliales vaginales. Inmediatamente se benefició a los animales por desnucamiento y se extrajo muestra de tejido vaginal y ovárico para su posterior evaluación histológica.

La ventana de ovulación (\pm 12 h) fue determinada objetivamente por histología ovárica siguiendo los procedimientos descritos por Chaves *et al.* (2008). Posteriormente, esta información fue contrastada con la presencia de apertura vaginal, citología exfoliativa vaginal e histología vaginal con el fin de relacionar y predecir el momento de ovulación en el cuy.

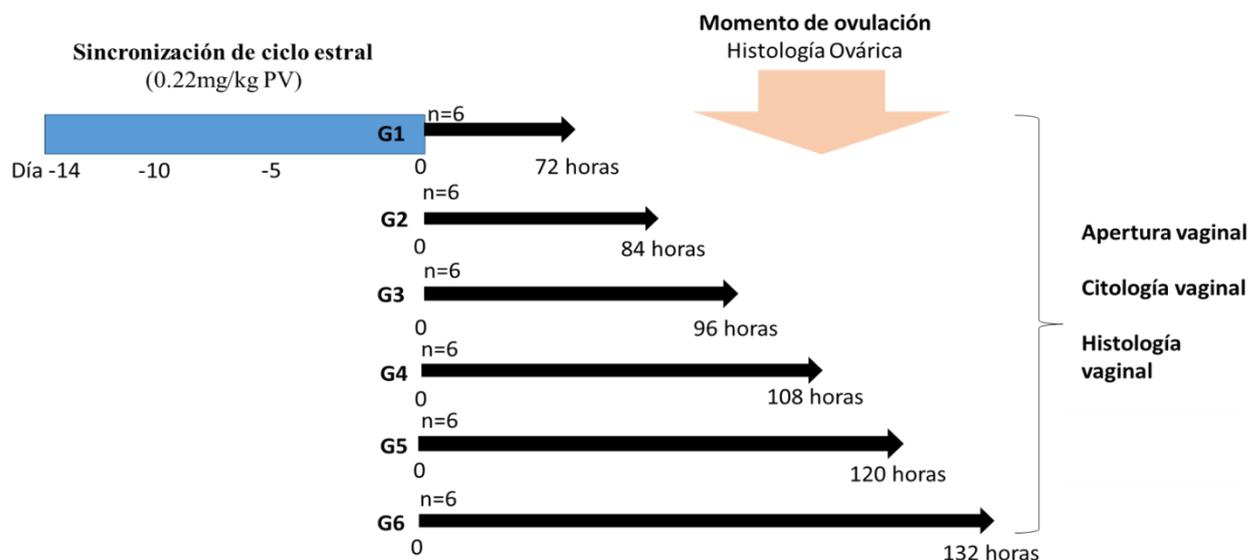


Figura 6. Diseño experimental para predecir el momento de ovulación en el cuy hembra (*Cavia porcellus*)

3.3. Animales y alimentación

Las hembras utilizadas para este experimento corresponden a la línea mejorada UNALM con 5 o 6 meses de edad y peso vivo promedio de 1020 g (Anexo1) Los cuyes se distribuyeron en jaulas y recibieron alimento en polvo y maíz chala fresca a razón de 10% del peso vivo del animal y agua *ad libitum*. Luego de un período de adaptación de 7 días, los animales fueron incluidos en los grupos experimentales.

3.4. Sincronización de ciclo estral

Los animales fueron dosificados con 0,06 ml de solución de progesterona- Altrenogest (0.22mg/Kg PV) (Regu-Mate Porcina®, Merck) vía oral por 15 días continuos para sincronizar su ciclo estral, siguiendo los protocolos de Grégorie *et al.* (2012) y Alvarado E., Comunicación personal.

3.5. Apertura vaginal

La presencia de apertura vaginal se determinó a las 72 (G1), 84 (G2), 96 (G3), 108 (G4), 120 (G5) y 132 horas (G6) post última dosis de progesterona, previo al desnuque del cuy. Para la medición, se sujetó, levantó y observó el área de la vulva del cuy para verificar la presencia de apertura de la membrana vaginal. La variable de la apertura vaginal (AP) de cada animal se cuantificó en función del orificio vaginal. Si el orificio vaginal está cerrado

o se semicerrado se cuantificó como 0 (Ver figura 7A). Si el orificio estaba completamente abierto se cuantificó como 1 (Ver figura 7B) (Luna *et al.*, 2003; Sadeu *et al.*, 2007).

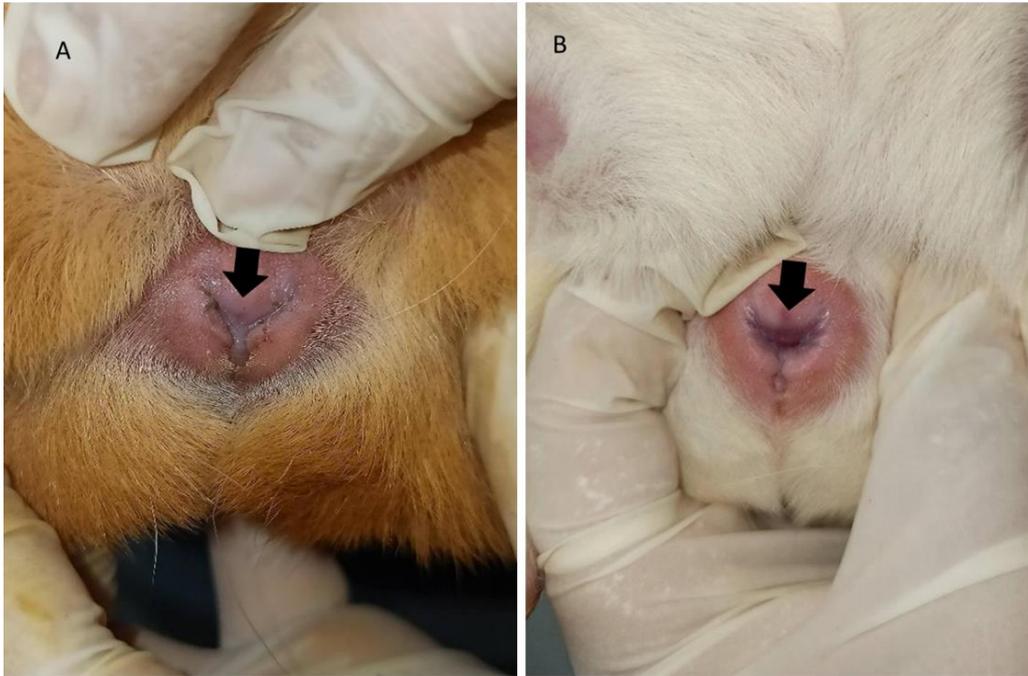


Figura 7. Ausencia y presencia de apertura vaginal en el cuy hembra. A) Ausencia de apertura vaginal (flecha negra); B) Presencia de apertura vaginal (flecha negra).

3.6. Citología vaginal

El hisopado se realizó a las 72 (G1), 84 (G2), 96 (G3), 108 (G4), 120 (G5) y 132 horas (G6) post última dosis de progesterona, previo al desnucamiento del cuy. Antes de realizar el frotis vaginal a la hembra, se limpió el área anogenital del animal. Para el hisopado vaginal, se humedeció un hisopo estéril en solución fisiológica y se introdujo en la vagina, rotándolo vigorosamente contra la pared vaginal con el fin de recolectar las células del epitelio vaginal (Figura 8). Posteriormente, la torunda del hisopo se hizo rodar sobre un portaobjeto de vidrio de forma paralela formando dos trazos e inmediatamente fijada con un spray fijador (M-Fix Fijador pulverizable). Las células adheridas a la lámina fueron teñidas usando el método Papanicolaou (Tabla 5).



Figura 8. Hisopado vaginal del cuy hembra

Tabla 5. Protocolo de tinción Papanicolaou modificado

| | |
|------------------------------|------------------|
| Etanol 70% | 1 minuto |
| Etanol 50% | 1 minuto |
| Agua destilada | Sumergir 5 veces |
| Hematoxilina de Harris | 3,5 minutos |
| Agua destilada | Sumergir 5 veces |
| 0.25% solución de HCl | Pocas sumergidas |
| Agua de caño | 1 minuto |
| Carbonato de Litio | 1,5 minutos |
| Agua de caño | Pocas sumergidas |
| Etanol 70% | 2 minutos |
| Etanol 90% | 2 minutos |
| Orange G | Pocas sumergidas |
| Etanol 95 % | 2 minutos |
| EA modificado | 2 minutos |
| Alcohol absoluto | 2 minutos |
| Alcohol absoluto | 2 minutos |
| Alcohol absoluto | 2 minutos |
| Xileno | 5 minutos |
| Xileno | Hasta limpiar |
| Montar con bálsamo de Canadá | |

FUENTE: Dey et al., 2018c

Se capturó 30 campos de forma aleatoria utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss TM Primo Star Hak/Les) equipado con una cámara digital a un objetivo de 400X y se identificó el tipo de células epiteliales (Parabasales, Intermedias, Superficiales y Cornificadas) y leucocitos (Schutte, 1967; Montes & Luque, 1988).

Las células se identificaron observando su morfología. Las células Parabasales (PB) son las células epiteliales más pequeñas (Figura 9A). Tienen forma redondas u ovaladas al igual que su núcleo que tiene contorno liso. El núcleo ocupa casi en su totalidad del citoplasma. Su citoplasma es denso; teñido con la tinción Papanicolaou se observa de color azul. Las células intermedias(I) son células más grandes que las Parabasales (Figura 9B). Presentan núcleo con cromatina granular. Estas células presentan variaciones de tamaño y forma. Pueden ser redondas a elípticas o puede tener un borde citoplasmático irregular y angulado. Con la tinción Papanicolaou se observa de color azul más traslucido. Las células superficiales(S) son grandes, aplanados, de forma poligonal (Figura 9C). El núcleo de estas células es pequeño, picnótico y oscuro. Su citoplasma se tiñe de rosa con la tinción Papanicolaou. Las células cornificada (C) son células queratinizadas, presentan borde citoplasmático irregular y carecen de núcleo (Figura 9D). Con la tinción Papanicolaou se tiñen de color naranja. Los leucocitos son muy pequeños, redondos y poseen núcleos multilobulados (Cora *et al.*, 2015).

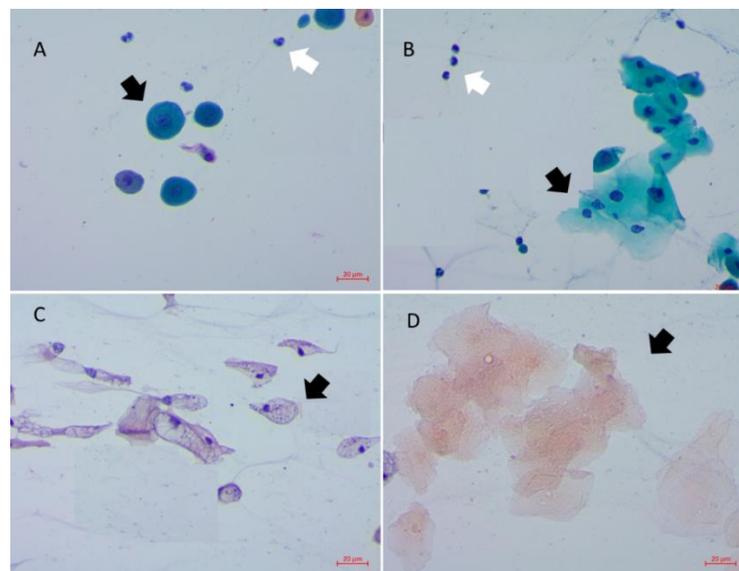


Figura 9. Tipos de células epiteliales vaginales teñidas en tinción Papanicolaou y objetivo de 400X. A. Célula parabasal (flecha negra), leucocitos (flecha blanca); B. Célula intermedia (flecha negra), leucocitos (flecha blanca); C. Célula superficial (flecha negra); D. Célula cornificada (flecha negra).

Las células epiteliales fueron contabilizadas para luego obtener el porcentaje de cada tipo de célula epitelial (PB%, I%, S%, C%). La Celularidad del frotis (CF) fue en función valores relativos del 0 al 10 (valor 0 (0-99 células epiteliales), valor 1 (100-300 células epiteliales), valor 2 (301-600 células epiteliales), valor 3 (601-900 células epiteliales), valor 4 (901-1200 células epiteliales), valor 5(1201-1500 células epiteliales), valor 6 (1501-1800 células epiteliales), valor 7 (1801-2100 células epiteliales), valor 8 (2101-2400 células epiteliales), valor 9 (2401-2700 células epiteliales), valor 10 (2701-3000 células epiteliales). De la misma manera se clasificó el número de leucocitos presentes en el frotis (LEU).

3.7. Histología ovárica

Los animales fueron beneficiados por desnucamiento a las 72 (G1), 84 (G2), 96 (G3), 108 (G4), 120 (G5) y 132 horas (G6) post última dosis de progesterona. Para luego poder recuperar los ovarios (izquierdo y derecho) de cada hembra. Cada tejido fue limpiado del resto de tejido graso y lavados en solución salina y alcohol a 70°. Los ovarios fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 24 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo, fueron deshidratados sucesivamente durante 1 hora en gradientes de etanol de 80%, 90% y tres veces en 100%. Luego se incubó 3 veces en Xilol para luego ser embebidas en parafina y seccionadas en cortes de 7µm de espesor y montada cada décima sección de los ovarios en portaobjetos. Posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina (Tabla 6).

Tabla 6. Protocolo de tinción con Hematoxilina Eosina

| | |
|---------------------------|----------------|
| Xilol desparafinizante I | 15 minutos |
| Xilol desparafinizante II | 15 minutos |
| Alcohol absoluto I | Sumergir 1 vez |
| Alcohol 90% | Sumergir 1 vez |
| Alcohol 80% | Sumergir 1 vez |
| Alcohol 70% | Sumergir 1 vez |
| Baño en agua de caño | Sumergir 1 vez |
| Hematoxilina | 2 minutos |
| Baño en agua de caño | Retirar exceso |
| Eosina | 30 segundos |
| Alcohol absoluto I | Sumergir 1 vez |
| Alcohol absoluto II | Sumergir 1 vez |
| Alcohol absoluto III | Sumergir 1 vez |
| Xilol I | Sumergir 1 vez |
| Xilol II | Sumergir 1 vez |
| Xilol III | Sumergir 1 vez |

FUENTE: *Chaves et al., 2008*

Las muestras histológicas procesadas fueron evaluadas bajo un microscopio a 4X, para la identificación, medición y conteo de folículo antrales sanos y atrésicos y cuerpos lúteos en formación. Se calculó el diámetro de cada folículo antral a partir de la media de dos diámetros de ángulo recto, medidos en la sección en que el folículo parecía más grande (Perry & Rowlands, 1963; Peddie, 1980a).

Los folículos antrales viables se definieron como aquellos en los que las células de la granulosa estaban intactas y no mostraba atresia ni núcleo picnóticos (Ver Figura 10A). Mientras que los folículos atrésicos mostraban células de la granulosa picnóticas, fragmentos de células apoptóticas en la periferia del antro o desprendidos hacia el antro, además el grosor de la capa de la granulosa se reduce drásticamente (Ver imagen 10B) (Peddie, 1980 b; Logothetopoulos *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2010).

Los folículos antrales viables y atrésicos después de ser identificado, fueron medidos usando la herramienta de medición Image J, cuando se observaba la presencia del ovocito en la sección histológica, para descartar un conteo doble del mismo folículo. Y fueron clasificados siguiendo el criterio de Peddie (1980a) en rangos de 100-300 μ m, 301-500 μ m, 501-700 μ m y > 700 μ m (Folículos preovulatorios) (Ver Figura 10C)

Los cuerpos lúteos recién formados (ver Figura 10D) también se identificaron y contabilizaron. Las características histológicas de los cuerpos lúteos temprano son; presencia de células basófilas con morfología similar a la granulosa, la presencia de vasos sanguíneos grandes, además de cavidades dentro del cuerpo lúteo (Westwood, 2008).

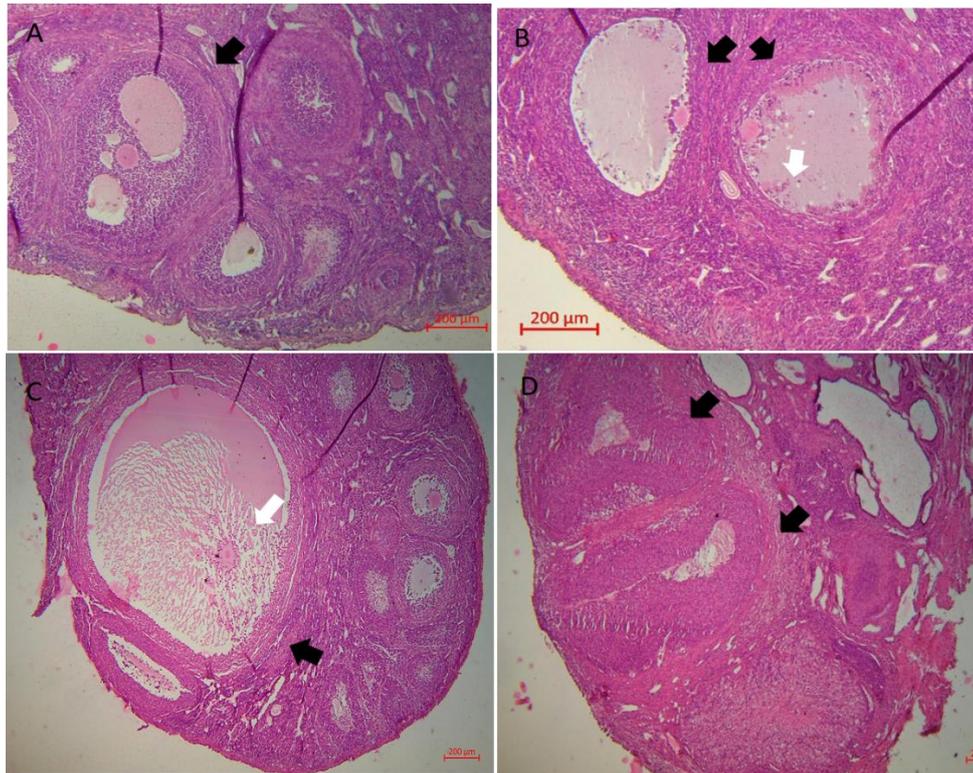


Figura 10. Sección histológica de ovario del cuy hembra teñido con Hematoxilina-eosina, objetivo a 40x. Se observa folículo antral viable, folículo antral atrésicos, folículo preovulatorio, cuerpo lúteo en formación y cuerpo lúteo atrésicos. A) Folículo antral viable (flecha negra); B) Folículo antral atrésico (flecha negra), células de la granulosa desprendidos (flecha blanca); C) Folículo preovulatorio con expansión de células de cumulus que envuelven al ovocito (flecha negra), células de cumulus en expansión (flecha blanca); D) Cuerpo lúteo en formación (flecha negra).

3.8. Histología vaginal

Para obtener el tejido vaginal se seleccionó la porción media de la vagina y se realizó una incisión en la línea media de la pared interior de la vagina, desde el cuello uterino hacia la vulva. Posteriormente fue fijado en paraformaldehído al 4% por 24h a 4°C. Luego, se seccionó sagitalmente dos muestras aleatorias de 15mm de largo y 2mm de grosor de la parte media de la vagina. Las secciones se procesaron histológicamente siguiendo el protocolo descrito por Chaves *et al.* (2008). Las dos muestras emblocadas fueron seccionadas en cortes de 5 µm de espesor y se seleccionaron tres cortes no consecutivos y aleatorios de cada uno, las cuales fueron teñidos con hematoxilina (Tabla 6). Se capturaron cinco campos aleatorios por sección utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss TM Primo Star Hal/Les) equipado con una cámara digital a un objetivo de 100X.

Se identificó en las secciones histológicas los estratos según Westwood (2008) (estrato germinativo, granuloso, mucificado y corneo), se diferenció los estratos que recubrían la mucosa vaginal y se nombró las variables. Estas variables son: MUC (estrato mucificado

recubre la mucosa vaginal) (Figura 11A), CORN-MUC (estrato mucificado seguido del estrato córneo recubren la mucosa vaginal (Figura 11B), CORN (estrato córneo recubre la mucosa vaginal) (Figura 11C), GRAN (estrato granuloso recubre la mucosa vaginal) (Figura 11D) y GERM (estrato germinativo recubre la mucosa vaginal). Las variables fueron identificadas en cada sección histológica y se halló el porcentaje de cada variable presente en cada animal. También se contabilizó y calculó el porcentaje de secciones que presentaban infiltración de leucocitos en la mucosa vaginal (LE) (Figura 12A) y leucocitos en el lumen vaginal (LL) (Figura 12B).

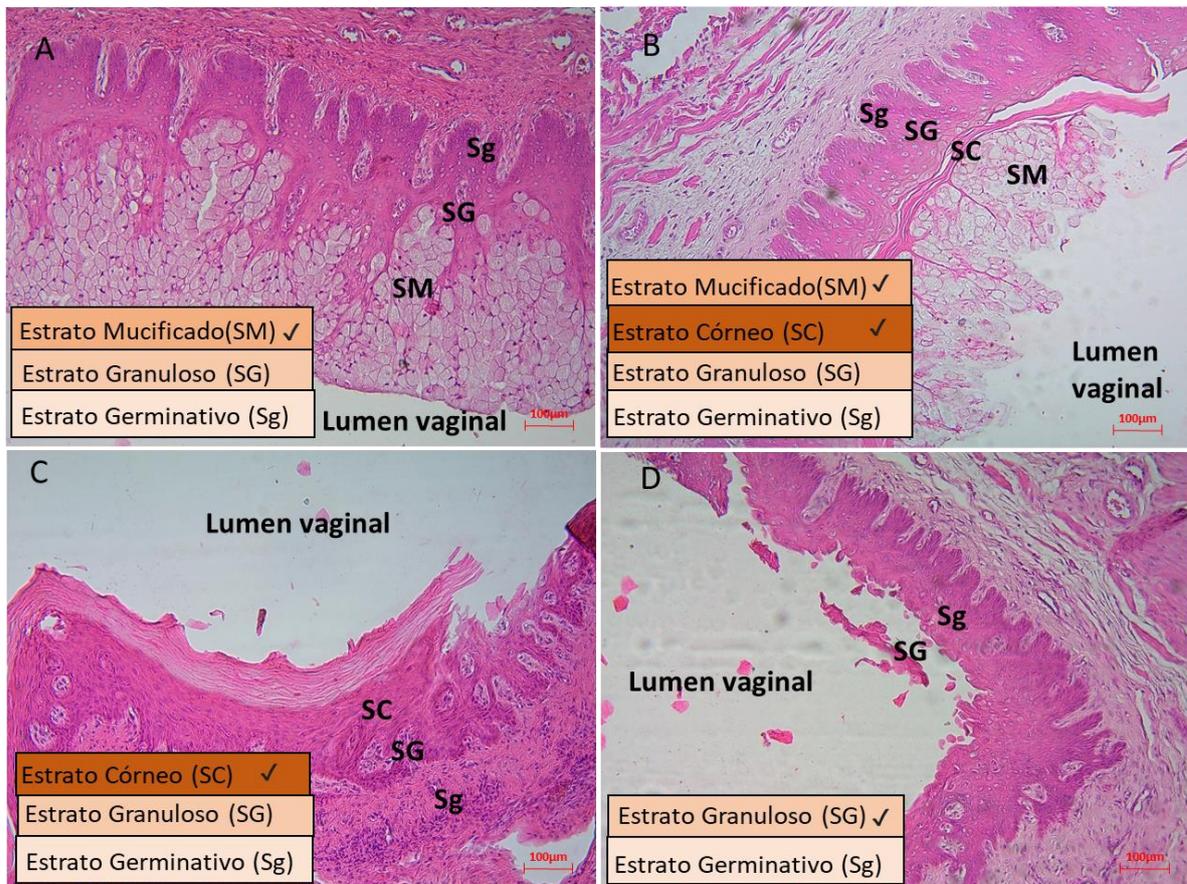


Figura 11. Sección histológica con cambios morfológicos en la vagina del cuy hembra teñido con hematoxilina eosina. Objetivo a 100X. A) variable MUC B) variable MUC-CORN; C) variable CORN; D) variable GRAN. SM (estrato mucificado), SG (estrato granuloso), Sg (estrato germinativo), SC (estrato córneo).

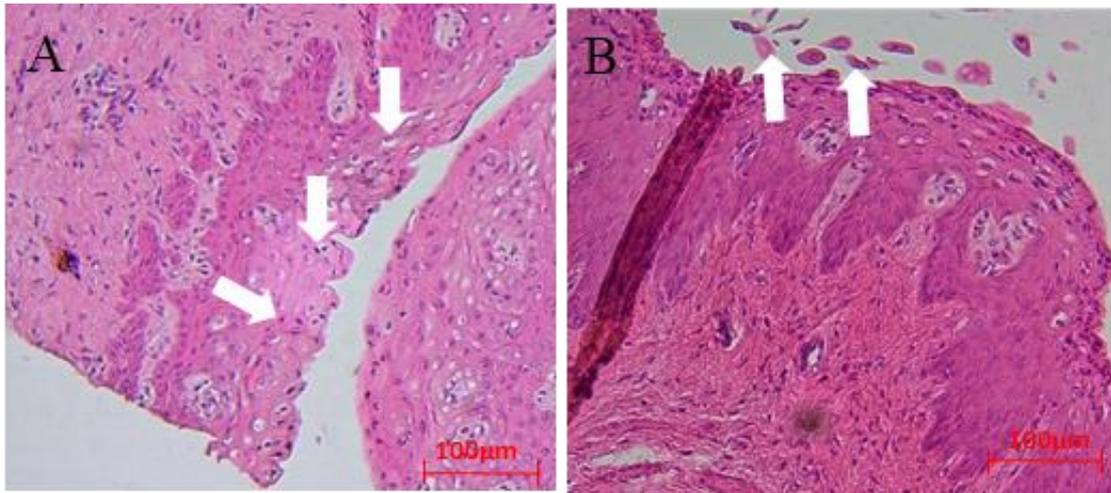


Figura 12. Sección histológica de la vagina del cuy con infiltración de leucocitos en mucosa vaginal y lumen vaginal de hembra teñido con hematoxilina eosina. Objetivo a 100X. A). Leucocitos infiltrados en la mucosa vaginal (flecha blanca). B) Leucocitos infiltrados en lumen vaginal

3.9. Análisis estadístico

Para comparar las variables histológicas del ovario (conteo de folículos antrales viables y atrésicos, número de cuerpos lúteos tempranos, diámetro de folículo preovulatorio) de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132 horas post última dosis de progesterona se utilizaron análisis de varianza (ANOVA). Para comparar las diferencias de las medias entre grupos se utilizó la prueba de Tukey.

Las variables de citología vaginal (BP, I, S, C, CF y LEU), histología vaginal (MUC, MUC-CORN, CORN, GRAN, GERM, LE y LL) y apertura vaginal (AP) de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona se sometieron a la prueba de normalidad Shapiro Wilk. Seguidamente, las variables normales (BP, I, S, C, CF y LEU) y anormales (MUC, MUC-CORN, CORN, GRAN, GERM, LL, LE y AP) fueron evaluadas por correlación de Pearson y de Spearman, respectivamente. Seguidamente, todas las variables fueron sometidas a Receiver Operating Characteristic (ROC) y al área bajo la curva (AUC) para determinar la precisión de la predicción de las variables para diagnosticar el momento de ovulación, siendo el momento de ovulación definido por histología ovárica, con la presencia de cuerpo lúteo en formación en el ovario. Las variables también fueron sometidas al análisis de Regresión Logística Binaria, con el fin de determinar el modelo de predicción de la ovulación más precisa. El modelo 1 y 2 estuvieron conformados por las variables citológicas e histológicas con aporte significativo respectivamente. La significancia estadística fue establecida en $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics para Windows (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Momento de ovulación en cuyes sincronizados

En este trabajo, el momento de ovulación fue definido por hallazgos de cuerpo lúteo en formación (etapa temprana) determinada por técnicas de histología ovárica. Se procesaron un total de 1958 cortes histológicos de ovarios de cuyes sincronizados (n=36 hembras; 06 animales por grupo) de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132 horas post última dosis de progesterona. Nuestros resultados muestran que la ovulación inició a las 108 h post última dosis de progesterona con 33.3% Siendo el grupo de cuyes a 132 h post última dosis de progesterona con mayor número de animales ovulados (83,3%) (Figura 13). Trabajos realizados por Kosaka *et al.* (1994) y Grégoire *et al.* (2012) utilizando técnicas indirectas (citología vaginal) reportaron que el momento de ovulación varía entre 120 a 144h y 72 a 144 h después de la última administración de progesterona, respectivamente. La diferencia entre los resultados de este estudio y los otros, se basa principalmente por la variación individual entre los animales y las diferencia entre la histología y citología para determinar el momento de ovulación.

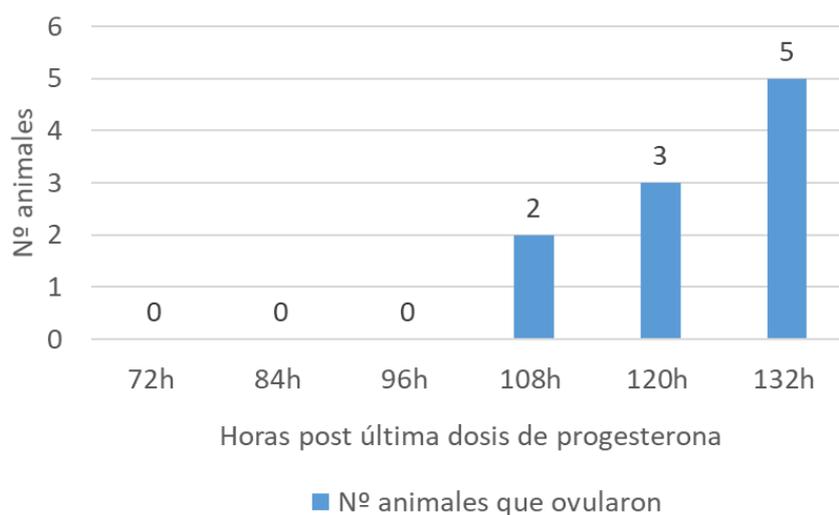


Figura 13. Distribución de hembras con presencia de cuerpo lúteo en formación a las 72, 84, 96, 108, 120 y 132 horas post última dosis de progesterona.

Los folículos preovulatorios en cuyes se identifican al presentar un diámetro mayor a 700 μm (Labhsetwar & Diamond, 1970; Peddie, 1980a). En la figura 14 se muestra un folículo preovulatorio y cuerpo lúteo observados en los ovarios de cuyes de los grupos 84 y 132 h post última dosis de progesterona respectivamente.

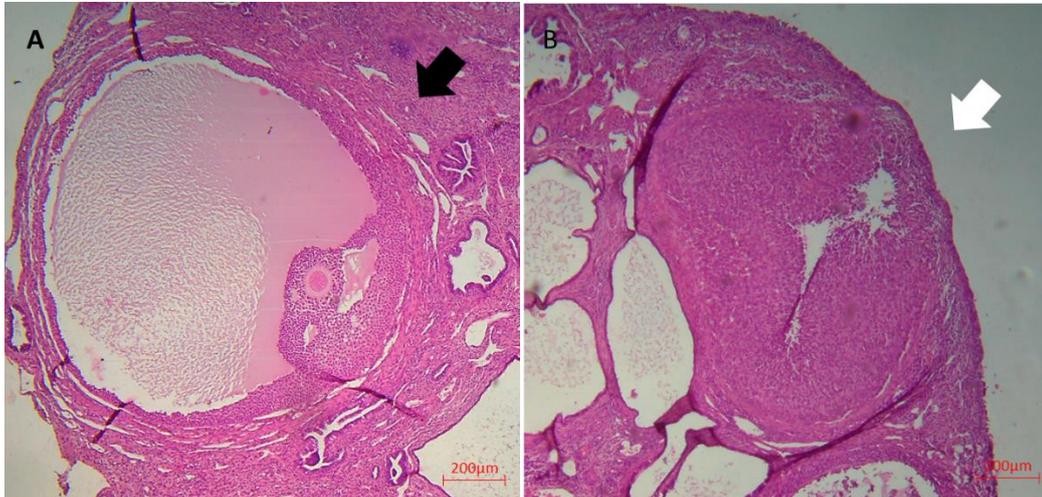


Figura 14. Sección histológica de ovario del cuy hembra teñido con Hematoxilina Eosina, objetivo 40X. A) Folículo preovulatorio (flecha negra) perteneciente al grupo de 84 h post última dosis de progesterona. B) Cuerpo lúteo en formación (flecha blanca) perteneciente al grupo 132 h post última dosis de progesterona.

En el presente trabajo, a las 108 horas se observa la primera aparición de cuerpo lúteo en formación y continúa apareciendo a las 120h hasta las 132h (ver figura 15). Asimismo, el número de folículos preovulatorio ($> 700 \mu\text{m}$) estuvo presente en todos los grupos experimentales, sin embargo, se muestra una reducción marcada del número de folículos preovulatorios en los grupos 108 a 132h post última dosis de progesterona siendo el último grupo estadísticamente menor (0.6 folículos preovulatorios). Labhsetwar & Diamond (1970) reportaron la presencia de folículos preovulatorio ($> 700 \mu\text{m}$) al día 15 del ciclo estral del cuy (período preovulatorio) Asimismo, Garris & Foreman (1984) reportaron un máximo de número de folículos preovulatorio ($>450 \mu\text{m}$) viables después del día 15 y durante el período ovulatorio.

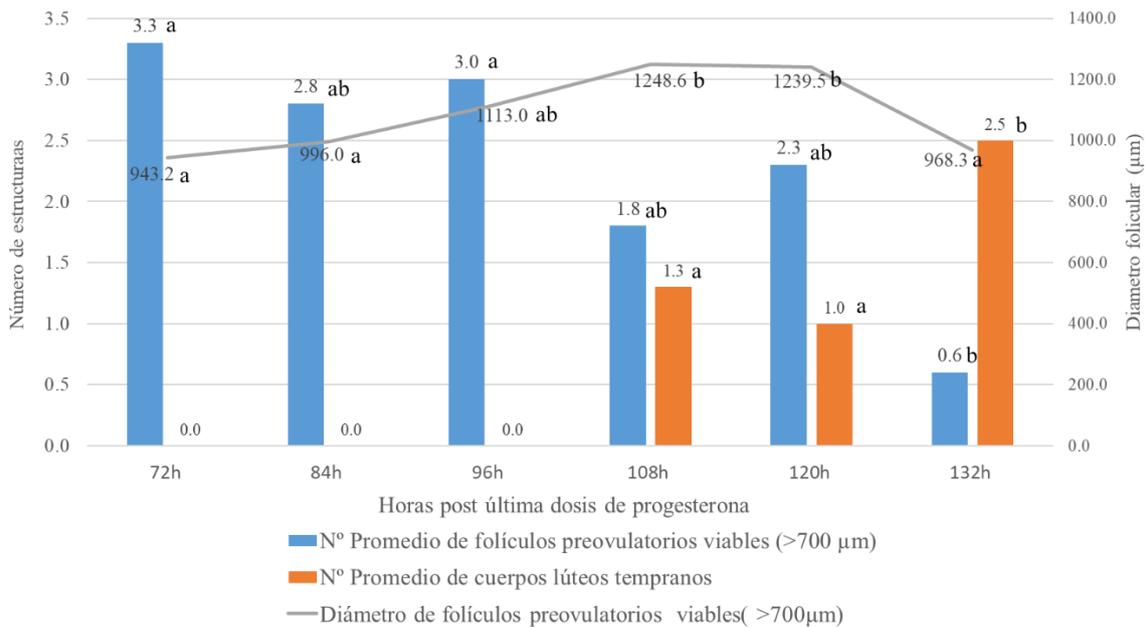


Figura 15. Estructuras foliculares y cuerpos lúteos observados en los ovarios de las hembras de cuyes a 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona

La relación inversa entre el número de folículos preovulatorio y número de cuerpos lúteos, que se mostró en este trabajo, también fue observado por Logothetopoulos *et al.* (1995), quienes describieron para cuyes entre el día 16, 17 y 1 a 3 del ciclo estral, la presencia de folículos preovulatorios y la aparición de cuerpos lúteos. En ratas, también se observaron la presencia de folículos preovulatorios (500-750µm) durante la etapa de proestro tardío (Hirshfield & Midgley, 1978).

Con respecto al tamaño de los folículos preovulatorios, nuestro estudio muestra un crecimiento continuo de folículos preovulatorios desde las 72h hasta las 108 post última dosis de progesterona y un posterior descenso de diámetro folicular. En ratas dosificadas con progesterona también se observa esta tendencia después de extraer el implante de progesterona (Richard *et al.*, 1980).

4.2. Recuento de folículos antrales en cuyes sincronizados

Es necesario tener en cuenta que los ovarios contienen tres poblaciones distintas de folículos en diferentes etapas de desarrollo: folículos primordiales, folículos de crecimiento temprano y folículos antrales. Determinar las dimensiones reales y el número de folículos requiere de técnicas histológicas del ovario debido a su pequeño tamaño (<50 µm de diámetro) (Gougeon *et al.*, 1994).

En este trabajo, los folículos antrales viables y atrésicos fueron clasificados en cuatro grupos según su rango de diámetro folicular (113-300, 301-500, 501-700, >700 μm) (Figura 16), siguiendo las recomendaciones de Labhsetwar & Diamond (1970) y Peddie (1980a).

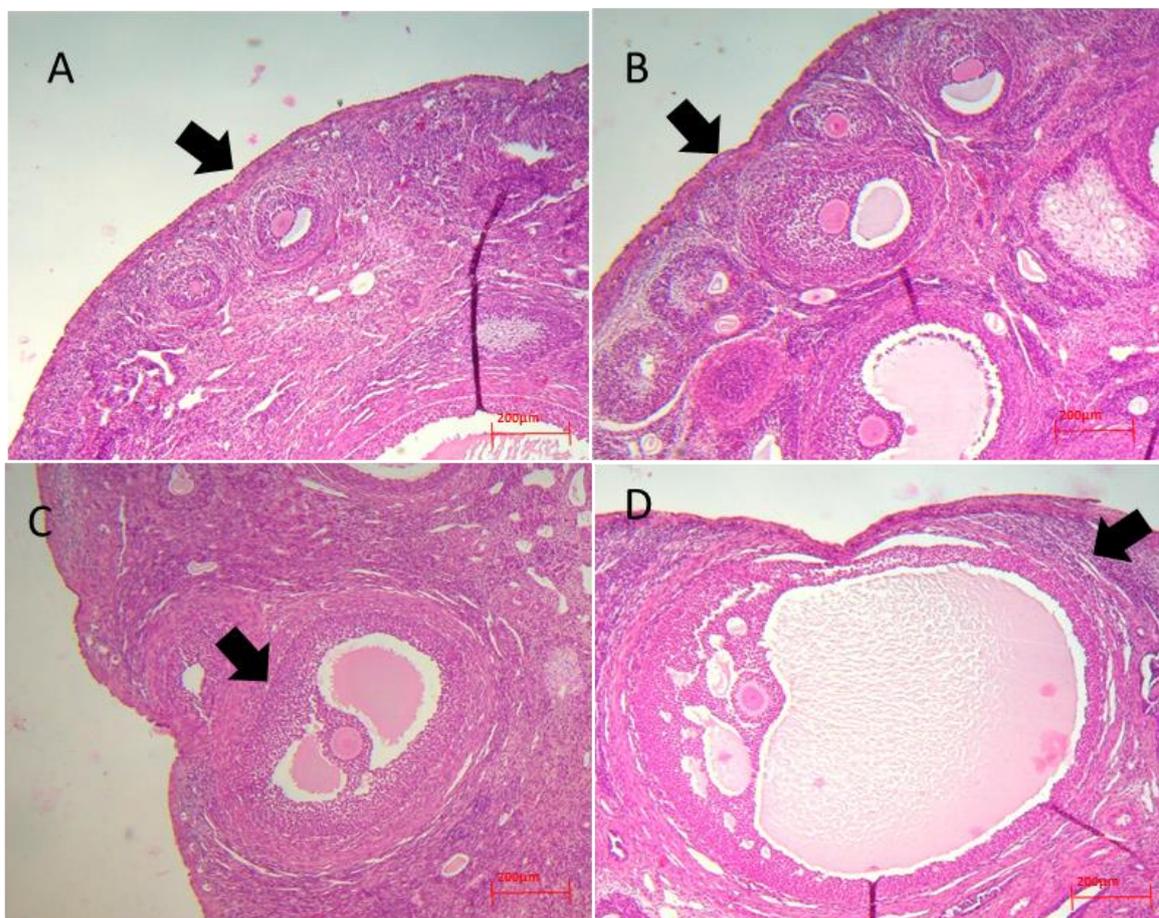


Figura 16. Secciones histológicas de ovarios de cuyes hembras teñidos en Hematoxilina Eosina, objetivo de 40X. **A)** Folículo antral de 180,63 μm de diámetro (grupo de 132 h post última dosis de progesterona) (flecha negra). **B)** Folículo antral de 345,17 μm de diámetro (grupo de 72 h post última dosis de progesterona) (flecha negra). **C)** Folículo antral de 568,50 μm de diámetro (grupo de 72 h post última dosis de progesterona) (flecha negra). **D)** Folículo preovulatorio de 1047,00 μm de diámetro (grupo de 72 h post última dosis de progesterona) (flecha negra).

El recuento de folículos antrales promedio post última dosis de progesterona, fueron 97,5, 77,0, 67,7, 114,3, 86,2 y 63,6, para los grupos a 72, 84, 96, 108, 120 y 132 h, respectivamente. En este trabajo, el conteo de folículos antrales promedio no fue estadísticamente diferente, siendo similar a los resultados reportados por Peddie (1980b) y Logothetopoulos *et al.* (1995).

En la figura 17, también se observa, que el número de folículos preovulatorios representa una muy pequeña proporción (entre 2.4 a 6.4% del total de folículos antrales). Asimismo, Peddie (1980b) reportaron una baja proporción de folículos preovulatorios (0.79 %). Para la

especie *Cavia*. Myers *et al.* (1936) afirma que solo un pequeño porcentaje alcanza la etapa preovulatoria y experimentan la ovulación.

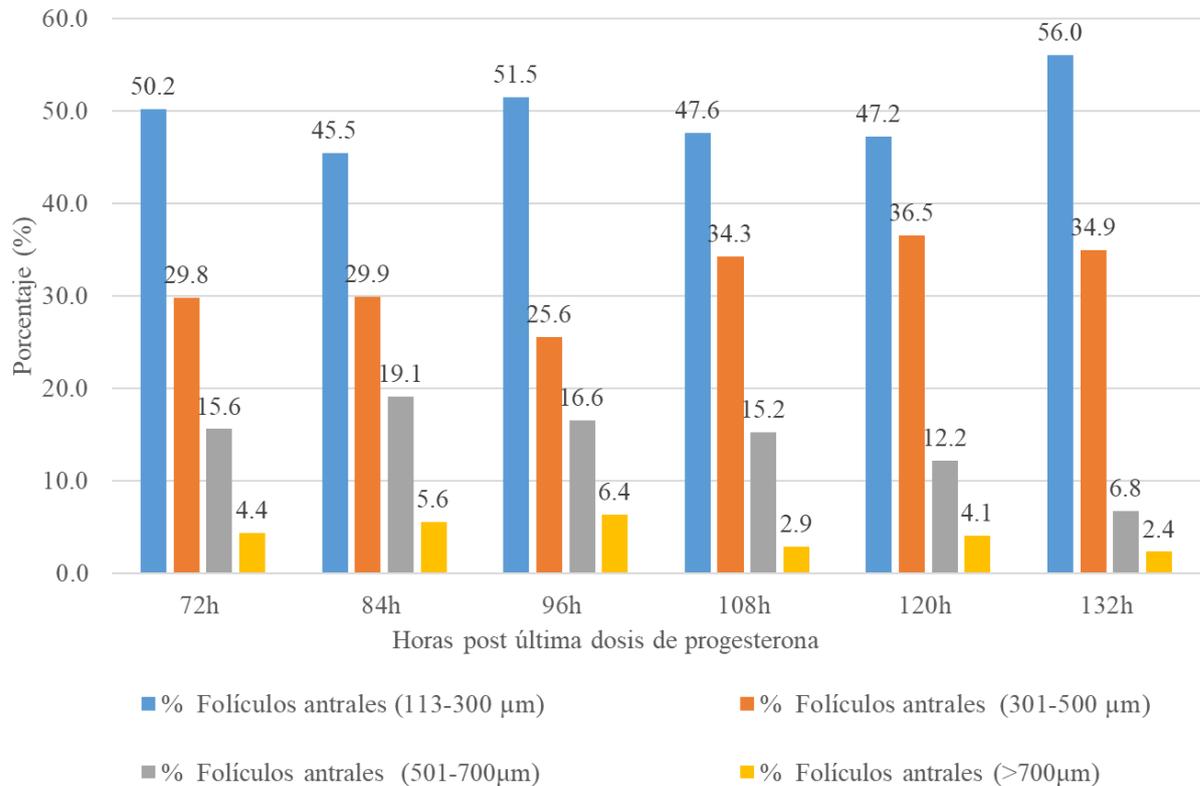


Figura 17. Porcentaje de folículos antrales según rango de diámetro folicular (113-300, 301-500, 501-700, >700 μm) en cuyes hembras de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona

Teniendo en cuenta que la atresia folicular denota la degeneración de los folículos ováricos y ocurre a lo largo de la vida en un mamífero. Mientras que una cantidad de folículos eventualmente se convierten en cuerpo lúteo, la gran mayoría (99 %) sufre atresia folicular. La atresia folicular es un proceso apoptótico regulado hormonalmente que depende predominantemente de la apoptosis de las células de la granulosa (Zhou *et al.*, 2019). En este trabajo, la tasa de folículos antrales atrésicos incrementa de acuerdo con el tiempo de la última dosis de progesterona (tabla 7 y figura 18). Asimismo, Peddie (1980b) reportó en el día 13 y 15 de ciclo estral del cuy una tasa de 84% y 86% de folículos antrales, siendo próximo el momento de ovulación.

Por otro lado, los folículos preovulatorios (>700μm) mantuvieron su tasa de atresia folicular y no superaron el 53 % (Tabla 7). Similares resultados reportaron Hermreck & Greenwald (1964) en el cuy observando una ola masiva de atresia folicular en todos los tamaños de folículos, a excepción de los folículos > 700μm.

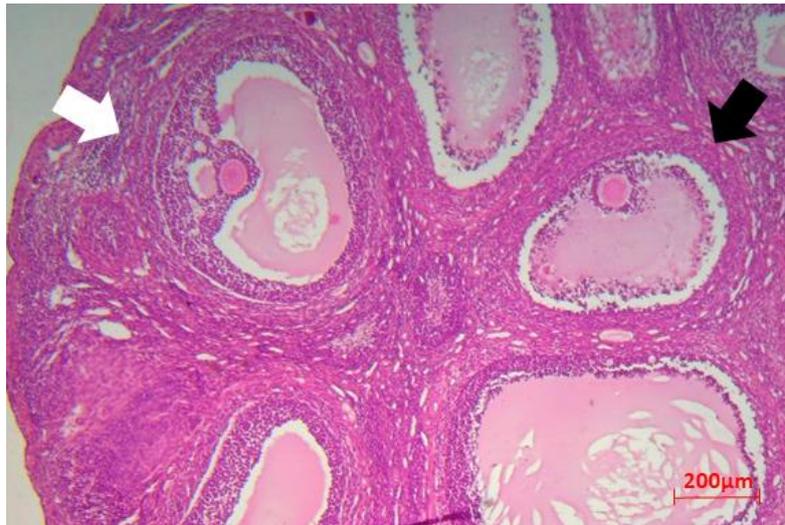


Figura 18. Sección histológica del ovario del cuy hembra del grupo de 108 h post última dosis de progesterona, teñido en Hematoxilina Eosina, objetivo de 400X. Flecha blanca señala folículo antral viable de 584,00 μm de diámetro. Flecha negra señala folículo antral atrésico de 507,50 μm .

Tabla 7. Cambios en los porcentajes de folículos antrales atrésicos según rango de diámetro folicular (113-300, 301-500, 501-700, >700 μm) en cuyes hembras de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona

| | Horas post última dosis de progesterona | | | | | |
|---|---|------|------|------|------|------|
| | 72h | 84h | 96h | 108h | 120h | 132h |
| Porcentaje de folículos atrésicos(113-300 μm) | 49,7 | 30,6 | 37,4 | 41,9 | 77,4 | 79,5 |
| Porcentaje de folículos atrésicos(301-500 μm) | 55,9 | 46,5 | 49,1 | 75,8 | 93,7 | 91,0 |
| Porcentaje de folículos atrésicos(501-700 μm) | 52,6 | 52,4 | 64,3 | 64,4 | 93,3 | 81,4 |
| Porcentaje de folículos atrésicos(>700 μm) | 23,3 | 34,9 | 30,2 | 45,5 | 34,3 | 53,3 |

4.3. Correlación entre variables histológicas y citológicas

Las variables obtenidas de la histología vaginal identifican los estratos que recubren externamente la mucosa vaginal (MUC, MUC-CORN, CORN, GRAN, GERM) y la presencia de leucocitos en el epitelio y lumen vaginal (LE y LL) siguiendo las indicaciones de Long & Evans (1922) y Westwood (2008). Las variables obtenidas por citología vaginal (PB, I, S, C, CF y LEU) fueron clasificados en función a su morfología (Montes y Luque, 1988). Siendo estas variables normales (PB, I, S, C, CF y LEU) analizadas con la correlación de Pearson (Tabla 8) y las variables no normales (MUC, MUC-CORN, CORN, GRAN, GERM, LL, LE y AP) la correlación de Spearman (Tabla 9).

Tabla 8. Correlación de Pearson de las variables con distribución normal

| | BP | | I | | S | | C | | CF | | LEU |
|-----|---------------|----|---------------|----|--------|--------|------|--------|----|------|-----|
| PB | 1.00 | | | | | | | | | | |
| I | - 0.06 | | 1.00 | | | | | | | | |
| S | - 0.44 | ** | - 0.66 | ** | 1.00 | | | | | | |
| C | - 0.21 | | - 0.59 | ** | 0.07 | 1.00 | | | | | |
| CF | 0.21 | | - 0.48 | ** | 0.16 | 0.32 | 1.00 | | | | |
| LEU | 0 | | 0.35 | | - 0.07 | - 0.45 | ** | - 0.50 | ** | 1.00 | |

**La correlación es significativa en el nivel 0,01 ($P < 0.01$). PB, células parabasales; I, células intermedias; S, células superficiales; C, células cornificadas; CF, Celularidad del frotis; LEU, leucocitos en el frotis.

El porcentaje de las células intermedias (I) se correlacionan negativamente ($r = -0.66$; -0.59 y -0.48) ($p < 0.01$) con las células superficiales (S), cornificadas (C) y la celularidad del frotis (CF), respectivamente. El epitelio vaginal produce distintos tipos de células representado por un estado de maduración (Tasat, 1994). En roedores, la población de células intermedias en su proceso de maduración y diferenciación conducen a la transición de células superficiales y posteriormente a células cornificadas (Montes & Luque 1988; Hohl, 1990). Por ende, es normal fisiológicamente observar el cambio progresivo de células intermedias a células superficiales y cornificadas y explicaría la relación inversa (correlación negativa) que hay entre las células. Así también, observamos correlación negativa ($r = -0.45$) significativa ($p < 0.01$) entre las células cornificadas (C) y los leucocitos presentes en el frotis (LEU). Esta relación se puede explicar, cuando el estrato corneo (conformado por células cornificadas) cubre la superficie del epitelio vaginal, impide la infiltración de leucocitos en el frotis vaginal (Montes & Luque, 1988) debido a que las células cornificadas se mantienen juntas, formando una barrera física sobre los leucocitos (Gupta *et al.*, 1989).

Tabla 9. Correlación de Spearman de las variables con distribución no normal

| | MUC | MUC-CORN | CORN N | GRAN | GER | LE | LL | AP |
|----------|------------------|------------------|------------------|-----------|--------|---------|----------|------|
| MUC | 1.00 | | | | | | | |
| MUC-CORN | 0.42 | 1.00 | | | | | | |
| CORN | - 0.45 ** | 0.53 ** | 1.00 | | | | | |
| GRAN | - 0.43 ** | - 0.44 ** | - 0.44 ** | 1.00 | | | | |
| GERM | 0.14 | - 0.13 | - 0.13 | - 0.10 | 1.00 | | | |
| LE | - 0.39 | - 0.41 | - 0.41 | 0.92 ** | - 0.09 | 1.00 | | |
| LL | 0.37 | 0.39 | - 0.07 | - 0.51 ** | 0.20 | -0.45 * | 1.00 | |
| AP | - 0.73 ** | - 0.03 | 0.23 | 0.49 ** | - 0.20 | 0.43 * | -0.57 ** | 1.00 |

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (P>0.01).

MUC, estrato mucificado recubre la mucosa vaginal; MUC-CORN, estrato mucificado seguido del corneo recubren la mucosa vaginal; CORN estrato corneo recubre la mucosa vaginal; GRAN, estrato granuloso recubre la mucosa vaginal; GERM, estrato germinativo recubre la mucosa vaginal; LE, infiltración de leucocitos en la mucosa vaginal; LL, infiltración de leucocitos lumen vaginal; AP, apertura vaginal.

La variable GRAN se correlaciona negativamente ($r = -0.43$; -0.44 ; -0.44) ($p < 0.01$) con la variable MUC, la variable MUC-CORN y la variable CORN respectivamente. La mucosa vaginal de los roedores está conformada por células que son muy sensibles a las concentraciones del estrógeno principalmente. Esta hormona tiene la capacidad de iniciar la división celular, la diferenciación celular y exfoliación de las células (Schutte, 1967), reflejando así cambios en la mucosa vaginal a nivel de los estratos que lo conforman (Wright & Parry, 1989). Mediante la proliferación y diferenciación celular se van formando el estrato granuloso seguido del estrato Mucificado (estrato expuesto en la superficie vaginal) (variable MUC). Las células al continuar con el proceso de diferenciación, se llenan de queratina, formando así el estrato Corneo debajo del estrato Mucificado (variable MUC-CORN). Posteriormente el estrato Mucificado se desprende, dejando al estrato Corneo en la superficie (variable CORN). Por lo tanto, es normal ver el cambio progresivo entre estratos que están expuestos a la superficie vaginal y que ocurre en relación inversa cada uno de los estratos, explicando así la correlación negativa. Así mismo ocurre con el porcentaje de sección histológica que presenta en la superficie al estrato Mucificado (variable MUC) y al estrato Corneo (variable CORN) ($r = -0.45$) ($p < 0.01$).

4.4. Precisión de la predicción de la ovulación de las variables

Hay que precisar que el análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristic) es un método estadístico usado para determinar la exactitud diagnóstica de si ocurre o no un evento (Cerdea *et al.*, 2012). El parámetro que estima este diagnóstico es el AUC (Area Under The

Curve), este valor refleja la capacidad diagnóstica de la variable para diagnosticar el evento (Muschelli, 2020). Los valores para interpretar el AUC son los siguientes. Valor de 0.5-0.6 discrimina de manera insatisfactoria si ocurrirá o no el evento en cuestión, valor de 0.6-0.7 discrimina de manera satisfactoria, valor de 0.7-0.8 discrimina de manera buena, valor de 0.8-0.9 discrimina de manera muy buena y 0.9-1.0 discriminan de manera excelente (Trifonova *et al.*, 2014).

En el presente trabajo, las variables de citología vaginal (PB, I, S, C, CF y LEU), histología vaginal (MUC, MUC-CORN, CORN, GRAN, GERM, LE y LL) y apertura vaginal (AP) de los grupos 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post última dosis de progesterona (Tabla 13) fueron sometidas a análisis de ROC-AUC para identificar y determinar la precisión de la predicción de la ovulación de cada variable. Siendo los resultados expresados en la Tabla 10, donde las variables GRAN (variable donde estrato granuloso recubre la mucosa vaginal), LE (infiltración de leucocitos en la mucosa vaginal), C (Célula Cornificada), AP (apertura vaginal), CF (Celularidad del frotis) y variable PB (Célula Parabasal) mostraron un área bajo la curva (AUC) de 0.88, 0.84, 0.83, 0.79, 0.77 y 0.71, respectivamente, las cuales discriminan la ovulación. Sin embargo, la variable PB fue no significativa ($p > 0.05$) a diferencia del resto de las variables nombradas anteriormente que sí fueron significativas ($p < 0.05$).

El valor de AUC de la variable GRAN (0.88) obtenido por histología se puede interpretar que GRAN tiene una probabilidad del 88% de diagnosticar correctamente la ovulación. Por lo tanto, al observar un mayor porcentaje de secciones histológicas con estrato granuloso que recubre la mucosa vaginal, se puede definir que el sujeto ovuló. A medida que aumenta el nivel de estrógenos circulantes, el epitelio vaginal va estratificando (Forsberg, 1973) debido a la proliferación y proceso de diferenciación celular (Li *et al.*, 2018). Los estratos que revisten la mucosa vaginal del lumen vaginal van reemplazándose periódicamente (Eddy & Walker, 1969). Sobre el estrato germinativo se forma el estrato granuloso y mucificado (Burgos & Wislocki., 1956). Posteriormente se forma el estrato corneo que subyace a las células que conforman el estrato mucificado (Li & David, 2007). Durante el inicio del estro se produce la pérdida completa del estrato mucificado, volviéndose así, el estrato corneo superficial. Posterior a la ovulación, disminuye el nivel de estrógeno y ocurre la deslaminación del estrato corneo, mostrándose así el estrato granuloso (Westwood, 2008; Gal *et al.*, 2014). Esto explicaría el alto valor obtenido por esta variable.

Los leucocitos presentes en el epitelio (LE) es otra de las variables respuesta que se obtiene por histología vaginal y obtuvo un valor alto de AUC (0.84) para predecir ovulación. Cuando hay niveles altos de estrógeno, hay receptores que suprimen la infiltración de leucocitos en la mucosa vaginal. Después de la ovulación, los niveles de estrógeno disminuyen, lo que origina que desaparezca la supresión sobre la señalización de los leucocitos (Li *et al.*, 2018) invadiendo así los leucocitos en el epitelio.

Tabla 10. Valores ROC-AUC de las variables apertura, citología e histología vaginal

| Técnica de evaluación | Variable de resultado | ROC - AUC | p valor | 95% de intervalo de confianza | |
|-----------------------|-----------------------|-----------|---------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | Límite Inferior | Límite superior |
| Histología | GRAN | 0.88 | 0.000 | 0.73 | 1 |
| Histología | LE | 0.84 | 0.002 | 0.66 | 1 |
| Citología | C | 0.83 | 0.003 | 0.69 | 0.96 |
| Apertura vaginal | AP | 0.79 | 0.001 | 0.611 | 0.96 |
| Citología | CF | 0.77 | 0.012 | 0.60 | 0.94 |
| Citología | PB | 0.71 | 0.056 | 0.49 | 0.93 |
| Histología | GERM | 0.48 | 0.860 | 0.27 | 0.69 |
| Histología | CORN | 0.41 | 0.407 | 0.19 | 0.63 |
| Citología | S | 0.40 | 0.349 | 0.22 | 0.58 |
| Citología | LEU | 0.34 | 0.143 | 0.14 | 0.54 |
| Citología | I | 0.31 | 0.080 | 0.13 | 0.49 |
| Histología | MUC-CORN | 0.28 | 0.039 | 0.11 | 0.44 |
| Histología | MUC | 0.25 | 0.022 | 0.09 | 0.41 |
| Histología | LL | 0.15 | 0.001 | 0.02 | 0.28 |

NOTA: GRAN, estrato granuloso recubre la mucosa vaginal; LE, Infiltración de leucocitos en la mucosa vaginal; C, célula cornificadas; AP, apertura vaginal CF, celularidad del frotis; PB, célula parabasal; GERM, único estrato germinativo recubre la mucosa vaginal; CORN, estrato corneo recubre la mucosa vaginal; LEU, leucocitos en el frotis; I, células intermedias; MUC-CORN, , estrato mucificado seguido del corneo recubren la mucosa vaginal; MUC, estrato mucificado recubre la mucosa vaginal y LL, Infiltración de leucocitos en el lumen vaginal.

Las variables citologías como las células cornificadas (C) y Celularidad del frotis (CF) tuvieron un valor AUC de 0.83 y 0.77 respectivamente, en la predicción de ovulación. La cornificación celular está relacionada con el estímulo del estrógeno (Gardner, 1959; Forsberg; 1973; Daly & Kramer, 1998). Esta hormona tiene la capacidad de activar el proceso de diferenciación celular (Schutte, 1967; Holderegger, 1980). Este proceso implica

cambios morfológicos de las células, y su núcleo, además de la queratinización de la célula (cornificación) (Gupta *et al.*, 1989). Entonces, cuando los niveles de estrógeno van aumentando, las células van diferenciándose. Las células intermedias muestran un núcleo granulado o punteado que posteriormente comenzarán a degenerarse produciendo núcleos picnóticos. Estas células seguirán diferenciándose y sintetizarán queratina (Vijayasradhi *et al.*, 1987). Estas células se denominan células cornificadas, las cuales se volverán superficiales y se desprenderán de manera que en el frotis vaginal se mostrará un predominio de células cornificadas. Diversos investigadores en roedores usan el predominio de estas células para diagnosticar que el animal está en la etapa de estro mas no para determinar el momento de ovulación (Young *et al.*, 1941; Montes & Luque, 1988; Gupta *et al.*, 1989). Sin embargo, el valor AUC obtenido muestra que hay un 83% de probabilidad de predecir ovulación usando esta variable. La celularidad del frotis (CF) representa la cantidad de células presentes en el frotis. Se ha reportado cambios en la celularidad a lo largo del ciclo estral (Hubscher *et al.*, 2005). Li & David (2007) reportaron que durante el diestro que es cuando hay altos niveles de progesterona hay pocas células presentes debido a que la mucosa está bien diferenciada y cohesiva. Hubscher *et al.* (2005) realizaron un análisis cuantitativo y encontró que durante el diestro la proporción de leucocitos con respecto a las células epiteliales fue de 3:1, mostrando así un disminuido número de células epiteliales en el frotis. En ambos estudios muestran una disminución en el número de células después de ocurrido la ovulación (diestro).

La variable Leucocito en el frotis (LEU) que se obtiene por citología vaginal no obtuvo un valor AUC alto (0.34). Existen estudios que consideran la infiltración leucocítica después de la cornificación celular como base de criterio para determinar la ovulación (Norris & Adams, 1979; Lilley *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2003; Susuki *et al.*, 2003; Grégoire *et al.*, 2012, Aranibar *et al.*, 2014). Cuando ocurre la disminución de estrógeno (después de la ovulación), las células que conforman el estrato corneo se descaman (Li & David, 2007). Esto produce que el epitelio vaginal adelgace y como consecuencia los leucocitos se infiltren en el epitelio y pasen al canal vaginal (Montes & Luque, 1988). Debido a esto, en el frotis vaginal se observa la presencia de leucocitos y células cornificadas (Li & Davis, 2007). Nuestro análisis no diferenció la infiltración leucocítica que ocurre posterior a la ovulación. En nuestros resultados, la mayoría de frotices mostraban la presencia de leucocitos. Hubcher *et al.* (2005) también reportaron la presencia de leucocitos durante todo el ciclo estral y

explicó que durante la transición progresiva de cambios en la mucosa vaginal se presentan leucocitos ya sea en mayor o menor proporción en el lumen vaginal.

La variable Apertura vaginal (AP) tuvo un valor AUC de 0.84. Esta variable se usa rutinariamente para determinar la madurez sexual en roedores (Hoffmann, 2018) y determinar el inicio del estro (Lilley *et al.*, 1997). Este evento está relacionado a la cornificación de sus células (Selle, 1922) y la descamación del epitelio (Kelly & Papanicolaou, 1927). Algunos autores consideran que esta variable puede determinar el día de ovulación y coinciden en que la apertura ocurre uno o dos días antes de la ovulación (Donovan & Lockart, 1972; Luna *et al.*, 2003; Sadeu *et al.*, 2007). La mayoría de los reportes científicos usan como indicador de ovulación el primer día de la apertura vaginal. Sin embargo, el primer día o inicio de la apertura vaginal no se consideró en nuestro diseño experimental.

De todas las variables obtenidas por histología vaginal, citología y apertura vaginal, las variables GRAN (estrato granuloso recubre la mucosa vaginal), LE (infiltración de leucocitos en el epitelio) y C (células cornificadas) mostraron un alto valor AUC-ROC, demostrando que estas variables tienen una capacidad muy buena de discriminar y predecir la ovulación.

Modelo de predicción de la ovulación

El modelo de regresión logística binaria se usa cuando se desea conocer la relación entre una variable dependiente cualitativa dicotómica y una o más variables explicativas con el objetivo de obtener una estimación de un modelo matemático con variable independiente para predecir la variable dependiente (Moons *et al.*, 2015). En nuestro estudio se consideró las variables citológicas e histológicas como variables independientes y la variable ovulación como variable dependiente para el análisis de regresión logística binaria (Ver Tabla 11)

En el modelo1 se analizaron todas las variables independientes obtenidos por citología vaginal; las variables con menos aporte al modelo fueron eliminado por el programa IBM SPSS Statistics, basado en el valor Walt y la significancia de la variable, dejando solo a la variable citológicas I y S en el modelo. En el modelo 2 se analizaron todas las variables independientes obtenidos por histología vaginal (MUC, MUC-CORN. CORN, GRAN, GERM, LE y LL), de la misma manera, las variables con menor aporte fueron eliminados. Las variables con aporte significativo fueron GRAN y CORN.

Tabla 11. Modelos predictivos de ovulación en el cuy hembra con el uso de regresión logística binaria

| Variable | Modelo1 | Modelo2 |
|--|---------|---------|
| Constante | 5,73 | - 7,43 |
| I (células intermedias) | - 0,11 | |
| S (células superficiales) | - 0,11 | |
| CORN (estrato corneo cubre la superficie vaginal y debajo de este estrato se encuentra el estrato granuloso y germinativo) | | 0,08 |
| GRAN (estrato granuloso cubre la superficie vaginal y debajo de este estrato se encuentra el estrato germinativo) | | 0,95 |
| Precisión de modelo (ROC-AUC) | 0,93 | 0,97 |

El modelo 1 formado por las variables citológicas (I y S) fue significativa (chi cuadrado < 0.05) y presenta un porcentaje de 86.1% de predicción correcta.

Está representado por la ecuación

$$Y = 5,73 - 0,11 * I - 0,11 * S$$

Donde:

I= Porcentaje de células Intermedias presentes en el frotis

S= Porcentaje de células Superficiales presentes en el frotis

Cuando

$Y > 0,5$ se predice que la hembra ovuló

$Y < 0$ a $0,5$ se predice que la hembra no ovuló

El modelo 2 formado por las variables histológicas (CORN y GRAN) también fue significativa (chi cuadrado < 0.05) y presenta un porcentaje de 91.7% de predicción correcta

Está representado por la ecuación

$$Y = -7,429 - 0,08 * CORN + 0,95 * GRAN$$

Donde:

CORN: Porcentaje de sección histológica donde el estrato corneo recubre la mucosa vaginal

GRAN: Porcentaje de sección histológica donde el estrato granuloso recubre la mucosa vaginal.

Cuando

$Y > 0,5$ se predice que la hembra ovuló

$Y < 0$ a $0,5$ se predice que la hembra no ovuló

En este trabajo el modelo 1 y 2 lograron un ROC-AUC de 0.93 y 0.97 respectivamente. Estadísticamente ambos modelos se consideran como un buen modelo para la predicción de ovulación. Ciertamente el modelo 2 conformado por variables histológicas mostraron valores de mayor predicción tanto en el porcentaje de predicción correcta como en el valor ROC-AUC.

La citología es una técnica muy controversial usada para determinar el período óptimo de apareamiento que tenga relación con la ovulación (Hiemstra *et al.*, 2001). Sin embargo, sigue siendo un método muy usado en caninos (Simmons, 1970; Srinivas *et al.*, 2004). Es así, que Bouchard *et al.* (1991) sugieren usar este método en caninos. Existen investigaciones que reportan que la citología vaginal, tiene baja precisión (28%) del apareamiento (Hiemstra *et al.*, 2001) y garantiza una baja tasa de preñez en caninos (30%, Okkens *et al.*, 1985). También se describe que la variabilidad entre animales con respecto al momento de la aparición de las diferentes células (Jeffcoate *et al.*, 1989, Durrant *et al.*, 2002) y el efecto de frotices consecutivos pueden alterar los resultados del frotis vaginal (McLean *et al.*, 2012) y limitan su uso (Durrant *et al.*, 2002). Sin embargo, en nuestro estudio, el modelo 1 que está conformado por variables citológicas presentó 86,1% de predicción correcta y un 93% de precisión en la predicción (ROC-AUC), demostrando así que la citología podría ser un método que se podría usar en la predicción de ovulación. Estudios realizados en otras especies también concuerdan con nuestros resultados como es el caso del titi común (*Callithrix jacchus*) (Gluckman *et al.*, 2004) y en cabras (Souza-Fabjan *et al.*, 2021).

Por otro lado, la histología vaginal es un método que usa para determinar el estadio del ciclo estral, en donde se observa objetivamente los cambios que ocurren en el epitelio vaginal (Rubio 1976: Walmer *et al.* 1992; Li & Davis, 2007 y Buyd *et al.*, 2018). Este método garantizaría el nivel de confiabilidad de la clasificación del ciclo estral (Merkwitz *et al.*, 2016). Gal *et al.* (2014) en su estudio comparó ambos métodos en ratas, reportando una discordancia del 31-77% entre el método citológico e histológico y mayor precisión en la clasificación del ciclo estral usando el método histológico. Siendo, todos estos resultados similares a nuestros resultados (ver modelo 2) que está conformado por variables histológicas mostrando la más alta predicción de la ovulación con respecto al modelo 1 (conformado por variables citológicas).

El uso de los modelos obtenidos en esta investigación aportaría una mayor precisión para identificar el momento de ovulación en cuyes. Esto permitirá determinar el momento de

cópula y conocer el tiempo de desarrollo embrionario para posteriores investigaciones a futuro. Se ha realizado estudios para determinar el mejor momento de cópula en función de la ovulación y el tiempo necesario para la capacitación espermática en ratones (Muro *et al.*, 2016) y hámster (Cummins & Yanagimachi, 1982) así como el efecto de la ovulación y momento de inseminación en la tasa de fertilización en cerdas (Soede *et al.*, 1995).

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó la presente investigación y con los resultados obtenidos se puede concluir:

1. La histología ovárica demostró que la ovulación estaba definida entre las 108 a 132h, post última dosis de progesterona.
2. Las variables histológicas (GRAN y LE) y citológicas (C) logran una alta precisión en la predicción de la ovulación de cuyes sincronizadas con progesterona
3. El modelo matemático 1 (variables citológicas) y 2 (variables histológicas), que agrupa variables permite una alta precisión de ovulación con un valor ROC-AUC de 0.93 y 0.97, respectivamente

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda validar los modelos matemáticos generados en esta investigación con cuyes hembras sincronizadas hormonalmente.
2. Se recomienda evaluar dos grupos experimentales adicionales (144 y 156 h post última dosis de progesterona) para evaluar la dinámica de los folículos preovulatorios y cuerpos lúteos en formación, que permitan evaluar los tiempos y la variabilidad de la ovulación de cuyes.
3. Utilizar los tiempos de ovulación determinados en este estudio, para evaluar el desarrollo embrionario temprano y técnicas de recuperación de cigotos para técnicas de silenciamiento de genes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, T. & Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal reproduction science*, 82-83, 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.022>
- Acosta, T. & Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal reproduction science*, 82-83, 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.022>
- Aerts, J. & Bols, P. (2010). Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim* 45, 71-179.
- Allen, E. (1922). The oestrous cycle in the mouse. *Am J Anat* 30, 297–371
- Araníbar, E. & Echevarría, L. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estral en cuyes (*Cavia porcellus*) Andina y Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(1), 29-36.
- Azmi, T.; O'Shea, J.; Bruce, N. & Rodgers, R. (1984), Morphometry of the functional and regressing corpus luteum of the guinea pig. *Anat. Rec.*, 210: 33-40. <https://doi.org/10.1002/ar.1092100106>
- Bouchard, G.; Solorzano, N.; Concannon, P.; Youngquist, R. & Bierschwal, C. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*, 35(3), 603–611. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90456-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90456-n)
- Boyd, K.; Muehlenbachd, A.; Rendi, M.; Garcia, R. & Gibbons-Corley, K. (2018). Female reproduction system. En Treuling, P.; Demtzis, S & Montine, K(Eds.), *Comparative anatomy and histology mouse, rat and human atlas* (second ed., 303-334) Acamedic Press <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8>

- Burgos, M. & Wislocki, G. (1956). The cyclical changes in the guinea pigs uterus, cervix, vagina and sexual skin, investigated by histological and histochemical means, *Endocrinology*, 59:1, 39-118
- Byers, S.; Wiles, M.; Dunn, S. & Taft, R. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 7(4):e35538. doi: 10.1371/journal.pone.0035538
- Caligioni, C. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols Neuroscience*, Appendix. 4I, 1-7. doi:10.1002/0471142301.nsa04is48.
- Carson, D.; Bagchi, I.; Dey, S.; Enders, A.; Fazleabas, A.; Lessey, B. & Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental biology*, 223(2), 217–237. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9767>
- Cerda, J., & Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 138-141. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
- Champlin, A.; Dorr, D. & Gates, A. (1973). Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod*. 8(4), 491–494
- Chan, J.K. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International journal of surgical pathology*, 22(1), 12–32. <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>
- Chauca, L. (1997) Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO Perú
- Chauca L. (2007). Realidad y perspectiva de la crianza de cuyes en los países andinos. *Rev Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15(1), 223 - 228.
- Chauca, F.; Zaldívar, A. & Muscari, G. (1992). Efecto del empadre post parto y post destete sobre el tamaño y peso de la camada en cuyes. San José, Costa Rica, IICA
- Chaves, R.; Martins, M.; Saraiva, M.; Celestino, J.; Lopes, C.; Correia, J.; Lima Verde, I.; Matos, M.; Báok, S.; Name, K.; Campello, C.; Silva, J. & Figueiredo, J. (2008). Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 20, 640–647.
- Christie, D.; Bailey, J. & Bell E. (1972). Classification of Cell Types in Vaginal Smears

- During the Canine Oestrous Cycle. *British Veterinary Journal*, 128, 6. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)36935-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)36935-X).
- Clark, B.R.; Price, E.O. (1981). Sexual maturation and fecundity of wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of reproduction and fertility*. 63, 215-20.
- Cooper, R.L. & Goldman, J.M. (1999). Vaginal cytology. En: G. Daston , C. Kimmel, (Eds). *An evaluation and interpretation of reproductive endpoints for human health risk assessment*. (pp. 42–56). Washington, DC: ILSI Press.
- Cora, M.C.; Kooistra, L. & Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: Review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793. doi: 10.1177/0192623315570339
- Cummins, J. & Yanagimachi, R. (1982). Sperm egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete research* ,5:239-256.
- Daly, T.J. & Kramer, B. (1998). Alterations in rat vaginal histology by exogenous gonadotrophins. *Journal of Anatomy*, 193, 469-472. doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19330469.x
- Deanesly, R. (1963). Early embryonic growth and progestagen function in ovariectomized guinea-pigs. *J. Reprod. Fert.* 6, 143.
- Dey P. (2018a). Haematoxylin and Eosin Stain of the Tissue Section. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_8
- Dey P. (2018b) Fixation of histological samples: principles, methods and types of fixatives. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_1
- Dey, P. (2018c). Routine Staining in Cytology Laboratory. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_14
- Donovan, B.T., & Lockhart, A.N. (1972). Light and the timing of ovulation in the guinea-pig. *Journal of reproduction and fertility*, 30(2), 207–211. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0300207>
- Duffy, D.; Ko, C.; Jo, M.; Brannstrom, M. & Curry, T. (2019). Ovulation: Parallels with

inflammatory processes, *Endocr Rev.* 40(2), 369-416. DOI: 10.1210/er.2018-00075

Durdu M. (2019) History of Cytology. In: *Cutaneous Cytology and Tzanck Smear Test*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10722-2_1

Durrant, B.; Czekala, N.; Olson, M.; Anderson, A.; Amodeo, D.; Campos-Morales, R.; Gual-Sill, F. & Ramos-Garza, J. (2002). Papanicolaou staining of exfoliated vaginal epithelial cells facilitates the prediction of ovulation in the giant panda. *Theriogenology*, 57(7), 1855–1864.

Eddy, E. & Walker, B. (1969) Cytoplasmic fine structure during hormonally controlled differentiation in vaginal epithelium. *Anat. Rec.* 164, 205-218

Everett, J. & Sawyer, C. (1950). A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 47 (3), 198-218

Fatet, A.; Pellicer-Rubio, M. & Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal reproduction science*, 124(3-4), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.029>

Feder, H.; Resko, J. & Goy, R. (1968). Progesterone concentrations in the arterial plasma of guinea-pigs during the oestrous cycle. *J Endocrinol.* 40(4):505-13. doi: 10.1677/joe.0.0400505

Forde, N.; Beltman, M., Lonergan, P.; Diskin, M.; Roche, J. & Crowe, M. (2011) Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2011 Apr;124(3-4):163-9. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.025.

Forsberg J. (1973). Cervicovaginal epithelium: its origin and development. *American journal of obstetrics and gynecology*, 115(7), 1025–1043. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(73\)90687-x](https://doi.org/10.1016/0002-9378(73)90687-x)

Freeman, M. (2006). The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. In *Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J.D. Neill, eds.) pp. 613-658

Furukawa, S.; Hayashi, S.; Abe, M.; Hagio, S.; Irie, K.; Kuroda, Y.; Ogawa, I. & Sugiyama, A. (2013) Background data on developmental parameters during the gestation period in rats. *J Toxicol Pathol.* 26: 83–88.

Gal, A.; Lin, P.C.; Barger, A.M.; Mac Neill, A.L. & Ko, C. (2014). Vaginal fold histology

- reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages. *Toxicologic Pathology*, 42(8), 1212-1220. <https://doi.org/10.1177/0192623314526321>
- Galassi, P. & Gullace, F. (2014). *Reproducción en animales de laboratorio*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires.
- Garder, W. (1959). Sensitivity of the vagina to estrogen: genetic and transmitted differences. *Ann NY Acad Sci*, 83,145-159
- Garris, D.R., & Foreman, D. (1984). Follicular growth and atresia during the last half of the luteal phase of the guinea pig estrous cycle: relation to serum progesterone and estradiol levels and utero-ovarian blood flow. *Endocrinology*, 115(1), 73–77. <https://doi.org/10.1210/endo-115-1-73>
- Garverick, H. & Smith, M. (1993). Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9(2), 223-47. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30643-5
- Gimenez-Conti, I.; Lynch, M.; Roop, D.; Bhowmik, S.; Majeski, P.;& Conti, C.J. (1994). Expression of keratins in mouse vaginal epithelium. *Differentiation; research in biological diversity*, 56(3), 143–151.
- Ginther, O.J. (1974). Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. 39(3), 550-564.
- Gluckman, T.; Walz, S.; Schultz-Darken, N, & Bolton, I. (2004). Cytologic assessment of the vaginal epithelium in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a preliminary new approach to reproductive screening. *Contemporary topics in laboratory animal science*, 43(2), 28–31.
- Goldman, J.; Murr, A. & Cooper, R. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research. Part B Development and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97. doi: 10.1002/bdrb.20106
- Gougeon, A.; Ecochard, R. & Thalabard, J. (1994). Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biology of reproduction*, 50(3), 653–663. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.653>

- Grégoire, A.; Allard, A.; Huamán, E.; León, S.; Silva, R.M.; Buff, S.; Berard, M. & Joly, T. (2012) Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Theriogenology* 78(4), 842-847, doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.034>
- Grégoire, A.; Joly, T.; Huamán, E.; Silva, R.M. & 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
- Guáqueta, H. (2009). Ciclo estral: Fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56(III),163-183. [fecha de Consulta 20 de Junio de 2022]. ISSN: 0120-2952. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407639221003>
- Gupta, P.D.; Vijayasradhi, S. & Reddy, A.G. (1989). Keratinization of rat vaginal epithelium. III. Effect of estradiol on keratinization. *Biology of the cell*, 65(3), 281–289. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1768-322X.1989.tb00800.x>
- Hasegawa, A.; Mochida, K.; Inoue, H.; Noda, Y.; Endo, T.; Watanabe, G. & Ogura, A. (2016) High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biol Reprod.* 94(1):21. doi: 10.1095/biolreprod.115.134023.
- Herbison, A. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol.* 12(8), 452-66. doi: 10.1038/nrendo.2016.70.
- Hermreck, A.S. & Greenwald, G.S. (1964). The effects of unilateral ovariectomy on follicular maturation in the guinea pig. *The Anatomical Record*, 148, 171 -176. <https://doi.org/10.1002/ar.1091480207>
- Hernandez, S.; Smith, C.R.; Shen, A.; Mittendorf, R.; Hauser, W.A.; Yerby, M. & Holmes, L.B. (2012). Comparative safety of antiepileptic drugs during pregnancy. *Neurology*, 78(21), 1692-1699.
- Hiemstra, M.; Schaefers-Okkens, A.; Teske, E. & Kooistra, H. (2001). De betrouwbaarheid van vaginacytologie bij het bepalen van het optimale dektijdstip bij de teef [The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 126(21), 685–689
- Hirshfield, A. & Midgley, A. (1978). Morphometric analysis of follicular development in

the rat. *Biology of reproduction*, 19(3), 597–605.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod19.3.597>

- Hoffmann, H.M. (2018). Determination of Reproductive Competence by Confirming Pubertal Onset and Performing a Fertility Assay in Mice and Rats. *Journal of Visualized. Experiments. JoVE*, (140), 58352. doi:10.3791/58352
- Hohl, D. (1990). Ein neuer Stern am Himmel der epidermalen Proteine: Loricrin--was ist das? [A new star in the heavens of epidermal proteins: loricrin--what is it?]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 41(6), 299–301.
- Holderegger, C. (1980). Ultrastructural study of the mucification of the stratified epithelium of the mouse vagina. *Cell Tissue Res.* 213(3):475-82. doi: 10.1007/BF00237892
- Holst, P.& Phemister, R. (1975). Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch. *American journal of veterinary research*, 36(5), 705–706.
- Hubscher, C.; Brooks, D. & Johnson, J. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem.* 80(2):79-87. doi: 10.1080/10520290500138422.
- Hutz, R.J.; Bejvan, S.M.; Durning, M. & Dierschke, D.J. (1990). Changes in follicular population, in serum strogen and progesterone, and in ovarian steroid secretion in vitro during the guinea pig estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 42(2),266-272. doi: 10.1095/biolreprod42.2.266
- Jeffcoate, L & Lindsay, F. (1989). Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *J. Reprod. Fertil.* 277-287
- Kelly, G. & Papanicolaou, G. (1927). The mechanism of the periodical opening and closing of the vaginal orifice in the guinea-pig. *Am J Anat* 40,387–411
- Kosaka, T.; Hokao, R.; Takahashi, K. & Saito, T. (1993). Copulatory behavior of sexually inexperienced male guinea pigs paired with synchronized estrus females. *Jikken Dobutsu.* 42(2):261-4. doi: 10.1538/expanim1978.42.2_26
- Kosaka, T.; Obata, M.; Sugimoto, K.; Saito, T.; Takahashi, K. & Sugiyama, M. (1994) Effects of long term progesterone treament on the timing of puberty in female Guinea Pigs. *Journals of reproduction and development.* 40(1): 49-54

- Kühnel, W. & Mendoza, A. (1992). Scanning electron microscope investigations on the vaginal epithelium of the guinea pig during the estrous cycle. *Archives of Histology and Cytology* 55, 205-210. doi: 10.1679/aohc.55.suppl_205
- Kvinnsland, S. & Abro, A. (1973). Epithelial ultrastructure and the distribution of an estradiol sensitive antigen in the vagina of adult mice. *Z. Zellforsch.* 136: 263-275
- Labhsetwar, A. & Milton Diamond, A. (1970) Ovarian Changes in the Guinea Pig During Various Reproductive Stages and Steroid Treatments, *Biology of Reproduction*, 2(1), 53–57, <https://doi.org/10.1095/biolreprod2.1.53>
- Li, S. & Davis, B. (2007). Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 80(3):246-52. doi: 10.1002/bdrb.20120
- Li, S.; Herrera, G.; Tam, K.; Lizarraga, J.; Beedle, M. & Winuthatayanon, W. (2018). Estrogen Action in the Epithelial Cells of the Mouse Vagina Regulates Neutrophil Infiltration and Vaginal Tissue Integrity. *Sci Rep* 8, 11247 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29423-5>
- Lilley, K.G.; Epping, R.J. & Hafner L.M. (1997). The guinea pig estrous cycle: correlation of vaginal impedance measurements with vaginal cytologic findings. *Laboratory Animal Science*, 47(6), 632-637.
- Logothetopoulos J, Dorrington J, Bailey D, Stratis M. (1995). Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *Anat Rec* 243:37–48.
- Long, J. A. & Evans, H. M. (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. Berkeley, California:Memories of the University of California, 6, 1-148
- Loose, M. & Terasawa, E. (1985). Pulsatile infusion of luteinizing hormone-releasing hormone induces precocious puberty (vaginal opening and first ovulation) in the immature female guinea pig. *Biology of reproduction*, 33, 1084-1093.
- Luna, F.; Cortés, M.; Flores, M.; Hernández, B.; Trujillo, A. & Domínguez, R. (2003). The effects of superior ovarian nerve sectioning on ovulation in the guinea pig. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 61(1), 2-7. doi: 10.1186 / 1477-7827-1-61
- Malik, M.; Roh, M. & England, S. (2021). Uterine contractions in rodent models and humans. *Acta physiologica* 231(4), e13607. <https://doi.org/10.1111/apha.13607>

- Marcondes, F.; Bianchi, F. & Tanno, A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008
- Martensson, L. (1984). The pregnant rabbit, guinea pig, sheep and rhesus monkey as models in reproductive physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*18(3):169-82. doi: 10.1016/0028-2243(84)90016-9
- McCracken, J.; Carlson, J. & Glew, M. (1972). Prostaglandin F2a identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature* 238:129 –134 doi: <https://doi.org/10.1038/newbio238129a0>
- McLean, A.; Valenzuela, N.; Fai, S.& Bennett, S. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp* 67, 4389–4389.
- Merkwitz, C.; Blaschuk, O.; Eplinius, F.; Winkler, J.; Prömel, S., Schulz, A. & Ricken, A. (2016). A simple method for inducing estrous cycle stage-specific morphological changes in the vaginal epithelium of immature female mice. *Laboratory animals*, 50(5), 344–353. <https://doi.org/10.1177/0023677215617387>
- Messinis, I. (2006). From menarche to regular menstruation: endocrinological background. *Ann N Y Acad Sci*, 1092, 49-56. doi: 10.1196/annals.1365.004
- Montes, G. & Luque, E. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anatomica*, 133, 192-199.
- Montes, G. & Luque, E. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anatomica*, 133, 192-199.
- Moons, K.; Altman, D. & Reitsma, J. (2015). Transparent reporting of a multivariate prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration . *Ann Intern Med*, 162: W1 – W73
- Muro, Y.; Hasuwa, H.; Isotani, A.; Miyata, H.; Yamagata, K.; Ikawa, M.; Yanagimachi, R. & Okabe, M. (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol Reprod* 94:80.
- Muschelli J. (2020). ROC and AUC with a Binary Predictor: a Potentially Misleading Metric. *Journal of classification*, 37(3), 696–708. <https://doi.org/10.1007/s00357-019-09345-1>

- Myers, H. I., Young, W. C. & Dempsey, E. W. (1936). Graafian follicle development throughout the reproductive cycle in the guinea pig, with special reference to changes during oestrus (sexual receptivity). *Anat. Rec.* 65, 381.
- Niswender, G.; Juengel, J.; Silva, P.; Rollyson, M. & McIntush, E.W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.*, 80,1-29.
- Norris, M. & Adams, C. (1979). The vaginal smear, mating, egg transport and preimplantation development in a wild guinea-pig, the cuis (*Galea musteloides*). *J Reprod Fertil.* 55(2):457-61. doi: 10.1530/jrf.0.0550457
- Okkens, A.; Dieleman, S. & Vogel, F. (1985). Determination of the ovulation period in the dog a comparison of the rapid progesterone assay, vaginoscopy and vaginal cytology. In: Voorjaarsdagen 1985 Proceedings of the Netherlands Sm. Anim. Vet. Ass. (Amsterdam, Netherlands) pp. 26-27 (1985).
- Ozgur, O. & Bulent, U. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*, 25(12), 2944-2954.
- Paccola, C.; Resende, C.; Miraglia, S. & Cipriano, I. (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction*, 10(4), 677-683
- Pallares, P. & Gonzalez-Bulnes, A. (2009) A new method for induction and synchronization of oestrus and fertile ovulations in mice by using exogenous hormones. *Lab Anim.* 43(3):295-299. doi: 10.1258/la.2008.008056
- Papanicolaou, G. & Traut, H. (1941) The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol*, 42: 193-206
- Peddie, M. J. (1980a). Follicular development in the immature guinea-pig. *The Journal of endocrinology*, 84(3), 323–331. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0840323>
- Peddie, M. J. (1980b). Follicular development in the adult guinea-pig and responses to human chorionic gonadotrophin. *The Journal of endocrinology*, 85(1), 9–16. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0850009>
- Pedersen, T. & Peters, H. (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(3), 555-557. doi: 10.1530/jrf.0.0170555
- Perry, J. & Rowlands, I. (1963). Hypophysectomy of the immature guinea pig and the

- ovarian response to gonadotrophins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 6, 393-404.
- Pessina, M.A.; Hoyt, R.H.; Goldstein, I. & Traish, A.M. (2006). Differential effects of estradiol, progesterone, progesterone y testosterone on vaginal structural integrity. *Endocrinology* 147(1), 61-69. doi: 10.1210 / en.2005-0870
- Piekarski, D.J.; Johnson, C.; Boivin, J.R.; Thomas, W.; Lin, W.C.; Delevich, K.; Galarce, E. & Wilvrecht, L. (2017) Does puberty mark a transition in sensitive period for plasticity in the associative neocortex?. *Brain, Research* <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.042>
- Pohler, K.; Araujo, G.; Reese, S. & Smith, M. (2020). Physiology and pregnancy of beef cattle. Bazer, F., Lamb, G. & Wu, G. (Eds), *Animal Agriculture*(pp,37-55) Academic Press doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00003-3>.
- Ramirez, D. & McCann, S. (1963). Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. *Endocrinology*. 72, 452-64. doi: 10.1210/endo-72-3-452. PMID: 13990649.
- Reed, M.; Burton, F. & Van Diest, P. (1979). Ovulation in the guinea-pig. I. The ruptured follicle. *J Anat.*128(Pt 1):195-206.
- Richards, J.S., Jonassen, J.A., & Kersey, K. (1980). Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology*, 107(3), 641–648. 10.1210/endo-107-3-641
- Rimon-Dahari, N.; Yerushalmi-Heinemann, L.; Alyagor, L. y Dekel, N. (2016). Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ*. 58, 167-190. doi: 10.1007/978-3-319-31973-5_7
- Robker, R.; Hennebold, J. & Russell, D. (2018). Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. *Endocrinology*. 159(9):3209-3218. doi: 10.1210/en.2018-00485
- Rubio,C.A. (1976). The exfoliating cervico-vaginal surface. II. Scanning electron microscopical studies during the estrous cycle in mice. *Anat Rec* 185, 359–72
- Saavedra, J. (2014). Importancia de la biología celular y tisular y técnicas de estudio de células y tejidos. Saavedra J, & Domínguez A(Eds.), (2014). *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular*, 2e. McGraw 98181904

- Sadeu, J.C.; Adriaens, I.; Cortvrindt, R. & Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, 68(9), 1228-1239. doi: 10.1016 / j.theriogenology.2007.08.028
- Sanyal, M. (1978). Secretion of progesterone during gestation in the rat. *J Endocrinol.* 79(2),179-90. doi: 10.1677/joe.0.0790179
- Sarkar, D.; Chiappa, S.; Fink, G. & Sherwood, N. (1976). Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature* 264:461-463
- Sato, T.; Fukazawa, Y.; Kojima, H.; Enari, M.; Iguchi, T. & Ohta, Y. (1997). Apoptotic cell death during the estrous cycle in the rat uterus and vagina. *Anat Rec* 248:76–83
- Schatten, H. (2007). Histology, celular and molecular biology of reproductive organs. En: H. Schatten (Ed). *Comparative reproductive biology* (pp. 61-68). Blackwell Publishing
- Schutte, A. (1967). Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. *J Small Anim Pract.* 8(6):301-6. doi: 10.1111/j.1748-5827.1967.tb04554.x.
- Sheaff M.T., Singh N. (2013) *The Female Genital Tract*. In: *Cytopathology*. Springer, London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2419-1_10
- Shi, F.; Watanabe, G.; Trewin, A.; Hutz, R.& Taya, K. (2000). Localization of ovarian inhibin/activin subunits in follicular dominance during the estrous cycle of guinea pigs. *Zoological Science*, 17(9), 1311- 1320. DOI: 10.2108/zsj.17.1311
- Simmons, J. (1970). The vaginal smear and its practical application. *Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician*, 65, 369–373
- Soede, N.; Wetzels, C.; Zondag, W.; de Koning, M. & Kemp, B. (1995). Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of reproduction and fertility*, 104(1), 99–106. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1040099>
- Soede, N.M.; Wetzels, C.C.H.; Zondag, W.; De Koning, A.I. & Kemp, B. (1995). Effects of time of insemination relative to ovulation was determined by ultrasonography on fertilization rate and accesory sperm count in sows. *Reproduccion*, 104(1), 99-106. doi: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1040099>
- Souza-Fabjan, J.; Brair, V.; Dos Santos Silva, D.; Schmidt, A.; Figueira, L.; Rangel, P.;

- Vergani, G.; de Oliveira Machado, V.; Oliveira, M. & da Fonseca, J.F. (2021). Vaginal cytology and cervical mucus as tools to predict ovulation time in small ruminants. *Tropical animal health and production*, 53(2), 223. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02667-6>
- Srinivas, M.; Lakshmi Rani, N.; Suresh H. & Sreenu, M. (2004). Vaginal exfoliative cytology as a tool in diagnosing reproductive disorders in bitches. *Intas Polivet*, 5, 354–356.
- Stockard, C.R. & Papanicolaou, G.N. (1917). A rhythmical "Heat period" in the guinea pig, *Science* (New York, N.Y.), 46(1176), 42-44. doi: 10.1126/science.46.1176.42
- Susuki, O.; Koura, M.; Noguchi, Y.; Takano, K.; Yamamoto, Y. & Matsuda, J. (2003). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH receptor homologies. *Molecular Reproduction and Development*, 64(2), 219-225. doi: 10.1002 / mrd.10242
- Takagi, K.; Yamada, T.; Miki, Y.; Umegaki, T.; Nishimura, M. & Sasaki, J. (2007). Histological observation of the development of follicles and follicular atresia in immature rat ovaries. *Acta Medica Okayama*, 61(5), 283-298. doi: 10.18926 / AMO / 32892
- Tasat, D. (1994). Regulación hormonal del epitelio vaginal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2681_Tasat.pdf
- Trifonoca, O.; Lokvov, P. & Archakov, A. (2014) *Biomeditsinskaia khimiia*, 60(3), 281-294 <https://doi.org/10.18097/pbmc2014600328>
- Vijayasaradhi, S.; Khar, A. & Gupta P.D. (1987) Effect of steroid hormone on vaginal epithelial cells: An in vitro model for steroid hormone action. *J. Biosci.* 12, 257-265
- Visfeldt, J. & Starup, J. (1975). Histology of the human corpus luteum of early and late pregnancy. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology*, 83(6), 669–677. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1975.tb01396.x>
- Walmer, D., Wrona, M., Hughes, C. & Nelson, K. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131(3), 1458-1466. doi: 10.1210/endo.131.3.1505477.

- Walmer, D.; Wrona, M.; Hughes, C. & Nelson, K. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131(3), 1458–1466. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505477>
- Wang, W.; Liu, H.; Tian, W.; Zhang, F.; Gong, Y.; Chen, J.; Mao, D. & Shi, F. (2010). Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 11(5), 307–314. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900391>
- Westwood, F. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol.* 36(3),375-384. doi: 10.1177/0192623308315665.
- Wright, P. & Parry, B. (1989). Cytology of the canine reproductive system. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 19(5), 851-74. doi: 10.1016/s0195-5616(89)50102-
- Yang, S & Berdine, G. (2017). The receiver operating characteristic (ROC) curve. *The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles.* 5. 34. [10.12746/swrccc.v5i19.391](https://doi.org/10.12746/swrccc.v5i19.391).
- Young, J.& McNeilly, A. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.*140(4), 489-504. doi: 10.1530/REP-10-0094
- Young, W.; Boling J. & Blandau, R. (1941). The vaginal smear picture sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat rec.* 80: 37-45
- Young, W.; Myers, H. & Dempsey, E. (1933). Some data from a correlated anatomical, physiological, and behavioristic study of the reproductive cycle in the female guinea pig. *Am. J. Physiol.* 105, 393–398.
- Zhou, J.; Peng, X. & Mei, S. (2019). Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *International journal of biological sciences*, 15(4), 726–737. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Peso inicial de cuyes hembras distribuidos en grupos a las 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post ultima dosis de progesterona.

| Grupo | Repetición | Peso inicial(Kg) | Grupo | Repetición | Peso inicial (Kg) |
|---------------------------|------------|------------------|----------|------------|-------------------|
| G1 (72h) | R1 | 1,19 | G4(108h) | R1 | 1,13 |
| | R2 | 0,98 | | R2 | 1,09 |
| | R3 | 1,22 | | R3 | 1,09 |
| | R4 | 0,99 | | R4 | 0,97 |
| | R5 | 0,86 | | R5 | 0,86 |
| | R6 | 1,00 | | R6 | 1,02 |
| G2 (84h) | R1 | 1,19 | G5(120h) | R1 | 1,10 |
| | R2 | 1,15 | | R2 | 0,96 |
| | R3 | 1,00 | | R3 | 1,23 |
| | R4 | 0,95 | | R4 | 0,99 |
| | R5 | 0,85 | | R5 | 0,82 |
| | R6 | 0,95 | | R6 | 0,99 |
| G3(96h) | R1 | 1,09 | G6(132h) | R1 | 1,02 |
| | R2 | 1,05 | | R2 | 1,09 |
| | R3 | 1,22 | | R3 | 0,98 |
| | R4 | 0,94 | | R4 | 0,90 |
| | R5 | 0,92 | | R5 | 0,98 |
| | R6 | 1,00 | | R6 | 1,10 |
| Promedio peso (Kg) = 1,02 | | | | | |

Anexo 2: Resumen de datos obtenidos por histología ovárica, citología vaginal, histología vaginal y apertura vaginal a las 72, 84, 96, 108, 120 y 132h post ultima dosis de progesterona

| | | Citología Vaginal | | | | | | Histología vaginal | | | | | | Apertura vaginal | Ovulación | |
|-----|----|-------------------|-------|-------|-------|-----|-----|--------------------|--------------|----------|----------|----------|---------|------------------|----------------|----------------|
| | | PB (%) | I (%) | S (%) | C (%) | CF | LEU | MUC (%) | MUC-CORN (%) | CORN (%) | GRAN (%) | GERM (%) | L.E (%) | L.L (%) | AP (NO-0 SI-1) | Ov (NO-0 SI-1) |
| 72h | r1 | 7,8 | 88,2 | 2,0 | 2,0 | 1,0 | 3,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 10,0 | 0 | 0 |
| | r2 | 12,7 | 84,1 | 0,4 | 2,9 | 1,0 | 4,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 43,3 | 0 | 0 |
| | r3 | 42,1 | 55,3 | 0,9 | 1,7 | 4,0 | 3,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,7 | 0 | 0 |
| | r4 | 11,3 | 33,9 | 54,0 | 0,8 | 5,0 | 4,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 13,3 | 0 | 0 |
| | r5 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 5,0 | 2,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 73,3 | 0 | 0 |
| | r6 | 0,0 | 98,1 | 0,0 | 1,9 | 2,0 | 2,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 6,7 | 0 | 0 |
| 84h | r1 | 31,2 | 68,8 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 2,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0 | 0 |
| | r2 | 4,5 | 86,4 | 7,3 | 1,8 | 4,0 | 2,0 | 90,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 50,0 | 0 | 0 |
| | r3 | 13,7 | 60,2 | 11,2 | 14,9 | 1,0 | 5,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 23,3 | 0 | 0 |
| | r4 | 6,9 | 56,7 | 28,4 | 7,9 | 4,0 | 2,0 | 0,0 | 86,2 | 13,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 13,3 | 0 | 0 |
| | r5 | 0,0 | 93,9 | 1,8 | 4,4 | 1,0 | 2,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0 | 0 |
| | r6 | 25,3 | 73,1 | 1,2 | 0,5 | 5,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 50,0 | 0 | 0 |
| 96h | r1 | 0,5 | 20,5 | 63,2 | 15,8 | 4,0 | 1,0 | 0,0 | 83,3 | 16,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,3 | 1 | 0 |
| | r2 | 13,3 | 22,3 | 63,1 | 1,2 | 3,0 | 2,0 | 0,0 | 96,7 | 3,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 26,7 | 0 | 0 |
| | r3 | 37,2 | 30,9 | 22,3 | 9,5 | 2,0 | 1,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 40,0 | 0 | 0 |
| | r4 | 4,3 | 35,9 | 59,1 | 0,7 | 4,0 | 4,0 | 13,3 | 83,3 | 3,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 90,0 | 0 | 0 |
| | r5 | 15,4 | 20,9 | 63,5 | 0,2 | 3,0 | 3,0 | 0,0 | 93,3 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 93,3 | 0 | 0 |
| | r6 | 26,0 | 33,8 | 29,5 | 10,7 | 3,0 | 2,0 | 30,0 | 63,3 | 6,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | 0 | 0 |

Continua ...

| | | Citología Vaginal | | | | | | Histología vaginal | | | | | | Apertura vaginal | Ovulación | |
|------|----|-------------------|-------|-------|-------|-----|-----|--------------------|--------------|----------|----------|----------|---------|------------------|----------------|----------------|
| | | PB (%) | I (%) | S (%) | C (%) | CF | LEU | MUC (%) | MUC-CORN (%) | CORN (%) | GRAN (%) | GERM (%) | L.E (%) | L.L (%) | AP (NO-0 SI-1) | Ov (NO-0 SI-1) |
| 108h | r1 | 60,3 | 23,0 | 10,0 | 6,7 | 6,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 93,0 | 0,0 | 0 | 1 |
| | r2 | 0,6 | 18,4 | 72,8 | 8,2 | 5,0 | 1,0 | 0,0 | 66,7 | 33,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 33,3 | 1 | 0 |
| | r3 | 36,1 | 13,3 | 29,9 | 20,7 | 9,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 1 | 1 |
| | r4 | 0,7 | 14,2 | 77,1 | 8,0 | 2,0 | 4,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 56,7 | 0 | 0 |
| | r5 | 11,3 | 27,1 | 58,3 | 3,3 | 3,0 | 3,0 | 0,0 | 53,3 | 43,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1 | 0 |
| | r6 | 0,2 | 1,3 | 50,0 | 48,5 | 2,0 | 2,0 | 0,0 | 46,7 | 53,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1 | 0 |
| 120h | r1 | 0,1 | 0,2 | 4,5 | 95,2 | 5,0 | 1,0 | 0,0 | 13,3 | 86,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0 | 1 |
| | r2 | 7,9 | 14,2 | 41,1 | 36,7 | 5,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 66,7 | 13,3 | 1 | 1 |
| | r3 | 0,6 | 5,4 | 67,5 | 26,5 | 5,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 36,7 | 0,0 | 0 | 0 |
| | r4 | 5,0 | 12,2 | 65,8 | 17,1 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 80,0 | 20,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,3 | 0 | 0 |
| | r5 | 0,0 | 9,1 | 60,5 | 30,4 | 6,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1 | 1 |
| | r6 | 0,7 | 9,3 | 43,7 | 46,3 | 4,0 | 1,0 | 0,0 | 53,3 | 46,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1 | 0 |
| 132h | r1 | 46,1 | 2,6 | 15,9 | 35,5 | 8,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1 | 1 |
| | r2 | 0,0 | 1,1 | 47,8 | 51,1 | 7,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,3 | 1 | 0 |
| | r3 | 49,9 | 39,6 | 0,4 | 10,1 | 4,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 46,7 | 0,0 | 1 | 1 |
| | r4 | 54,9 | 24,9 | 4,2 | 16,0 | 3,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 50,0 | 0,0 | 1 | 1 |
| | r5 | 8,5 | 40,9 | 29,2 | 21,4 | 4,0 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 16,7 | 0,0 | 1 | 1 |
| | r6 | 14,9 | 42,2 | 7,2 | 35,7 | 3,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 0,0 | 30,0 | 0,0 | 1 | 1 |

PB, célula parabasal; I, células intermedias; S, célula superficial; C, célula cornificada; CF, celularidad del frotis; LEU, leucocitos en el frotis; MUC, estrato mucificado recubre la mucosa vaginal; MUC-CORN, estrato mucificado seguido del estrato córneo recubren la mucosa vaginal; CORN, estrato córneo recubre la mucosa vaginal; GRAN, estrato granuloso recubre la mucosa vaginal; GERM, estrato germinativo recubre la mucosa vaginal; LE, infiltración de leucocito en epitelio vaginal; LL, infiltración de leucocito en el lumen vaginal; AP, apertura vaginal; Ov, Ovulación