

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto del ciclo lunar en algunas características morfológicas y funcionales del ovario en cobayas (*Cavia porcellus*)

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

Autores:

Luz Isabel Camas Caranguí

Natalia Soledad Chabla Morquecho

Director:

Fernando Pedro Perea Ganchou

ORCID:  0000-0001-8301-6339

Cuenca, Ecuador

2024-07-24

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia del ciclo lunar (CL) sobre las concentraciones séricas de progesterona y estradiol, y el recuento folicular en cobayas. Ochenta cobayas nulíparas, de 3-3,5 meses de edad y un peso de 1061 ± 90 g fueron asignadas aleatoriamente a cuatro puntos temporales ($n=20$ cada uno; 5 animales por fase durante 4 CL consecutivos) del CL: luna nueva (LN); cuarto creciente (CC); luna llena (LL); cuarto menguante (CM). Los animales estuvieron en ayunas durante 12 horas y fueron anestesiados con sevoflurano. En estado inconsciente, se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca y los animales fueron sacrificados inmediatamente por dislocación cervical. Se extrajeron y pesaron los ovarios, y uno de ellos se procesó histológicamente. Se contaron las diferentes categorías de folículos en el ovario entero por duplicado (dos cortes separados por $250 \mu\text{m}$) bajo un estereoscopio. Las concentraciones de progesterona y estradiol se cuantificaron por quimioluminiscencia. Los datos se analizaron mediante el modelo lineal general y la prueba de medias del último cuadrado de SAS. El peso ovárico y el índice gonadosomático no se vieron influidos por la fase lunar. El CL influyó en las concentraciones séricas de progesterona ($P=0,0489$) y estradiol ($P<0,0001$). La progesterona fue mayor ($P<0,05$) en LN ($5 \pm 0,7$ ng/ml) que en LL ($2,6 \pm 0,7$ ng/ml) y CM ($3,1 \pm 0,7$ ng/ml). El estradiol fue mayor ($P<0,0001$) en LN ($86,8 \pm 3$ pg/ml) que en CC ($71,7 \pm 2,9$ pg/ml), LL ($77,1 \pm 2,9$ pg/ml) y CM ($70,3 \pm 3$ pg/ml). El CL afectó al número ($P=0,0005$) y al porcentaje ($P=0,0014$) de folículos antrales grandes (FAG). El número de FAG fue mayor en LN ($3,0 \pm 0,49$) que en CC ($2,0 \pm 0,48$; $P>0,05$), LL ($0,6 \pm 0,46$) y CM ($0,8 \pm 0,49$) ($P<0,01$). El número ($P=0,0019$) y el porcentaje ($P=0,0013$) de folículos primordiales (FP) se vieron influidos por la fase lunar, con valores más bajos en el número de FP en CM ($13,3 \pm 1,7$) que en LN ($18,8 \pm 1,6$), CC ($20,3 \pm 1,6$) y LL ($22,5 \pm 1,5$) ($P<0,01$). En conclusión, el CL influyó en las concentraciones circulantes de esteroides ováricos y en las proporciones de folículos antrales grandes y primordiales en cobayas.

Palabras clave del autor: cobayas, hormonas sexuales, fase lunar



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

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

Abstract

This study aimed to assess the influence of the lunar cycle (LC) on serum progesterone and estradiol concentrations, and follicular count in guinea pigs. Eighty nulliparous guinea pigs, aged 3-3.5 months and weighing 1061 ± 90 g were randomly assigned to four time points (n=20 each; 5 animals per phase for 4 consecutive LCs) of the LC: new moon (NM); crescent quarter (CQ); full moon (FM); waning quarter (WQ). Animals were fasted for 12 hours and anesthetized with sevoflurane. In an unconscious state, blood samples were taken by cardiac puncture and the animals were immediately euthanized by cervical dislocation. Ovaries were removed and weighed, and one of them was histologically processed. Different categories of follicles in the whole ovary were counted by duplicate (two slices separated by 250 μ m) under a stereoscope. Progesterone (P4) and estradiol (E2) concentrations were quantified by chemiluminescence. Data were analyzed by the general lineal model and the last square means test of SAS. Ovarian weight and gonadosomatic index were not influenced by moon phase. LC influenced serum P4 ($P=0.0489$) and E2 ($P<0.0001$) concentrations. Progesterone was greater ($P<0.05$) in NM (5 ± 0.7 ng/ml) than in FM (2.6 ± 0.7 ng/ml) and WQ (3.1 ± 0.7 ng/ml). Estradiol was greater ($P<0.0001$) in NM (86.8 ± 3 pg/ml) than in CQ (71.7 ± 2.9 pg/ml), FM (77.1 ± 2.9 pg/ml) and WQ (70.3 ± 3 pg/ml). LC affected the number ($P=0.0005$) and percentage ($P=0.0014$) of large antral follicles (LAF). Number of LAF was greater in NM (3.0 ± 0.49) than in CQ (2.0 ± 0.48 ; $P>0.05$), FM (0.6 ± 0.46) and WQ (0.8 ± 0.49) ($P<0.01$). The number ($P=0.0019$) and percentage ($P=0.0013$) of primordial follicles (PF) were influenced by moon phase, with lower values in the number of PF in WQ (13.3 ± 1.7) than in NM (18.8 ± 1.6), CQ (20.3 ± 1.6) and FM (22.5 ± 1.5) ($P<0.01$). The number of corpora lutea and other follicular categories were similar among lunar phases. In conclusion, LC influenced circulating concentrations of ovarian steroids and the proportions of large and primordial antral follicles in guinea pigs.

Author keywords: guinea pigs, sex hormones, moon phase



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

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

Índice de contenido

Resumen	2
Introducción	12
Objetivos.....	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
Marco teórico	15
1. El cobayo.....	15
1.1. Características filogenéticas	15
1.2 Importancia del cobayo en la investigación científica y en la producción animal.....	15
2. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya	16
2.1. Vulva	16
2.2. Orificio vaginal y vagina.....	16
2.3. Útero y cuernos uterinos.....	17
2.4. Oviductos	17
2.5. Ovarios	17
3. Fisiología reproductiva de la cobaya.....	19
3.1. Ciclo estral.....	19
3.2. Estructuras funcionales ováricas y hormonas gonadales en la cobaya.....	20
4. Mecanismo endocrino que regula la ciclicidad reproductiva de la cobaya	21
5. Rol de la melatonina (MLT) en la regulación reproductiva de los mamíferos	21
6. Características histológicas del ovario	23
7. Determinación del ciclo estral mediante citología vaginal	24
8. Foliculogénesis	25
9. Tipos de folículos.....	26
10. Cuantificación folicular	27
11. Cuantificación de hormonas gonadales.....	28
12. Determinación de genes	29
13. El ciclo lunar y su efecto en aspectos biológicos de los animales.....	30
13.1. Efectos que produce el ciclo lunar en la tierra.....	30
13.2. Breve descripción de las bases biológicas de este fenómeno en peces	30
13.3. Evidencias científicas del efecto del ciclo lunar en mamíferos	31
13.4. Mecanismos biológicos que podrían explicar la variación de la reproducción por influencia del ciclo lunar	31

Materiales y métodos.....	33
1. Materiales	33
2. Metodología.....	33
2.1. Ubicación del estudio.....	33
2.2. Animales, manejo y dieta.....	34
2.3. Grupos experimentales.....	34
2.4. Manejo y eutanasia de los animales	35
2.5. Recolección, manejo y análisis de las muestras.....	36
2.5.1. Citología vaginal	36
2.5.2. Procesamiento histológico	37
2.6. Cuantificación de esteroides gonadales	39
2.7. Expresión génica de los receptores de melatonina, IGF-I y LH en el ovario	39
2.7.1. Extracción del ARN.....	39
2.7.2. Preparación de primers, la reacción y los NTPS (RT Premix)	40
2.7.3. Cuantificación relativa.....	40
2.7.4. Síntesis de ADN complementario (cDNA).....	41
2.7.5. Electroforesis para determinar las temperaturas óptimas de cada receptor ..	42
2.7.6. Preparación de los productos de PCR	43
2.7.7. Electroforesis de los productos de PCR.....	44
3. Variables de estudio	44
3.1. Variables dependientes	44
3.2. Variables independientes.....	45
3.3. Covariables.....	45
4. Análisis estadístico	45
Resultados.....	46
1. Peso del ovario e índice gonadosomático.....	46
2. Concentración de progesterona y estradiol.....	47
3. Número de folículos antrales y no antrales en cortes histológicos	48
4. Número de cuerpos lúteos en cortes histológicos	49
5. Expresión génica de los receptores de melatonina, IGF-I y LH en el ovario ..	50
Discusión	53
Conclusiones	56
Referencias	57
Anexos	67

Índice de figuras

Figura 1. Aparato reproductor de la cobaya	18
Figura 2. Síntesis de melatonina en los animales	22
Figura 3. Corteza y médula, hilio y mesovario del ovario	24
Figura 4. Ciclo estral de la cobaya	26
Figura 5. Momentos del ciclo lunar en los que se colectaron los ovarios de las cobayas	35
Figura 6. Aplicación de anestesia inhalatoria a las cobayas	36
Figura 7. Dislocador cervical usado en el estudio	36
Figura 8. Toma de citología vaginal en cobaya	37
Figura 9. Incisión en la línea alba para la extracción de los ovarios	37
Figura 10. Tubos con formol al 10% para la toma de muestra de ovario	38
Figura 11. Tubo eppendorf con el reactivo TRI Reagent Solution y la muestra de ovario	38
Figura 12. Temperaturas de amplificación del termociclador	44
Figura 13. Peso del ovario (Panel A) e índice gonadosomático (Panel B) en cobayas nulíparas en cuatro fases del ciclo lunar	46
Figura 14. Concentración sérica (panel A) y por miligramo de ovario (panel B) de progesterona en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar	47
Figura 15. Concentración sérica (panel A) y por miligramo de ovario (panel B) de estradiol en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar	48
Figura 16. Número de cuerpos lúteos de acuerdo a la fase del ciclo lunar	50
Figura 17. Expresión génica del receptor control GAPDH de acuerdo a cada fase de los ciclos lunares estudiados	50
Figura 18. Expresión genética de los receptores de melatonina A (MTRA) y B (MTRB)	51
Figura 19. Expresión genética para el receptor de la hormona luteinizante (LH)	52
Figura 20. Expresión genética para el receptor de IGF1	52
Figura 21. Colocación del antifaz a la cobaya	67
Figura 22. Toma de muestra para citología vaginal	67
Figura 23. Tinción Wright	67
Figura 24. Pesaje de los ovarios	67
Figura 25. Balanza analítica	67
Figura 26. Tubos al vacío con formol al 10%	67
Figura 27. Extracción del ARN de las muestras	68
Figura 28. Preparación de primers, la reacción y los NTPS	68
Figura 29. Preparación de las reacciones para PCR	68
Figura 30. Colocación de las muestras en el termociclador	68
Figura 31. Colocación de las muestras en el gel de agarosa para la electroforesis....	68
Figura 32. Fotodocumentador	68

Índice de tablas

Tabla 1. División taxonómica del cobayo.....	15
Tabla 2. Tipos de células según la fase estral mediante citología vaginal.....	25
Tabla 3. Lista de materiales.....	33
Tabla 4. Componentes que se utilizaron para la premezcla.....	40
Tabla 5. Muestras control con sus respectivos volúmenes para PCR.....	40
Tabla 6. Reacciones para PCR con sus respectivos volúmenes.	41
Tabla 7. Curva de temperatura de alineamiento.	42
Tabla 8. Temperaturas óptimas para el procesamiento de los diferentes receptores genéticos para PCR.....	43
Tabla 9. Mezcla de reacción para PCR.	43

Índice de cuadros

Cuadro 1. Número y porcentaje de folículos de diferentes categorías en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase lunar	49
--	----

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por darnos salud, vida y guiarnos en este camino, por permitirnos completar esta etapa académica y cumplir con una meta más de nuestras vidas.

Agradecemos a cada una de nuestras familias por brindarnos su apoyo incondicional y ser nuestra motivación. Un sincero agradecimiento a todos aquellos que aportaron de una forma u otra a cumplir nuestros objetivos.

Con profunda estima y reconocimiento extendemos nuestra más sincera gratitud a nuestro tutor, Dr. Fernando Perea, quien nos ha dado su tiempo, apoyo y dedicación. Su guía ha sido un pilar fundamental para que el presente trabajo llegue a su fin con éxito. De igual manera, nuestro agradecimiento al Dr. Antonio Vallecillo por su valioso apoyo en el desarrollo del presente proyecto.

Un especial agradecimiento al Dr. Hugo Hernández (Department of Anatomy, Physiolofy & Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Saint George's University, Grenada) y al Dr. Alejandro Aguirre (Fort Bend Animal Hospital, Rosenberg, Texas, USA) por el apoyo económico brindado a esta tesis.

A nuestros revisores de tesis: Dr. José Luis Pesantez, Dr. Luis Ayala, y Dr. Cornelio Rosales por haber aceptado ser parte, dedicar tiempo y empeño a este trabajo de titulación.

Nuestra gratitud se extiende a la Universidad de Cuenca por la oportunidad de ser parte de ella y brindar una educación de calidad. Agradecemos también a la Facultad de Ciencias Agropecuarias por habernos prestado sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto y a cada uno de nuestros docentes que nos han compartido sus conocimientos que serán de gran utilidad en nuestras carreras.

Isabel & Natalia

Dedicatoria

En el transcurso de esta etapa universitaria; sin duda alguna, muchas personas me han apoyado a llegar a este punto de mi vida; por ello, dedico este logro a quienes han sido mi soporte para afrontar los desafíos académicos y personales.

A Dios por bendecirme con la vida y darme la fuerza necesaria para llegar a este tan anhelado momento de mi formación profesional.

Emily, mi amada hija, el regalo más grande que Dios me pudo entregar, por ser mi mayor motivación que me empuja a seguir adelante. Tu dulzura y alegría han sido el impulso para conseguir este logro y algún día llegar a ser un ejemplo para ti.

A mi esposo, Franklin, quien ha estado a mi lado brindándome su apoyo constante, paciencia, comprensión y amor incondicional. Agradezco todo tu esfuerzo y tus consejos que compartes conmigo. Tus palabras de aliento en los momentos difíciles me han sostenido e impulsado a no abandonar este sueño.

A mis queridos padres, Luz y Manuel, quienes desde los inicios de mi carrera me brindaron todo su amor y apoyo, sus consejos y sabiduría. Gracias al gran sacrificio que han hecho ustedes, hoy esto es una realidad. Valoro toda su constante lucha y trabajo por brindarme días mejores, ahora comprendo que todo este proceso no habría sido posible sin ustedes.

A mi hermano Jhonnatan, gracias por ser ejemplo de superación y fuente de apoyo.

A mi tía Azucena y mi pequeño primo Josué (†), porque me han enseñado el valor de la valentía y la empatía; así como, a entender que la vida es tan efímera y vale la pena disfrutarla. Son mi ejemplo de lucha y fe hasta el final.

A mis amigos, sobre todo a mi amiga y compañera de tesis, Natalia, por su empatía y todos los buenos y malos momentos que compartimos juntas para alcanzar esta meta.

Y finalmente, a los docentes que fueron construyendo en mí el conocimiento y la ética profesional que sin duda serán de gran utilidad.

A cada uno de ustedes, les dedico este logro con sentimientos de infinita gratitud y amor, por su invaluable contribución a este viaje académico.

Isabel Camas

Dedicatoria

“No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta” José Luis Martín Descalzo. Esta tesis le dedico con todo mi corazón a:

A Dios por brindarme salud, vida, por guiarme y darme la fuerza para perseverar en cada paso de este viaje académico y por la oportunidad de vivir este momento anhelado de terminar mi carrera universitaria.

A mis queridos padres Wilson y Lupe, quienes son el pilar fundamental de mi vida y mi motivo de superación, a ustedes les dedicó este logro, por su apoyo incondicional, amor y por todo el esfuerzo que han realizado día a día por darme la oportunidad de estudiar y culminar la carrera de mis sueños, han estado conmigo en cada momento bueno y malo de mi vida y me han enseñado a no rendirme jamás.

A mi hermana Lupe Margarita, por ser mi mejor amiga, cómplice en todo y para todo, por su apoyo incondicional, cariño, comprensión y por estar conmigo impulsándome a cumplir mis metas. Esta tesis es el resultado de años de compartir risas, secretos y un corazón lleno de sueños.

A mis abuelitos por estar siempre al pendiente de mí, que de una u otra forma han estado presente a lo largo de mi carrera con sus sabios consejos que me enseñaron cosas vitales y me encaminaron por el buen sendero de la vida.

A mis tíos Virgilio y Teresa a la distancia, mi gratitud profunda hacia ustedes por el gran apoyo, han sido una presencia constante en mi vida y en mi carrera universitaria.

A toda mi gran familia por estar al pendiente de mi carrera, por el apoyo que siempre me brindaron en el transcurso de cada año de mis estudios.

A mi amiga y compañera de tesis Isabel, por su valiosa amistad, comprensión y sincero apoyo para culminar este sueño anhelado.

A aquella persona que a lo largo del trayecto de mi vida se convirtió en mi compañero de vida, gracias por todo el cariño, apoyo en los buenos y malos momentos, por celebrar conmigo mis éxitos y por motivarme a seguir luchando por mis metas anheladas.

A los docentes y médicos veterinarios de la facultad por impartir sus conocimientos y enseñanzas, por su paciencia y apoyo que me forjaron a lo largo de este tiempo.

Natalia Chabla

Introducción

La cobaya o cuy, es una especie que habita en países andinos principalmente en Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia. Esta especie se caracteriza por ser poliéstrica continua, el ciclo estral tiene una duración media de 16 días, pero puede variar de 13 a 21 días (Hargaden & Singer, 2012). Este animal a lo largo de la historia se ha convertido en un animal experimental dentro del ámbito científico, mismo que ha logrado avances importantes para la ciencia y para la humanidad (Usca et al., 2022).

Existen evidencias del efecto de la luna sobre algunos eventos biológicos en los humanos y animales como aves, insectos, peces y ratas (Zimecki, 2006); diferentes investigaciones han demostrado variaciones relevantes de la actividad reproductiva de los animales por influencia de las fases de la luna, no obstante, es necesario realizar más investigaciones para explicar los mecanismos exactos de esta influencia (Pichazaca & Zhirzhán, 2023).

El ciclo lunar tiene cuatro fases: luna nueva (LN), cuarto creciente (CC); luna llena (LL) y cuarto menguante (CM). La luna, tarda 29 días 12 h 44 minutos y 3 segundos (29,52 días) en completar un giro completo alrededor de la tierra. Durante este movimiento, y de acuerdo a su posición relativa con respecto al sol, la luna varía el porcentaje de luz que refleja. Según la posición de la luna en su órbita, ejerce influencia sobre el campo gravitacional y electromagnético de la tierra (Chakraborty, 2014). Se ha descrito la influencia del ciclo lunar en la reproducción, sobre todo en animales de granja [bovinos: (Aguirre et al., 2021); porcinos: (Chinchilla et al., 2018); caprinos: (El-Darawany et al., 2021)].

Palacios & Abecia (2014), realizaron un estudio con el objetivo de “*determinar el efecto de la fase lunar en el momento de la inseminación sobre la fertilidad, prolificidad y fecundidad en ovejas*”. Para lo cual realizaron 2724 inseminaciones artificiales (IA) tras la detección natural del estro (celo) mediante carneros vasectomizados o por tratamiento hormonal de ovejas. Churra demostraron la influencia de la fase lunar sobre la tasa de concepción, mostrando una interacción significativa con el tipo de estro.

En el caso de los insectos, algunos estudios realizados en animales expusieron que el ciclo lunar puede afectar los cambios hormonales en las primeras etapas de la filogénesis. Un experimento realizado en abejas reveló un ritmo de 29,5 días con respecto a los esteroides y triacilgliceroles en la hemolinfa de los antófilos, de igual manera el peso corporal de las abejas alcanzó su máximo nivel en la luna nueva (Mikulecky & Bounias, 1997).

En las aves, se ha expuesto que durante la fase de luna llena los niveles de melatonina y corticosterona disminuyen. De manera similar ocurre en los piqueros de Nazca, las concentraciones de melatonina disminuyen durante la luna llena, lo que indica que los niveles de luz natural durante la noche pueden omitir la secreción de melatonina (Bennie et al., 2014).

En base a la información limitada sobre el efecto del ciclo lunar sobre la reproducción en cobayas, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del ciclo lunar en algunas características morfológicas y funcionales del ovario en cobayas.

Objetivos**Objetivo general**

Evaluar el efecto del ciclo lunar en algunas características morfológicas y funcionales del ovario en cobayas.

Objetivos específicos

- Cuantificar el contenido de progesterona y estradiol en suero en cuatro momentos del ciclo lunar.
- Determinar el efecto del ciclo lunar sobre el peso del ovario y número de folículos antrales y no antrales.
- Evaluar si el ciclo lunar afecta la expresión génica de los receptores de melatonina, IGF-I y LH en el ovario.

Marco teórico**1. El cobayo****1.1. Características filogenéticas**

El cuy (cobayo o curí) es un mamífero roedor originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. La división taxonómica para los conejillos de indias domesticados es la siguiente:

Tabla 1. División taxonómica del cobayo

Reino:	Animal
Filo:	Cordados
Clase:	Mamíferos
Orden:	Rodentia
Suborden:	Hystricomorpha
Familia:	Caviidae
Subfamilia:	Caviinae
Género:	Cavia
Especie:	<i>Cavia porcellus</i>

Fuente: Adaptado de Wagner (1976).

1.2 Importancia del cobayo en la investigación científica y en la producción animal

El cobayo es un excelente biomodelo animal que permite el estudio de la reproducción tanto en humanos como en la mayor parte de animales domésticos debido a que cuenta con un completo ciclo estral, característica que los diferencia de otros roedores (Suzuki et al., 2002).

Su docilidad, disponibilidad, junto con la facilidad de mantenimiento y la base de datos de investigación existente acerca de los parámetros fisiológicos han aportado al uso del cobayo de forma generalizada en la investigación (Pritt, 2012).

Diversas investigaciones han empleado a los conejillos de indias, ejemplo del aporte de estos animalitos a la ciencia se evidencia en el desarrollo del antisuero contra

la difteria en 1901, el descubrimiento del antibiótico estreptomicina en 1952 y el descubrimiento del mecanismo involucrado en la estimulación de la cóclea en 1961, entre otros (Pritt, 2012).

A lo largo de la historia, los cobayos se han empleado en diferentes niveles de investigación, como, por ejemplo: audición, alergias, enfermedades infecciosas, genética, nutrición e inmunología (Pritt, 2012). El cobayo es un organismo modelo especial para las pruebas de vacuna y toxicología debido a que sus genes inmunológicos son más similares a los de los humanos en comparación con los genes del ratón (Guo et al., 2012).

El cuiy constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos. Los pueblos preincas mantenían una relación amplia con los cobayos debido a su alto valor proteico y bajo nivel de grasa, también se asociaba a un valor cultural-espiritual que se mantiene hasta la actualidad (Avilés et al., 2014). Además del uso como mascota, es un animal de exhibición y cumple un papel importante al ingreso familiar de algunos países de Latinoamérica (Landi et al., 2014).

2. Anatomía del aparato reproductor de la cobaya

El aparato reproductor de la hembra (cobaya) desde la parte externa a interna está conformado por: vulva, orificio vaginal, vagina, útero, cuernos uterinos, oviductos y un par de ovarios (Quesenberry, 1994). El ligamento ancho sostiene a las estructuras internas fijándolas a la cavidad abdominal y también al borde anterior de la cavidad pélvica en la cobaya (Hargaden & Singer, 2012).

2.1. Vulva

Esta estructura externa está ubicada cerca del ano, tiene la forma de una Y, ventralmente existen dos labios pequeños que forman el orificio vaginal y dorsalmente se encuentra el clítoris. La vulva tiene un diámetro que puede llegar medir aproximadamente hasta 25 mm (Obregón, 2009).

2.2. Orificio vaginal y vagina

La vagina es un conducto muscular fibroelástico que mide entre 30 y 40 mm de largo. Está ubicado en la cavidad pélvica y ventral a este, se encuentra la vejiga. La vagina es el sitio de depósito de semen del reproductor durante el apareamiento,

además cumple con la función de permitir el paso de las crías durante el parto (Borodina, 2023). El orificio vaginal de la cobaya a diferencia de otros roedores se encuentra cubierto por una membrana epitelial, esta membrana se rompe durante el parto y en la fase del estro, sin embargo, se caracteriza por reconstituirse después de estas etapas (Solís & Chávez, 2015).

2.3. Útero y cuernos uterinos

La cobaya tiene un útero bicorneo cuya función es la retención fetal, alimentación del embrión y posteriormente del feto, durante la etapa de preñez, igualmente previene la contaminación microbiana del útero (Graham et al., 2001). El cuerpo del útero tiene una forma aplanada y corta. Los cuernos uterinos tienen la forma de “V” con una longitud de 37 mm y sus paredes internamente se encuentran cubiertas por una mucosidad denominada endometrio, esta mucosa tiene como función producir sustancias nutritivas mismas que alimentarán al cigoto hasta que se convierta en feto (Fernández et al., 2018).

2.4. Oviductos

Denominados también trompas de Falopio o uterinas, son tubos delgados y flexibles que se comunican con el útero, miden aproximadamente 57 mm de longitud y 1,5 mm de diámetro. El oviducto se divide en tres partes: infundíbulo, ampolla e istmo (Bermeo & Guamán, 2022). Los oviductos cumplen funciones fundamentales como: transporte de los gametos (óvulos y espermatozoides), es el sitio de fertilización, permite la capacitación de los espermatozoides, el transporte del embrión hacia el útero para su posterior implantación y desarrollo del feto (Trujillo, 1996).

2.5. Ovarios

Los ovarios son los órganos principales en la reproducción de las cobayas, anatómicamente están situados en la cavidad abdominal. El ovario derecho se encuentra ubicado caudal y lateral al riñón derecho, mientras que, el izquierdo está craneal y lateral al riñón izquierdo. Los ovarios pesan entre 50 y 150 mg. Sin embargo, el tamaño de estos órganos depende de la edad y la etapa reproductiva del animal (Hargaden & Singer, 2012). Los ovarios son pequeños, semejantes a un frijol, de forma ovoide y de color blanco amarillento. Cada ovario está irrigado por vasos sanguíneos que proceden de la arteria ovárica y la arteria uterina, y contiene vasos linfáticos, nervios parasimpáticos y simpáticos (Figura 1). Los ovarios en las cobayas se caracterizan por

tener una actividad funcional que comienza en la pubertad y persiste durante todos los ciclos reproductivos. Los ovarios cumplen con dos funciones primordiales, una función exocrina que es la producción de gametos femeninos (ovocitos) y la endocrina, síntesis de hormonas como: estrógenos, progesterona, relaxina, oxitocina e inhibina (Dos Santos et al., 2016).

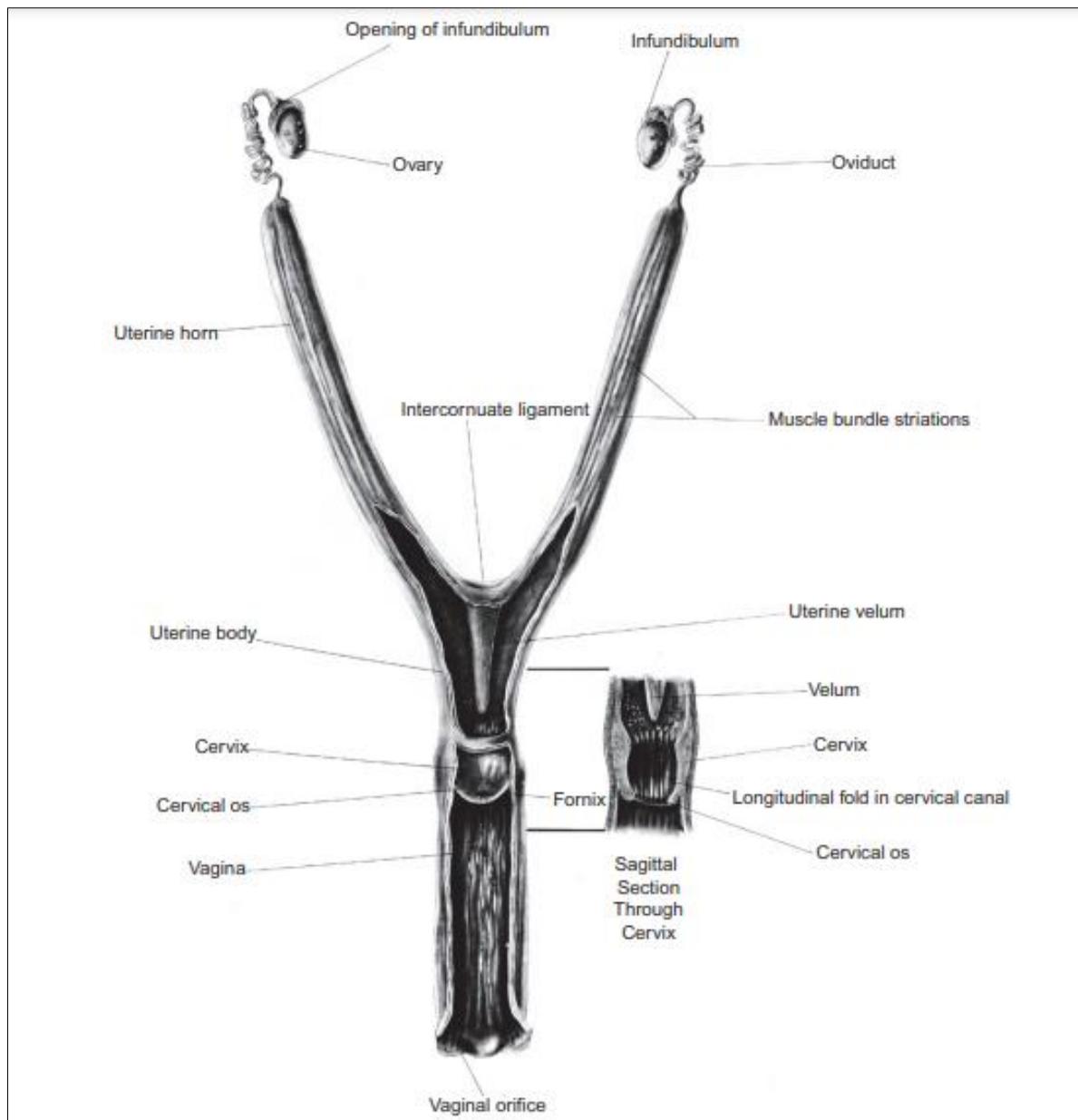


Figura 1. Aparato reproductor de la cobaya. Fuente: Adaptado de Hargaden & Singer (2012).

3. Fisiología reproductiva de la cobaya

3.1. Ciclo estral

El ciclo estral presenta una fase folicular y una fase lútea. La primera fase es el período de rápido desarrollo folicular que comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y termina con el estro y la ovulación de uno o más folículos. La fase lútea se extiende desde la formación de los cuerpos lúteos después de la ovulación hasta su regresión al final del ciclo (Nowak, 2018).

El ciclo estral tiene una duración media de 16 días, pero puede variar de 13 a 21 días. El ciclo estral está conformado por 4 fases, durante las cuales acontece una serie de cambios a nivel de las estructuras ováricas y en la concentración hormonal de la cobaya (Hargaden & Singer, 2012).

El proestro comprende de 1 a 1,5 días, y presenta signos de rotura a nivel de la membrana de cierre vaginal e hinchazón de la vulva. La hembra tiende a balancear sus cuartos traseros y emitir sonidos guturales característicos. Además, existe un aumento de actividad y persecución a sus compañeros de jaula (Sisk, 1976). Durante esta etapa los folículos crecen y maduran hasta convertirse en folículos de Graaf (Herington et al., 2018).

El estro tiene una duración de 6 a 11 horas (Quesenberry et al., 2012) y ocurre de manera constante en el transcurso de la noche (Hargaden & Singer, 2012). Durante esta fase se presenta la vagina hinchada, secreción de moco, congestión y muestran reflejo copulador o lordosis. En cobayas adultas, la membrana vaginal se presenta abierta por 2 días aproximadamente durante el estro y se cierra luego de la ovulación (Quesenberry et al., 2012). La ovulación ocurre de manera espontánea y aproximadamente a las 10 horas finales del estro. En el frotis vaginal se observa células epiteliales cornificadas (Hargaden & Singer, 2012). Se reconoce por la presencia de cuerpo lúteo recién formado y la ausencia de folículos de Graaf (Herington et al., 2018).

La duración del metaestro es de 3 días aproximadamente y comprende 3 etapas: la inicial se caracteriza por secreciones espesas de la vagina y congestión de los vasos del útero y de la vagina, la siguiente etapa está caracterizada por fluido vaginal seroso y un aumento de la congestión a nivel de los vasos, y la última, por presencia de descamaciones a nivel del epitelio uterino y vaginal lo que provoca leve secreción de sangre (Hargaden & Singer, 2012). En esta fase las células lúteas comienzan a producir

progesterona. La actividad funcional del cuerpo lúteo comienza al final del metaestro y continúa hasta el final del diestro (Herington et al., 2018).

El diestro se distingue porque no existe congestión de los vasos, ni secreción a nivel de la vagina y tiene una duración de 11 a 12 días (Hargaden & Singer, 2012). El cuerpo lúteo está en completa funcionalidad debido a que secreta grandes cantidades de progesterona. Si no existe la fertilización, el cuerpo lúteo sufrirá una regresión (luteólisis) y la hembra entrará en proestro para comenzar con un nuevo ciclo. La luteólisis se produce debido al aumento de las cantidades de prostaglandina F2α provenientes de las células epiteliales del útero, y esto a su vez se produce en respuesta a la oxitocina (Nowak, 2018).

3.2. Estructuras funcionales ováricas y hormonas gonadales en la cobaya

Los ovarios de las cobayas cumplen con un rol importante en la reproducción, puesto que, además de producir ovocitos, tienen la función de secretar dos hormonas sexuales fundamentales que son los estrógenos y la progesterona (Solorzano & Sarria, 2014).

El proceso gonadal surge en base a su control genético, es decir en primera instancia debe haber una diferenciación sexual, en el caso de los ovarios para su formación, requieren la migración de las células germinales primordiales provenientes desde el saco vitelino hasta llegar a la cresta genital (Portelli, 2013).

Durante la fase del estro del ciclo estral de las cobayas, se secretan principalmente los estrógenos (E2) por las células de la granulosa. Esta hormona favorece el crecimiento y desarrollo de los caracteres sexuales femeninos, los estrógenos son los responsables del comportamiento del celo en la cobaya. La progesterona es secretada por las células luteínicas presentes durante las fases del metaestro y diestro del ciclo estral, esta hormona también es secretada por la placenta. La progesterona estimula el desarrollo de las glándulas uterinas, influye a nivel del endometrio para que sea receptivo al cigoto para su implantación y ayuda a mantener la preñez. Estas dos hormonas tienen en común la función de estimular el desarrollo de la glándula mamaria (Eurell, 2004).

El crecimiento y maduración de los folículos y la liberación de los estrógenos (E2) están bajo el control de las hormonas gonadotróficas pituitarias, que son: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Los ovarios al secretar los estrógenos, provoca un pico de LH durante el día del celo induciendo así al

proceso de ovulación. De igual manera, con el incremento de la LH, empieza la formación del cuerpo lúteo (CL), que ocurre cuando los receptores de las células de la pared folicular se rompen e inicia la etapa de luteinización y secreción de progesterona (P4). En el caso de una preñez, el CL persiste como el cuerpo lúteo de gestación y por ende la secreción de esta hormona. En los últimos estadios de preñez, la progesterona además de ser secretada por el cuerpo lúteo también es liberada por la placenta para mantener la preñez hasta el momento del parto. Caso contrario, al no existir una preñez, ocurrirá regresión del cuerpo lúteo que es provocado por el factor luteolítico, la hormona prostaglandina F2α secretada por la células del endometrio uterino (Pino, 2015).

4. Mecanismo endócrino que regula la ciclicidad reproductiva de la cobaya

El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal es el encargado de controlar los cambios morfológicos y hormonales de estos roedores al igual que en otros mamíferos (Caligioni, 2009). A nivel del hipotálamo se encuentra la hormona liberadora de gonadotropina o GnRH, que se libera y llega a la adenohipófisis, lugar en el cual las células gonadotropas son estimuladas con la finalidad de secretar dos hormonas: la FSH y LH. Estas hormonas cumplen diferentes funciones como la estimulación del ovario, promueven el crecimiento de los folículos, la formación del cuerpo lúteo y la ovulación (Levine, 2015).

5. Rol de la melatonina (MLT) en la regulación reproductiva de los mamíferos

La melatonina también denominada N-acetil-5-metoxitriptamina es una hormona endócrina anfifílica presente en los animales, plantas y en el ser humano. Esta hormona se aisló por primera vez de la glándula pineal bovina (Lerner, 1958). La melatonina es un derivado del triptófano que luego se convierte en serotonina por acción de la N-acetiltransferasa, para luego convertirse en N-acetilserotonina y por acción de la hidroxiindol-o-metiltransferasa es convertida a melatonina la cual es secretada por la glándula pineal, que posteriormente es liberada al torrente sanguíneo de los animales. Estudios realizados informan que esta hormona también se encuentra a nivel de la retina, a nivel del sistema digestivo de los vertebrados y a nivel de los ovarios (Hasan et al., 2014).

Las hembras mamíferas se categorizan en poliéstricas estacionales como la yegua, cabra y oveja, mismas que son influenciadas por el fotoperíodo y por mecanismos fisiológicos en los que participa la melatonina. Mientras que la cobaya y otras especies, como la bovina, son poliéstricas continuas (Áldas, 2008).

La funcionalidad de la melatonina en la reproducción inicia con la captación de la luz a través de la retina, que se transmite mediante una señal neural a través del núcleo supraquiasmático, el núcleo paraventricular y el ganglio cervical superior hasta llegar a la glándula pineal. Luego, la glándula pineal transduce esa señal neural a una endocrina mediada por la melatonina (Figura 2). Esta hormona actúa como un neurotransmisor que al desbloquear el eje hipotálamo-hipófisis-ovario provoca la liberación de las hormonas FSH y LH, estas hormonas regulan el crecimiento y desarrollo folicular, la formación del cuerpo lúteo y la ovulación (Goodman & Inskeep, 2015).

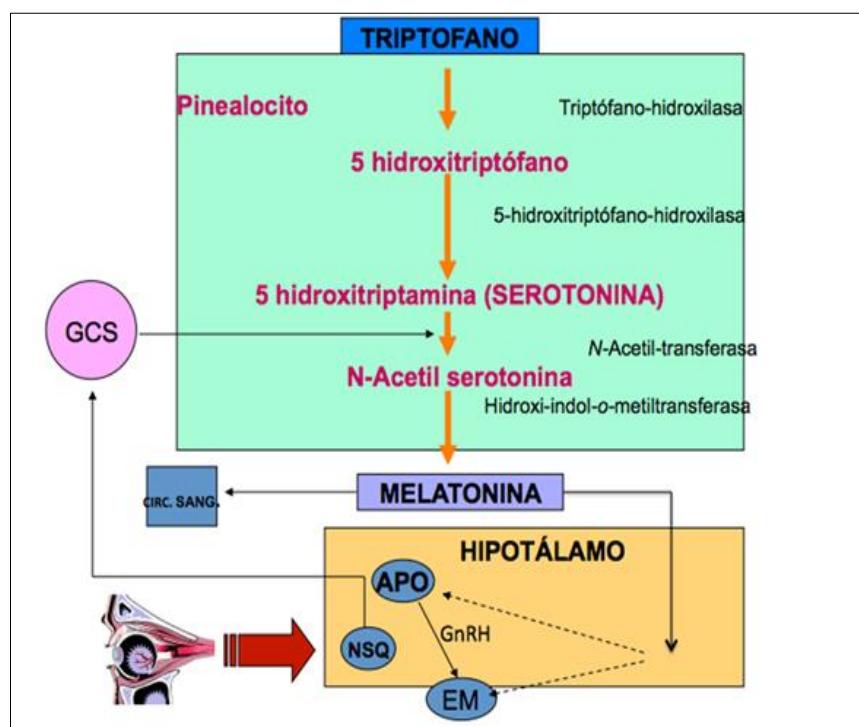


Figura 2. Síntesis de melatonina en los animales. Fuente: Adaptado de Goldman (2001).

En los animales con reproducción poliéstrica estacional (cabra, oveja, yegua y gata), las concentraciones plasmáticas de melatonina llegan a su pico más alto ante la presencia de menos luminosidad, es decir, en los días cortos y durante la noche (Abecia et al., 2012).

En base a estudios realizados, hasta ahora se han descrito 2 tipos de receptores de melatonina de membrana acoplados a proteínas G, MT1 y MT2 (Nosjean et al., 2000). También se ha logrado identificar un tercer tipo de receptor de melatonina el MT3, que corresponde a la quinona reductasa 2 (Barrett et al., 2003). El receptor de

melatonina MT1 se encuentra en la *pars tuberalis* de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y el receptor MT2 se encuentra principalmente en la retina (Revel et al., 2009).

En base a estudios realizados se ha demostrado que la melatonina interviene en la contractilidad uterina en roedores (Moujir et al., 1990). El receptor MT1 se ha descrito en el miometrio de rata. Revel y colaboradores (2009) mencionan que la contractilidad uterina disminuyó de manera espontánea e inducida mediante oxitocina.

La melatonina a través de sus receptores regula la actividad reproductiva de numerosas especies de animales; entre ellas, está involucrada en la gametogénesis, la calidad de los gametos, los ritmos reproductivos, función endocrina y desarrollo embrionario (Guo et al., 2012).

La melatonina tiene la función endocrina de otros ritmos dependientemente de la luz, es decir, patrones circadianos en distintas especies de vertebrados. Ciertos autores manifiestan que, esta hormona es un elemento esencial de los mecanismos biológicos relacionados con la luna, puesto que, la melatonina es sensible a la luz, y se sintetiza en la oscuridad (Andreatta & Tessmar, 2020).

6. Características histológicas del ovario

Felipe & Masson, (2005) reportaron que histológicamente el ovario en roedores histicomorfos se encuentra recubierto por un epitelio de revestimiento con una capa simple conformada por células planas o cúbicas que tienen citoplasma acidófilo y núcleos ovales o redondos. La médula se forma de tejido conectivo, fibras que se dirigen en distintas direcciones y fibras elásticas. La corteza se conforma de fibras conectivas dispuestas de manera perpendicular hacia la superficie.

Al-Saffar & Al-Ebbadi (2019), encontraron que microscópicamente, las cobayas adultas presentan ovarios cubiertos por epitelio cuboide simple formando el epitelio germinal, este epitelio no se encuentra a nivel del hilio del ovario, donde los vasos sanguíneos ingresan o salen del órgano. La túnica albugínea representada por una capa de fibras irregulares y densas de tejido conectivo colágeno se localiza por debajo del epitelio germinal.

La corteza muestra varios tipos foliculares que se encuentran distribuidos entre la túnica albugínea y el interior del órgano, con muchos tabiques finos de tejido conectivo interfolicular (Figura 3). El estroma de tejido conectivo colágeno denso e irregular forma la parte interna de la médula y se encuentra lleno de vasos sanguíneos. Estos vasos

sanguíneos recorren a través del hilio hasta la médula, donde intervienen muchas ramas con tejido conectivo que corre entre los folículos. Alrededor de los folículos grandes existe un rico suministro de sangre (Al-Saffar & Al-Ebbadi, 2019).

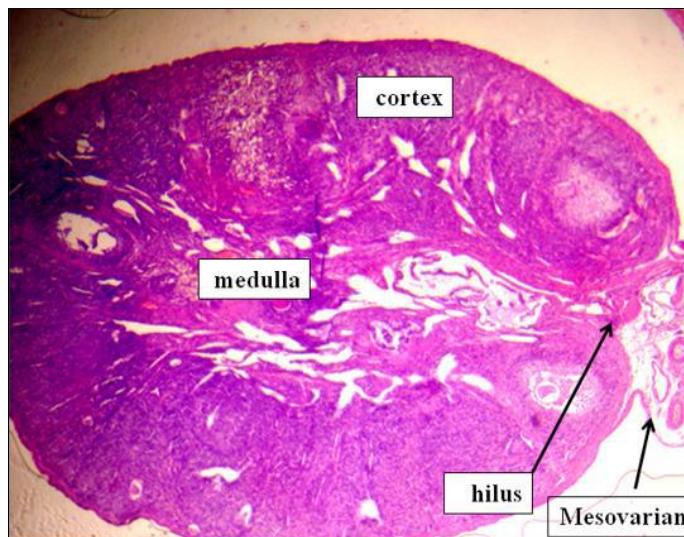


Figura 3. Corteza y médula, hilio y mesovario del ovario. Fuente: Adaptado de Al-Saffar & Al-Ebbadi (2019).

7. Determinación del ciclo estral mediante citología vaginal

La citología vaginal es una técnica que permite determinar las diferentes fases del ciclo estral. Según Lilley et al. (1997), en el examen citológico vaginal encontraron en el estro predominancia de células escamosas superficiales no nucleadas. En el metaestro observaron una mezcla de: células escamosas superficiales no nucleadas (nn), células escamosas superficiales nucleadas (n) y células parabasales; esta fase se caracterizó por presentar una cantidad elevada de neutrófilos polimorfonucleares. En el diestro se identificaron principalmente células parabasales y neutrófilos polimorfonucleares y finalmente, en el proestro, se encontraron sobre todo células escamosas intermedias, también observaron células escamosas superficiales no nucleadas y células escamosas superficiales nucleadas y parabasales, y disminuyó la cantidad de neutrófilos polimorfonucleares. En la tabla 2, se muestra la clasificación de la fase estral según los tipos de células con sus respectivas frecuencias, las cuales fluctúan entre 1+ (0 a 10%) y 4+ (80 a 100%).

Tabla 2. Tipos de células según la fase estral mediante citología vaginal

Fase	Tipos de células			
	Células escamosas superficiales	Células escamosas intermedias	Células parabasales	Leucocitos polimorfonucleares
Proestro	4+	1+	1+	1+
Estro	2+ a 4+ nn	1+	1+ a 2+	2+ a 4+
Metaestro	1+	1+	2+ a 3+	2+ a 3+
Diestro	1+ a 2+ nn	2+ a 3+	1+ a 2+	1+
	1+ a 2+ n			

Fuente: Adaptado de Lilley et al. (1997).

8. Foliculogénesis

Un proceso que precede a la foliculogénesis es la ovogénesis, se define como el proceso de formación de los ovocitos mediante división meiótica durante la etapa embrionaria. La cobaya posee células germinales de 23 cromosomas que al unirse con el otro gameto forman un embrión con 46 cromosomas (Ortíz et al., 2003).

La foliculogénesis es similar a la foliculogénesis humana, este proceso se refiere a la formación, desarrollo y diferenciación de los folículos ováricos, estos folículos son estructuras que a medida que avanza su estadio de desarrollo incrementa su tamaño folicular, llegando a convertirse en un solo folículo dominante del pool de folículos, que posteriormente liberará ovocitos durante la etapa de ovulación de la cobaya. Mientras que, los otros folículos sufren un proceso de atresia o también llamado degeneración de los folículos ováricos mediante apoptosis (Bookhout, 1945).

Para esta fase de foliculogénesis se requiere señales tanto intraováricas como extraováricas. Desde el inicio de esta etapa hasta la formación del antro folicular, este desarrollo es independiente de la FSH pero si requiere de hormonas gonadotropinas, proceso que según la literatura se tarda alrededor de ocho semanas en los rededores (Shomer et al., 2014).

En el caso de la cobaya, el ciclo estral es de 16 días como media, con una variación de 13 a 21 días. Esta especie posee dos ondas foliculares durante el ciclo estral siguiendo un patrón fisiológico de reclutamiento, selección y dominancia del folículo preovulatorio (Garverick & Smith, 1993).

La primera onda comienza en el día 0 del ciclo, es decir, después de la ovulación. Los folículos pueden llegar a medir hasta 2 o 3 mm pero a través de la retroalimentación

negativa que genera la progesterona se suprime la secreción de LH, lo que provoca que los folículos presentes en la primera onda sufran atresia (González & González, 2005).

La segunda onda folicular se presenta entre los días 10 y 11 del ciclo estral, donde la gran mayoría de folículos son reclutados y de estos los folículos los más grandes son seleccionados (Figura 4). Al llegar el día 12 del ciclo los niveles de progesterona (P4) caen mientras que, entre los días 13 y 15 los niveles de la hormona luteinizante (LH) se eleva dando lugar a la ovulación, esta última fase ocurre al día 16 promedio del ciclo estral en las cobayas (Logothetopoulos et al., 1995; Pazmino & Pangol, 2021).

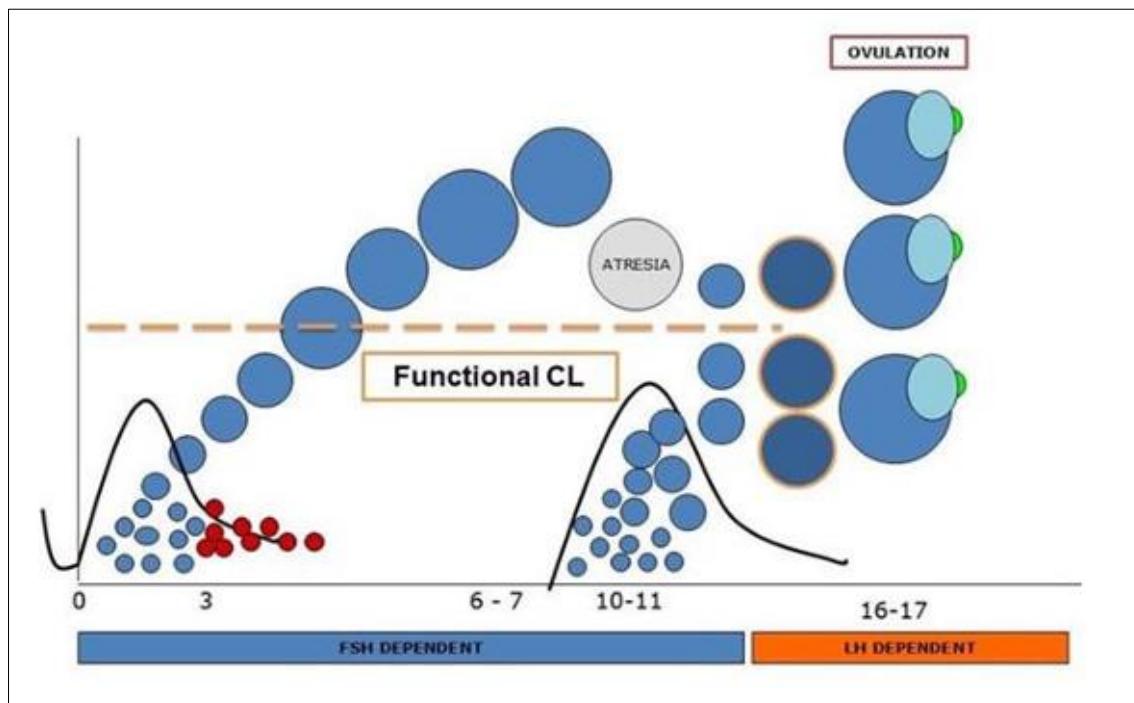


Figura 4. Ciclo estral de la cobaya. Fuente: Adaptado de Gregoire (2012).

9. Tipos de folículos

Los folículos del ovario se dividen en cuatro grupos de acuerdo a su tamaño y en función al tipo de células que se encuentran alrededor del ovocito (Bean, 2013):

Primordial: son estructuras algo ovaladas, casi siempre se observan aproximadamente circulares al corte. Están constituidos por una capa de células epiteliales planas que se encuentra rodeando al ovocito, cuyo crecimiento se encuentra detenido en la fase de diploteno de la profase I de la meiosis (Nilsson & Skinner, 2001). Cuando los folículos salen de la reserva, pasan de ser folículos primordiales a ser folículos primarios en transición (Espinoza et al., 2007).

Primario: una capa de células de la granulosa cúbica recubre al ovocito. Las gonadotropinas estimulan el desarrollo de los ovocitos primarios que se mantienen detenidos en profase I.

Secundario: sobre la membrana basal está el ovocito rodeado de varias capas de células de la granulosa de tipo estratificadas. Las células de la teca se ubican fuera de la membrana basal. Existe una cubierta de glicoproteína a nivel interno de la capa de la granulosa rodeando al ovocito denominada zona pelúcida. La hormona folículo estimulante influye en el desarrollo hacia la siguiente etapa.

Terciario: la zona pelúcida y las células de la granulosa rodean al ovocito, localizado dentro del líquido antral. En esta etapa la teca se diferencia en teca interna y externa y producen andrógenos que son transformados en estrógenos por las células de la granulosa. Se denomina folículo de Graaf al folículo terciario que está preparado para ovular (Bean, 2013). El folículo de Graf se caracteriza por el cúmulo oóforo bien desarrollado, la corona radiata y el antro completamente desarrollado (Al-Saffar & Al-Ebbadi, 2019). La hipófisis libera a la hormona luteinizante que induce a que el folículo de Graaf ovule. El ovocito es liberado y el folículo se transforma en el cuerpo lúteo. Las células lúteas que se diferencian a partir de las células de la teca interna y de la granulosa producen progesterona hasta la luteólisis o, si la cobaya está preñada, hasta el final de la gestación (Bean, 2013).

10. Cuantificación folicular

La eficiencia reproductiva en las cobayas está determinada a partir del desarrollo de los folículos, de su capacidad para producir estradiol y de ovular, lo cual está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El desarrollo de los folículos es susceptible a ser modificado por diferentes factores como: edad del animal, sistema de crianza, alimentación y/o problemas sanitarios (Sadeu et al., 2007).

Lema & Tenecela (2024), realizaron un estudio con el objetivo de evaluar “*el efecto del flushing energético administrado a cobayas primerizas sobre la población folicular, número de cuerpos lúteos y calidad ovocitaria*” para lo cual utilizaron 64 cobayas nulíparas mestizas de la línea Perú agrupadas aleatoriamente en 4 subgrupos, mismos que aplicaron 4 tratamientos con distintos niveles de energía. T0 (dieta control): 2400 kcal/kg MS; T1 (dieta experimental): 2600 kcal/kg MS; T2 (dieta experimental): 2800 kcal/kg MS y T3 (dieta experimental): 3000 kcal/kg MS.

Las cobayas fueron sometidas a un protocolo de sincronización de celo mediante la aplicación de PGF2α. Después de 11 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y extrajeron los ovarios. Estos autores no encontraron diferencias estadísticas en cuanto al número de folículos, sin embargo, las cobayas alimentadas con el T3 tuvieron mayor población folicular que los demás tratamientos (Lema & Tenecela, 2024).

Hunter y colaboradores (2004) citan que, las dietas con un alto nivel de energía, eleva los niveles plasmáticos de IGF-I, leptina e insulina. Lo que conlleva a una estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario con la síntesis de GnRH y posteriormente de LH y FSH. Al igual que, los metabolitos presentes en el líquido folicular mejoran el desarrollo y calidad de los folículos.

Respecto a los estadios de los folículos y el número de cuerpos lúteos no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos dietéticos. Sin embargo, el número total de ovocitos recuperados de categorías A y B fueron significativamente mayor en las cobayas alimentadas con 3000 kcal/kg MS a diferencia de los otros tratamientos. Estos autores concluyen que, el aumento de los niveles de energía en la dieta de las cobayas influyó en el número y calidad de ovocitos pero no en el número de folículos (Lema & Tenecela, 2024).

11. Cuantificación de hormonas gonadales

Existen algunos métodos que se pueden utilizar para la determinación de hormonas y sus metabolitos, como, por ejemplo: espectrofotométricos, cromatográficos y químicos. Las técnicas inmunoquímicas como radioinmunoanálisis (RIA), enzimoinmunoanálisis (EIA), fluoroinmunoanálisis (FIA) y quimioluminoimmunoanálisis son las más utilizadas. Estos métodos son ensayos heterogéneos competitivos que comprenden la unión del antígeno al anticuerpo con posterior separación física de la hormona unida al anticuerpo (AgAc) y la hormona no unida (Ag) (Pisarev & Calandra, 2014)

Las hormonas circulan en bajas cantidades a nivel de la sangre en rangos picomolar (10^{-12}) o nanomolar (10^{-9}), razón por la cual su cuantificación necesita ensayos sensibles, por lo general en forma de inmunoensayo competitivo. El método de radioinmunoanálisis (RIA, por sus siglas en inglés) está basado en una reacción antígeno-anticuerpo, en la cual están presentes paralelamente dos formas del antígeno, la hormona fría y la hormona marcada con un radioisótopo (Pisarev & Calandra, 2014).

En el radioinmunoensayo existe una competencia por los sitios de unión de anticuerpos entre la hormona marcada y la hormona no marcada (Kemppainen, 2023).

Para la medición de hormonas, se han desarrollado etiquetas no radiactivas (por ejemplo quimioluminiscencia), ensayos de tipo sándwich y métodos ELISA (Kemppainen, 2023). La quimioluminiscencia es la transformación de energía química en emisión de luz visible que es la luminiscencia como consecuencia de una reacción de oxidación o hidrólisis. Esta metodología brinda una alternativa de identificación sensible y rentable a técnicas radioisotópicas y de fluorescencia (Farrell, 2010).

El enzimoinmunoanálisis utiliza enzimas como marcadores inmunoquímicos para valorar las uniones antígeno-anticuerpo producidas después de un periodo de incubación, con la incorporación siguiente de un sustrato (Pisarev & Calandra, 2014).

Shi et al. (2000), determinaron las concentraciones plasmáticas de entre otras hormonas al estradiol y progesterona mediante el método RIA de doble anticuerpo durante el ciclo estral en cobayas. Encontraron que las concentraciones de estradiol eran altas en la ovulación, luego de la ovulación, el nivel de estradiol disminuyó y en el día 4, mostró los niveles más bajos. En relación a la concentración de progesterona, está se evidenció baja los días 16 y 0, y alta los días 4, 8 y 12.

12. Determinación de genes

La importancia del estudio de la determinación de genes radica en que este proceso ayuda a identificar genes que contribuyen con el mejoramiento de la actividad reproductiva, desempeño productivo, eficiencia de los programas de mejora genética y la conservación de especies. Para identificar y cuantificar los genes se puede analizar el ADN en cualquier muestra de tejido a través de distintos métodos y tecnologías moleculares como los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación directa e hibridación (Llambí et al., 2018).

Los receptores son de dos tipos: receptores intracelulares, como su nombre lo indica, se encuentran dentro de la célula específicamente en el citoplasma o en el núcleo y los receptores de la superficie celular, localizados en la membrana plasmática. Los receptores intracelulares actúan como factores de transcripción interactuando con elementos de respuesta en el DNA de sus genes diana. Estos receptores involucran a los receptores de hormonas esteroideas, hormonas tiroideas y ciertos metabolitos (Aranda, 2010).

El receptor de LH se encuentra en diferentes tipos celulares como la piel, cerebro, músculo liso y en los tejidos reproductivos de diversas especies de mamíferos, como las células tecales, células de la granulosa y células luteales (Sower et al., 2002).

La reproducción en las cobayas está determinada por la expresión de receptores de la LH y FSH principalmente en las células de la teca interna y granulosa. Los folículos dominantes poseen estos receptores para poder ovular, a diferencia de los folículos antrales pequeños cuyas células de la granulosa no poseen los receptores de LH (Terranova & Greenwald, 1981).

13. El ciclo lunar y su efecto en aspectos biológicos de los animales

13.1. Efectos que produce el ciclo lunar en la tierra

La luna, el satélite natural de la tierra, demora 29 días 12 h 44 min y 3 seg (29,52 días) en completar un giro alrededor de la tierra. Durante este movimiento, y de acuerdo a su posición relativa con respecto al sol, la luna varía el porcentaje de luz que refleja desde el sol. Además de ello, ejerce influencia sobre el campo gravitacional y electromagnético de la tierra (Chakraborty, 2014).

La luna y la tierra se atraen mutuamente por lo que se crean mareas. La luna atrae cualquier cosa de la tierra y la tierra retiene todo excepto el agua debido a que esta se encuentra en constante movimiento. La atracción gravitacional de la luna sobre la tierra cambia durante las distintas fases del ciclo lunar y la amplitud de las mareas de los océanos también varía dependiendo de la posición relativa de la luna en su órbita (Chakraborty, 2014).

13.2. Breve descripción de las bases biológicas de este fenómeno en peces

Estudios publicados indican que, tanto los ritmos estacionales, circadianos y lunares influyen en la fisiología humana y animal. Las distintas fases del ciclo lunar inciden en la reproducción de los peces a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Mercier et al., 2011).

Un ejemplo de la influencia lunar en los peces es el caso del pez conejo dorado (*Siganus guttatus*), que es una especie considerada desovador sincronizado con la fase de cuarto creciente. Los cambios periódicos en la luz de la luna es un indicativo del desarrollo gonadal y la liberación de gametos. Otro elemento importante que influye es

la melatonina, una hormona endógena del ciclo ambiental de luz/oscuridad, esta hormona incrementa su secreción en la glándula pineal y en el torrente sanguíneo durante el período de la luna nueva y sus niveles decrecen en el período de luna llena (Zimecki, 2006).

En el caso de los peces salmonídos existe evidencia que durante la fase de luna nueva los niveles de tiroxina incrementan, con el objetivo de prepararse para la migración hacia el mar y este tipo de fenómeno se relaciona más con la luz de la luna que por los efectos del campo gravitacional de la tierra (Takemura et al., 2010). En el caso de los peces machos, los estudios realizados también evidencian que el comportamiento reproductivo está bajo la influencia de la intensidad de la luz lunar (Ikegami, Takeuchi, Hur, et al., 2014).

Mercier y colaboradores (2011) informan que, el ciclo lunar afecta el proceso de desove de ciertas especies de peces que habitan en aguas profundas. La liberación de larvas en criadoras mostró incrementos significativos durante las fases de luna nueva y llena respectivamente. La información actual sugiere que los indicadores de las fases del ciclo lunar en aguas profundas pueden estar relacionados con las corrientes cíclicas, flujos en la deposición de partículas y luz de la luna para las especies que viven en la zona disfótica.

13.3. Evidencias científicas del efecto del ciclo lunar en mamíferos

Durante muchos años se han realizado investigaciones sobre la influencia de las fases de la luna sobre algunos aspectos del comportamiento reproductivo de los animales (Zimecki, 2006; Andreatta y Tessmar-Raible, 2020).

En varias especies de animales domésticos y/o de interés productivo se ha demostrado la influencia del ciclo lunar sobre diversos aspectos de la función reproductiva en bovinos: (Aguirre et al., 2021); porcinos: (Chinchilla et al., 2018); caprinos: (El-Darawany et al., 2021). Por ejemplo, las cabritas nacidas en luna llena, no solo tuvieron mayor peso corporal a las 20, 24 y 28 semanas de edad, sino también, mostraron signos de estro y alcanzaron la pubertad más temprano, que las nacidas en otros momentos del ciclo lunar (El-Darawany et al., 2021). En bovinos, en la fase menguante se obtuvo mayor proporción de ovocitos de calidad, que clivaron más, y mayor porcentaje se desarrollaron a blastocistos, que los colectados en la fase creciente (Aguirre et al., 2021). Incluso, en cobayas, se observó un efecto del ciclo lunar sobre algunos parámetros reproductivos y productivos (Perea et al., 2024). Mecanismos

biológicos que podrían explicar la variación de la reproducción por influencia del ciclo lunar

La fisiología animal está sujeta a ritmos estacionales, lunares y circadianos. Sin embargo, estos ritmos estacionales y circadianos se han descrito más ampliamente y poco se sabe sobre los efectos del ciclo lunar en la reproducción en los animales (Grollman, 1965).

Es conocido que cierta proporción de pinealocitos de algunos roedores, incluyendo al cobayo, son sensibles a los cambios en el campo electromagnético del planeta (Bevington, 2015). Estos cambios se vieron reflejados en que la actividad de la enzima serotonina-N-acetiltransferasa, el contenido de melatonina en la glándula pineal y la concentración sérica de esta hormona cambiaron en respuesta a la variación del campo magnético (Welker et al., 1983). Estos hallazgos indican claramente que las fluctuaciones del campo magnético modificaron la síntesis, el almacenamiento y la secreción de melatonina; por lo tanto, debido a que la luna durante su movimiento alrededor de la Tierra modifica los campos geomagnético y gravitacional del planeta (Bevington, 2015) y las células de la glándula pineal son capaces de percibir estos cambios (Chinchilla et al., 2018), es muy probable que el efecto que ejerce el ciclo lunar sobre la reproducción de los mamíferos esté modulado por la melatonina.

Algunos estudios han vinculado la producción y secreción de melatonina con el ciclo lunar (Martínez-Soriano et al., 2002). En peces, donde se ha estudiado con mucho detalle las bases biológicas de la variación de la reproducción por efecto del ciclo lunar, se identificó a la melatonina como responsable de modular estos cambios (Ikegami, Takeuchi, & Takemura, 2014). Previamente se sugirió que esta hormona podría ser responsable de dirigir los cambios reproductivos durante las diferentes fases del ciclo lunar en mamíferos (Aguirre et al., 2021). Sin embargo, en estas especies, hasta donde se sabe, no hay estudios publicados que vinculen el ciclo lunar con cambios morfológicos y funcionales a nivel de los ovarios.

Materiales y métodos

1. Materiales

Lista de materiales que se utilizó para la recolección, manejo y procesamiento de las muestras del estudio se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de materiales usados en el estudio

Biológicos 80 cobayas nulíparas 160 ovarios de cobaya	<ul style="list-style-type: none"> • Papel encerado • Mandil • Tubos para PCR • Termociclador • Espectrofotómetro • Fotodocumentador UV-impresora • Cámara de electroforesis • Microondas • Puntas para micropipeta de 1-10ul • Puntas para micropipeta de 2-200ul 	<ul style="list-style-type: none"> • Solución de dNTP'sm(Trifosfato de Desoxinucleótidos) (dNTP's set, Thermoscientific, Cat. No.: R0182) • Solución OneScript Hot RTase • Neclease-free H2O • Oligonucleótido TNFaRe V • Oligonucleótido TNFaFo R • Oligonucleótido MTNR1 BReV • Oligonucleótido MTNR1 BFor • Oligonucleótido MTNR1 AReV • Oligonucleótido MTNR1 AFor • Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100). • Solución Buffer TAE 1x (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA). • Solución Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol • Solución Bromuro de etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E763
Físicos <ul style="list-style-type: none">• Gavetas• Equipo de anestesia• Equipo para sacrificio• Guantes de examinación• Mascarilla• Equipo veterinario• Hisopos de algodón• Portaobjetos• Hojas de bisturí #20• Tubos vacutainer de tapa roja• Tubos eppendorf• Gradilla• Balanza analítica• Esfero• Cámara digital• Microscopio• Caja modificada para el proceso anestésico• Papel absorbente	Químicos <ul style="list-style-type: none">• Anestésico inhalatorio (sevoflurano)• Agua destilada• Tinción Wright• Solución buffer Wright• Metanol• Formol al 10%• Reactivo TRI Reagent Solution• Agua grado Biología Molecular.• Enzima Taq ADN polimerasa• Solucion 5x RT Buffer.	

2. Metodología

2.1. Ubicación del estudio

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca perteneciente al cantón Cuenca, provincia del Azuay. La recolección de los ovarios se realizó en el Laboratorio Clínico y la determinación de expresión de genes en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. La determinación de hormonas se desarrolló en el laboratorio clínico comercial “JJPAZ” y el procesamiento

citológico e histológico se efectuó en el laboratorio comercial “Centro de diagnóstico veterinario VetPath”. La evaluación de los cortes histológicos se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

2.2. Animales, manejo y dieta

Se emplearon 80 cobayas entre 3 y 3,5 meses de edad, cíclicas, nulíparas y genéticamente mejoradas, con un peso promedio de $1061,2 \pm 90$ gramos (g) (rango: 1009,9 – 1120,9 g). Los animales fueron proporcionados por la granja “Imperio del cuy” situada en la parroquia Bulán, Paute. En la granja estos animales se alojaron en pozas con una relación de 10 animales por metro cuadrado, fueron alimentados con una mezcla forrajera que constó de un 70% leguminosa: alfalfa (*Medicago sativa*) y 30% de gramíneas: pasto raigrás (*Lolium perenne*), pasto azul (*Dactylis glomerata*), maralfalfa (*Pennisetum sp*), y alimento balanceado (afrechillo con un 16% de proteína) en una relación 85% de mezcla forrajera y 15% de balanceado. La dieta se administró a los animales por la mañana y por la tarde. Para disminuir la variabilidad debido a las diferentes fases del ciclo estral de las cobayas al momento de la eutanasia, se utilizó el efecto macho. Para ello, 21 días antes de la colecta de tejidos, se colocó en la poza con las cobayas, a un macho que estuvo dentro de una jaula de malla metálica sin contacto físico para evitar que cubriera a las hembras. Previamente se indicó que la presencia de un macho por 12 a 15 días sincroniza el 80% de los celos (Aliaga et al., 2009). Las cobayas fueron designadas aleatoriamente a cada fase del ciclo lunar independientemente del estadio del ciclo estral.

2.3. Grupos experimentales

En base al porcentaje de luminosidad de la luna, el ciclo lunar fue dividido en cuatro periodos que delimitaron cuatro momentos en los que se colectaron las muestras de tejido: luna nueva (LN; n=5), cuarto creciente (CC; n=5), luna llena (LN; n=5) y cuarto menguante (CM; n=5) (Figura 5). La colección de muestras se repitió por 4 ciclos lunares consecutivos. Los datos porcentuales de la luminosidad de la luna se consiguieron del Observatorio Naval US (<https://aa.usno.navy.mil/data/MoonFraction>).

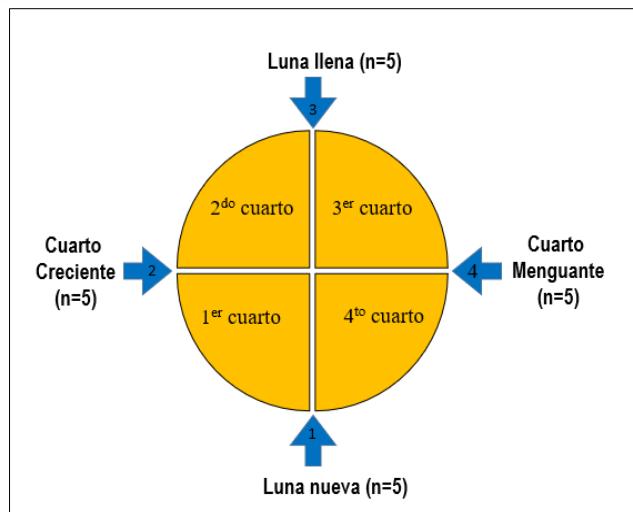


Figura 5. Momentos del ciclo lunar en los que se colectaron los ovarios de las cobayas

2.4. Manejo y eutanasia de los animales

Las cobayas fueron trasladadas a la facultad un día antes de cada día de muestreo y los cinco animales se resguardaron en una jaula de 1 m². Las cobayas fueron alimentadas con pasto, alimento balanceado y agua *ad libitum*. Estuvieron en ayunas por 12 horas antes del sacrificio, pero disponían de agua a voluntad.

El sacrificio de las cobayas y toma de muestras se realizó entre las 21H00 y 23H00 de cada día del ciclo lunar estudiado. Los animales se identificaron con un número en la oreja, y se les colocó un antifaz para proteger de la luz y se procedió al pesaje de los mismos.

Posteriormente se colocó a las cobayas en una cámara acrílica modificada (30 cm de alto, 46 cm de largo x 36 cm de ancho) para anestesia inhalatoria durante 7 minutos con sevoflurano al 8% y con oxígeno a 2 l/min. Cuando alcanzaron un plano anestésico óptimo, se continuó administrando sevoflurano al 3% a través de una mascarilla con un circuito sin reinhalación (Figura 6).

Para la cuantificación de las hormonas esteroideas gonadales se colectaron muestras de sangre en tubos al vacío sin anticoagulante mediante punción cardiaca (agujas de 21G x 1,5" acoplada a una jeringa de 5 ml) a 3 cm desde la articulación proximal del radio hasta el centro del tercer espacio intercostal a un ángulo de 30°. Estas muestras se dejaron en reposo de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente y luego fueron centrifugadas (Dynac, Estados Unidos) a 3000 x g, durante 15 minutos para la

obtención de suero. Luego se realizó la dislocación cervical (Figura 7) con un dispositivo diseñado para tal fin (Walsh et al., 2017).



Figura 6. Aplicación de anestesia inhalatoria a las cobayas



Figura 7. Dislocador cervical usado en el estudio

2.5. Recolección, manejo y análisis de las muestras

2.5.1. Citología vaginal

Luego de la eutanasia se tomó una citología vaginal para determinar el estadio del ciclo estral. Para este procedimiento se realizaron frotis vaginales a nivel del tercio proximal del epitelio aproximadamente a 2 cm de la vagina con hisopos estériles humedecidos con agua destilada (Figura 8). Posteriormente, los hisopos con las muestras se giraron sobre un portaobjetos que se secaron al aire libre y se fijaron en

metanol. Luego se continuó con la tinción Wright seguido de la solución buffer y finalmente el lavado con agua destilada. La lectura de las 80 citologías fue realizada en un laboratorio comercial “Centro de diagnóstico veterinario VetPath”.



Figura 8. Toma de citología vaginal en cobaya

2.5.2. Procesamiento histológico

Para colectar los ovarios, luego de la eutanasia, las cobayas se colocaron en posición decúbito dorsal, se realizó una incisión longitudinal en la línea alba, se localizaron los cuernos uterinos y se procedió a extraer los ovarios (Figura 9). Inmediatamente se realizó el pesaje individual de los ovarios en una balanza analítica (FLB Forelibra; China; 0,0001-100 gramos) y se procesaron como se describe a continuación.

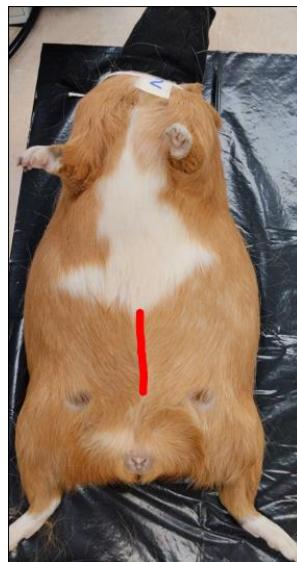


Figura 9. Incisión en la línea alba para la extracción de los ovarios

Un ovario fue seleccionado al azar para para la determinación de genes, y el otro para el procesamiento histológico. Luego, los ovarios derecho e izquierdo se fueron alternando para cada tipo de estudio. El ovario seleccionado para histología fue sumergido en formol al 10% (Figura 10) por no más de 24 horas y su procesamiento histológico se llevó cabo en el laboratorio comercial “Centro de diagnóstico veterinario VetPath”. El ovario destinado para la determinación de expresión de genes se colocó en tubos cónicos de 1,5 ml con 1 ml del reactivo TRI Reagent Solution (Figura 11), se congelaron a -80 °C hasta el momento del procesamiento para la expresión de genes.

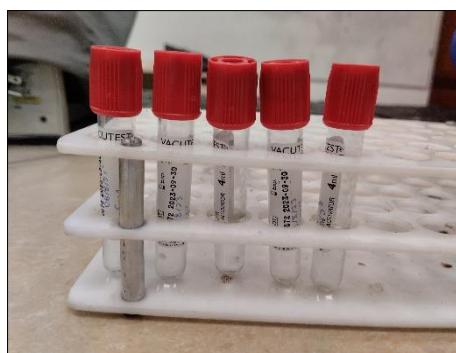


Figura 10. Tubos con formol al 10% para la toma de muestra de ovario



Figura 11. Tubo eppendorf con el reactivo TRI Reagent Solution y la muestra de ovario

De cada ovario, se hicieron dos series de cortes (3 en cada caso) separadas por aproximadamente 250 µm. Los cortes histológicos fueron evaluados, por duplicado, en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca ubicado en la granja de Irquis, mediante un micro estereoscopio. Se cuantificaron las siguientes categorías foliculares: los folículos primordiales se identificaron como

estructuras que tenían una capa de células de la granulosa aplanadas que rodeaban al ovocito, para los folículos primarios se tomó en cuenta a las estructuras con una capa de células de la granulosa cuboideas, los folículos secundarios tenían dos o más capas de células de la granulosa cuboides y para los folículos antrales se estableció aquellas estructuras que tenían una cavidad antral (Hernandez-Fonseca et al., 2005). Para su identificación y categorización se utilizaron objetivos de 10, 20 y 40X, dependiendo de la categoría. Asimismo, se cuantificó el número de cuerpos lúteos de cada ovario.

Los folículos antrales se clasificaron en tres categorías: antrales pequeños, medianos y grandes. El criterio para su clasificación fue subjetivo y se basó en la relación entre el tamaño de ovocito y de la cavidad antral. Antrales pequeños: espacio antral equivalente a ≤ 10 ovocitos; antrales medianos: espacio antral equivalente a $> 10 \leq 80$ ovocitos; antrales grandes: espacio antral equivalente a > 80 ovocitos. El recuento de folículos en este estudio corresponde al número promedio por ovario. También se cuantificaron los cuerpos lúteos en cada ovario.

2.6. Cuantificación de esteroides gonadales

Para la cuantificación de progesterona (P4) y estradiol (E2), el suero obtenido se envió al laboratorio comercial “JJPAZ” para su respectivo análisis mediante el método de electroquimioluminiscencia (Cobas E 410, La Roche, Suiza) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

2.7. Expresión génica de los receptores de melatonina, IGF-I y LH en el ovario

2.7.1. Extracción del ARN

Las muestras de ovario destinadas para la determinación de expresión de genes fueron descongeladas, identificadas y clasificadas. Mediante un agitador se homogenizaron las muestras y se agregó 100 μ l de 1-bromo-3-chloropropane para el aislamiento del ARN; posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos y la parte incolora-acuosa que contenía el ARN de cada muestra se colocó en tubos eppendorf, a los cuales se les agregó 0,5 ml de isopropanol. La mezcla se centrifugó por 10 minutos para precipitar el ARN y se eliminó la parte líquida. Después, se lavó con 0,5 ml de etanol al 70%, con la finalidad de arrastrar sales residuales, seguido a esto,

se centrifugó las muestras durante 5 minutos, se desechó el etanol sobrante y se dejó secar. Finalmente, el ARN obtenido se conservó a -80°C hasta su análisis.

2.7.2. Preparación de primers, la reacción y los NTPS (RT Premix)

Se realizó la preparación de la premezcla utilizando los siguientes componentes y volúmenes (Tabla 4), que fueron utilizados en los siguientes procesos:

Tabla 4. Componentes que se utilizaron para la premezcla.

Componente	Volumen
5X RT Buffer	280 µl
dNTP's	70 µl
R Hexaner	70 µl
Total	420 µl

2.7.3. Cuantificación relativa

Se añadió 25 µl de agua (Molecular Biology Reagent) a los tubos, se homogenizaron las muestras y posteriormente reposaron por 10 minutos. La cuantificación del material genético se realizó a través de un espectrofotómetro, se agregó 1,5 µl de cada muestra en la microplaca y se evaluó las muestras con el software Gen 5.3.3.

Las muestras no. 2, 3, 11, 15, 20 y 23 fueron seleccionadas como muestras control porque la cantidad de agua utilizada fue mayor a las otras muestras (Tabla 5), a las cuales se le determinó la temperatura ideal para la expresión génica de los receptores de melatonina, IGF-I y LH en el ovario

Tabla 5. Muestras control con sus respectivos volúmenes para PCR.

Muestra no.:	Volumen por reacción:						
	ng/ml	µg/µl	vol. para 2 µg	agua para 13 µl	RT-premix (µl)	enzima (µl)	total
2	981,12	0,98	2,0	11,0	6	1	20
3	803,16	0,80	2,5	10,5	6	1	20
11	833,64	0,83	2,4	10,6	6	1	20
15	891,12	0,89	2,2	10,8	6	1	20
20	772,76	0,77	2,6	10,4	6	1	20
23	796,08	0,80	2,5	10,5	6	1	20

2.7.4. Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Con los resultados arrojados por el software Gen 5.3.3, de las 48 muestras (Tabla 6) se formaron 16 pools en tubos para PCR, se añadió 4 µg de cada pool; 26 µl de agua (Molecular Biology Reagent), 12 µl de la premezcla (RT-premix: 8 µl de RT buffer, 2 µl de dNTP's y 2 µl de R Hexaner) y 2 µl de la enzima (Taq ADN polimerasa) completando un volumen de 40 µl para cada reacción (Tabla 6).

Tabla 6. Reacciones para PCR con sus respectivos volúmenes.

Muestra no.:	Volumen por reacción							
	ng/ml	µg/µl	Vol/1,34 µg	Vol/4 µg	H2O/26 µl	RT-premix (µl)	Enzima (µl)	Total
1	685,72	0,69	2,0	5,0	21,0	12	2	40
2	981,12	0,98	1,4					
3	803,16	0,80	1,7					
4	234,96	0,23	5,7	12,3	13,7	12	2	40
5	350,84	0,35	3,8					
6	481,6	0,48	2,8					
7	505,92	0,51	2,6	8,5	17,5	12	2	40
8	480,52	0,48	2,8					
9	444,12	0,44	3,0					
10	734,96	0,73	1,8	5,1	20,9	12	2	40
11	833,64	0,83	1,6					
12	779,88	0,78	1,7					
13	647,68	0,65	2,1	6,9	19,1	12	2	40
14	404,08	0,40	3,3					
15	891,12	0,89	1,5					
16	511,2	0,51	2,6	6,4	19,6	12	2	40
17	784,56	0,78	1,7					
18	657,68	0,66	2,0					
19	550,56	0,55	2,4	6,4	19,6	12	2	40
20	772,76	0,77	1,7					
21	593,36	0,59	2,3					
22	569,96	0,57	2,4	7,8	18,2	12	2	40
23	796,08	0,80	1,7					
24	355,72	0,36	3,8					
25	752,36	0,75	1,8	5,8	20,2	12	2	40
26	643,04	0,64	2,1					
27	688,92	0,69	1,9					
28	576,64	0,58	2,3	6,3	19,7	12	2	40
29	741,16	0,74	1,8					
30	611,68	0,61	2,2					
31	481,4	0,48	2,8	7,0	19,0	12	2	40
32	586,68	0,59	2,3					

33	680,4	0,68	2,0					
34	562,76	0,56	2,4	6,9	19,1	12	2	40
35	591,36	0,59	2,3					
36	593,76	0,59	2,3					
37	546,96	0,55	2,4	7,0	19,0	12	2	40
38	762,96	0,76	1,8					
39	475,04	0,48	2,8					
40	413,04	0,41	3,2	7,7	18,3	12	2	40
41	768,72	0,77	1,7					
42	497,76	0,50	2,7					
43	753,4	0,75	1,8	5,7	20,3	12	2	40
44	679,72	0,68	2,0					
45	694,84	0,69	1,9					
46	613,84	0,61	2,2	6,3	19,7	12	2	40
47	754,96	0,75	1,8					
48	569,56	0,57	2,4					

Fuente: instrucciones del laboratorio de Biología Molecular

Finalmente se colocó las muestras en el termociclador (Eppendorf) durante 1 hora y 20 minutos.

2.7.5. Electroforesis para determinar las temperaturas óptimas de cada receptor

Para determinar la expresión génica de los receptores, se analizó la presencia e integridad del material genético ya purificado previamente y la temperatura ideal para cada gen se realizó a través de la electroforesis en gel de agarosa. Para la preparación de este gel se utilizó 90 ml de Buffer TAE más 1,08 gr de agarosa, el cual se llevó al microondas por 30 segundos con la finalidad de disolverlo, luego se añadió 3 μ l de bromuro de etidio.

Las muestras control (no. 2, 3, 11, 15, 20 y 23) fueron colocadas en el gel de agarosa y se evaluó mediante la técnica de electroforesis con las siguientes temperaturas (Tabla 7).

Tabla 7. Curva de temperatura de alineamiento.

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T_m (°C)	51,0	51,4	52,2	53,5	55,4	57	58,4	60,6	62,5	63,8	64,6	65,0

Fuente: Instrucciones del laboratorio de Biología Molecular

Posterior a esto, se llevó las muestras al termociclador con el objetivo de evaluar las temperaturas óptimas para cada receptor de los genes, las cuales se expresan en la Tabla 8.

Tabla 8. Temperaturas óptimas para el procesamiento de los diferentes receptores genéticos para PCR.

Receptor	Temperatura	Tamaño del producto de PCR
GAPDH	52,2 °C	101 Bp
MTRIA	52,2 °C	115 Bp
MTRIB	52,2 °C	124 Bp
LHR	57,1 °C	114 Bp
IGF1	52,2 °C	144 Bp

Para determinar la existencia de material génico se utilizó al GAPDH como gen control en los productos PCR preparados y se procedió al reconocimiento de los receptores génicos citados.

2.7.6. Preparación de los productos de PCR

Para la realización del PCR, en primera instancia se preparó una mezcla de reacción como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Mezcla de reacción para PCR.

Reactivos	Concentración		Volumen	
	Inicial	Final	De premezcla	Por reacción:
Agua grado biología molecular	No aplica.	No aplica.	88,0 µl	352 µl
Buffer de amplificación 10X.	10X	1X	12,5 µl	50 µl
Solución de dNTPs.	10 nM c/u	0,2 nM c/u	2,5 µl	10 µl
Oligonucleótido	100 µM	0,8 µM	0,5 µl	2 µl
Oligonucleótido	100 µM	0,8 µM	0,5 µl	2 µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	5 U/µl	0,05 U/µl	1 µl	4 µl
Muestra de ADN total.	25 ng/µl	5 ng/µl	20 µl	8 µl
Volumen final:			125 µl	500 µl

Fuente: Instrucciones del laboratorio de Biología Molecular

Seguidamente, se colocó 21 μ l de la mezcla de reacción a las muestras y 4 μ l de cDNA en tubos para PCR, los cuales se llevaron al termociclador por 33 ciclos (Figura 12) con las respectivas temperaturas de cada receptor.

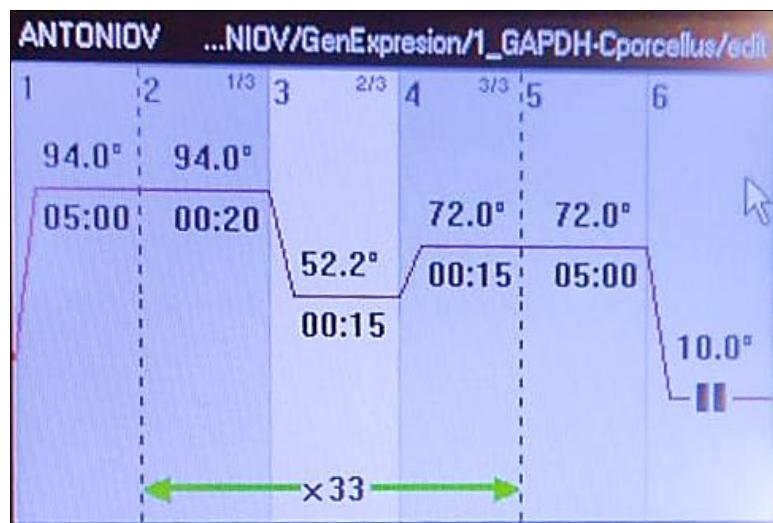


Figura 12. Temperaturas de amplificación del termociclador

2.7.7. Electroforesis de los productos de PCR

Para este procedimiento, se agregaron 5 μ l de buffer de carga a las muestras y se centrifugó. Se colocaron 12 μ l de cada muestra en los pocillos del gel de agarosa, se llevó a la electroforesis por 40 minutos y finalmente, se trasladó al fotococumulador para el análisis de la expresión génica de los receptores de melatonina, LH e IGF-I.

3. Variables de estudio

3.1. Variables dependientes

- Peso de los ovarios
- Índice gonadosomático (GSI): $[(\text{peso ovario}/\text{peso corporal}) \times 100]$
- Concentración de P4 en sangre
- Concentración de E2 en sangre
- Número de folículos en el ovario
- Expresión del gen de IGF-I
- Expresión del gen de LH

- Expresión del gen de melatonina

3.2. Variables independientes

- Fase lunar (luna nueva, cuarto creciente, luna llena, cuarto menguante)
- Ciclo lunar (1-4)
- Fase del ciclo estral (fase luteal, fase folicular)

3.3. Covariables

- Peso corporal

4. Análisis estadístico

El procesamiento de los datos se realizó con el Sistema de Análisis Estadístico (SAS®; Versión 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). La normalidad de los datos fue verificada con la prueba de *Kruskal-Wallis*, y al no cumplirse la normalidad las variables numéricas fueron transformadas al *logaritmo 10* y las porcentuales al arcoseno. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza-covarianza usando el modelo lineal general (GLM). Para comparar las medias se utilizó la prueba de los mínimos cuadrados (Least-squares means: lsmeans). Los valores de $P<0,05$ fueron considerados significativos y los que estaban entre 0,051 y 0,10 se tomaron en cuenta como tendencia estadística.

Resultados

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del ciclo lunar sobre aspectos reproductivos que se muestran más adelante. La evaluación de las citologías indicó que 20 animales (25%) estaban en metaestro, 33 en diestro (41,2%), 19 en proestro (23,8%) y 8 en estro (10%).

1. Peso del ovario e índice gonadosomático

La Figura 13 muestra un patrón similar en el peso del ovario (panel A) y en el índice gonadosomático (panel B) de acuerdo a cuatro momentos del ciclo lunar. Ninguna de las dos variables difirió estadísticamente entre fases lunares.

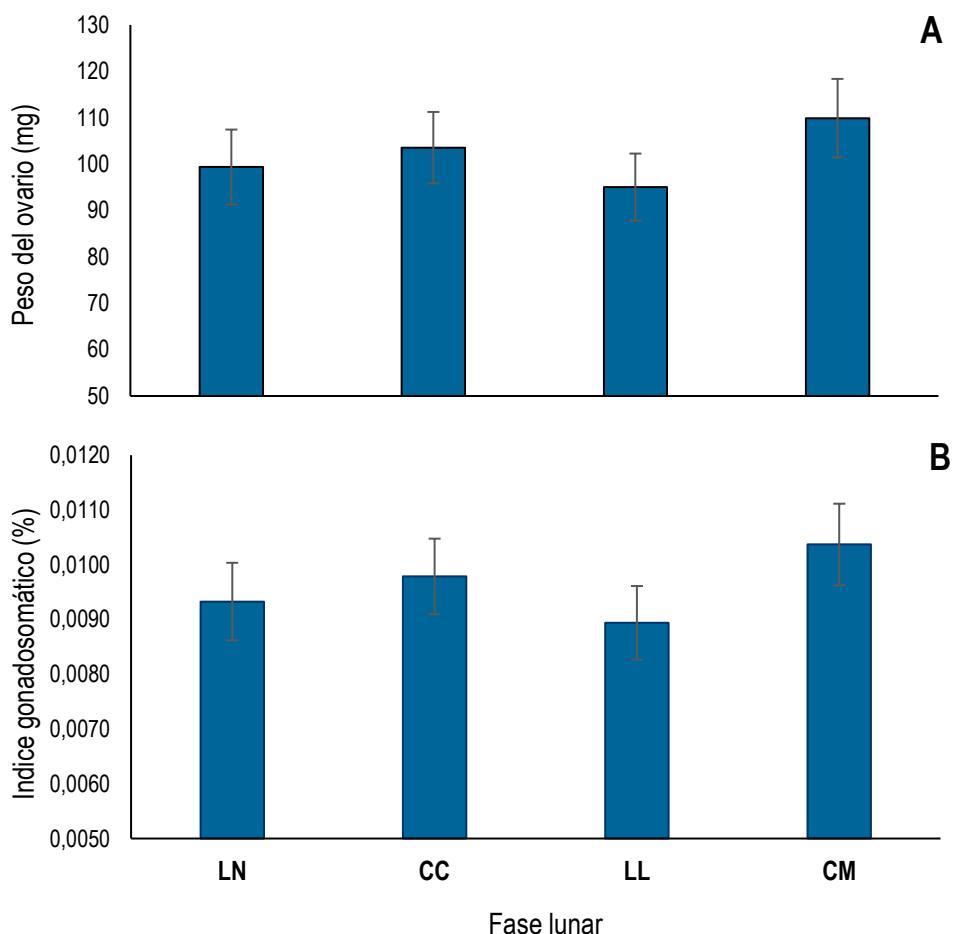


Figura 13. Peso del ovario (Panel A) e índice gonadosomático (Panel B) en cobayas nulíparas en cuatro fases del ciclo lunar ($P > 0.05$). **LN:** luna nueva; **CC:** cuarto creciente; **LL:** luna llena; **CM:** cuarto menguante.

2. Concentración de progesterona y estradiol

La fase lunar afectó la concentración sérica de progesterona ($P = 0,0489$) y la concentración de progesterona por miligramo de ovario ($P = 0,0280$). La Figura 14 muestra que, en ambos casos, la concentración de progesterona fue significativamente mayor en luna nueva, decreció en las siguientes dos fases y aumentó ligeramente en la última.

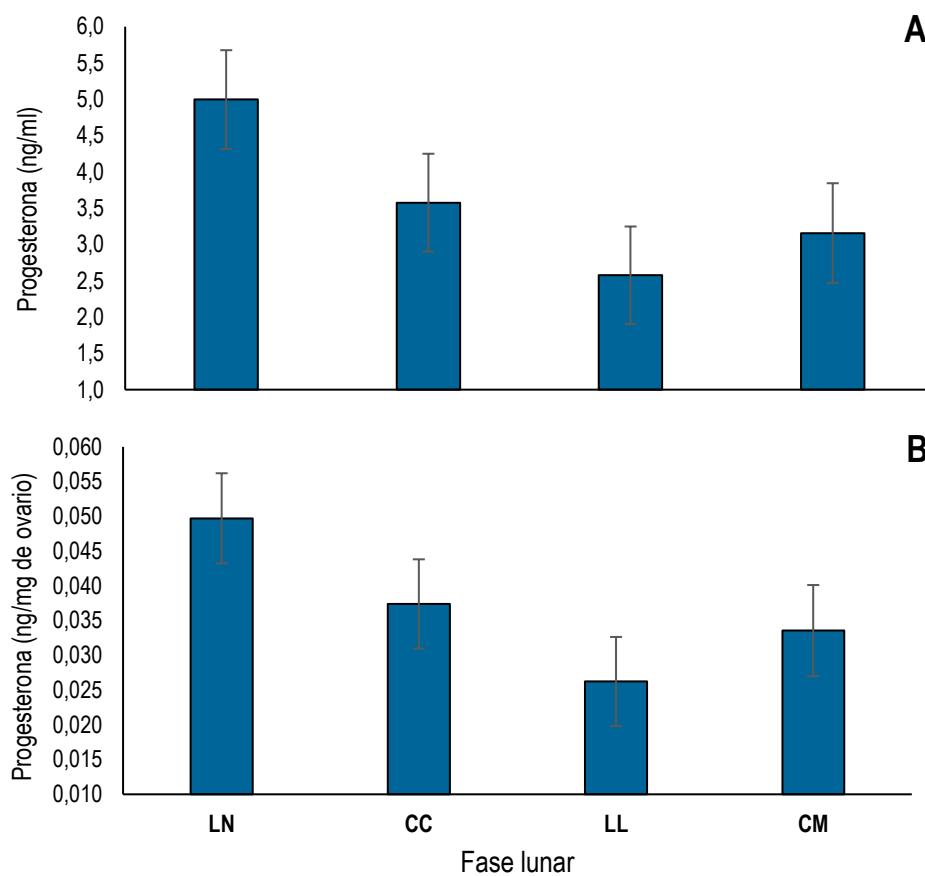


Figura 14. Concentración sérica (panel A) y por miligramo de ovario (panel B) de progesterona en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar. Diferencias estadísticas entre fases: **Panel A:** $LN-LL$ $P = 0,0089$, $CC-LL$ $P = 0,0362$, $LL-CM$ $P = 0,0612$. **Panel B:** $LN-LL$ $P = 0,0044$, $CC-LL$ $P = 0,0329$, $LL-CM$ $P = 0,0375$. **LN:** luna nueva; **CC:** cuarto creciente; **LL:** luna llena; **CM:** cuarto menguante.

La fase lunar influenció la concentración de estradiol por mililitro de suero y por miligramo de ovario ($P < 0,0001$). La concentración de esta hormona fue

significativamente mayor en luna nueva que en las demás fases lunares, las cuales no difirieron entre sí (Figura 15).

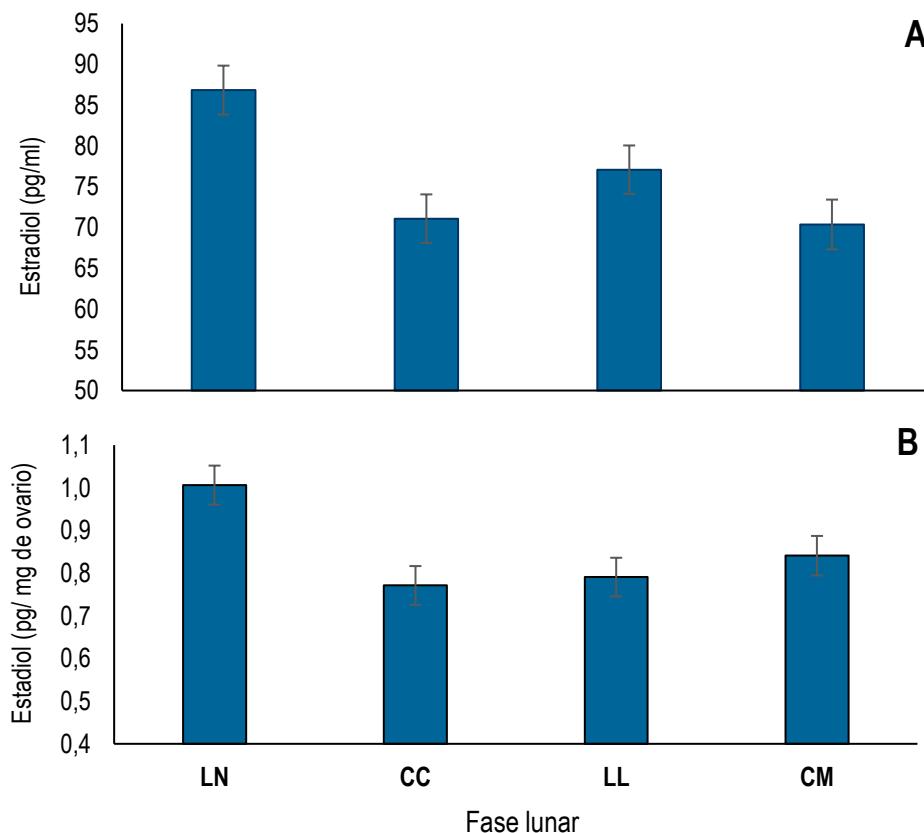


Figura 15. Concentración sérica (panel A) y por milígramo de ovario (panel B) de estradiol en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase del ciclo lunar. Diferencias estadísticas entre fases: **Panel A y B:** ^{LN-CC, LN-LL, LN-CM} $P < 0,0001$. **LN:** luna nueva; **CC:** cuarto creciente; **LL:** luna llena; **CM:** cuarto menguante.

3. Número de folículos antrales y no antrales en cortes histológicos

El Cuadro 1 muestra el número y porcentajes de las diferentes categorías foliculares en las distintas fases del ciclo lunar. En el caso de los folículos antrales grandes, hubo efecto de la fase lunar, tanto en número ($P = 0,0005$) como en porcentaje ($P = 0,0014$). Referente a los folículos antrales medianos no hubo influencia de la fase lunar en el número, pero si en el porcentaje ($P = 0,0316$). En relación a los folículos antrales pequeños no hubo efecto de la fase lunar, pero si una tendencia estadística en el porcentaje ($P=0,0749$). Mientras que, en los folículos secundarios y primarios, no hubo influencia de la fase lunar ni en el número ni en el porcentaje de estas dos categorías foliculares. Finalmente, los folículos primordiales fueron influenciados por la

luna tanto en el número ($P=0.0019$) como en el porcentaje ($P=0.0013$). Se observó un número y porcentaje significativamente menor de folículos antrales grandes en luna llena y cuarto menguante, que en las otras dos fases lunares. La luna nueva fue la fase con mayor número y porcentaje de folículos antrales grandes. Asimismo, el porcentaje de folículos antrales medianos fue estadísticamente mayor en cuarto creciente y cuarto menguante que en luna llena. Los folículos primordiales fueron numérica y proporcionalmente más abundantes en luna llena y más escasos en cuarto menguante.

Cuadro 1. Número y porcentaje de folículos de diferentes categorías en cobayas nulíparas de acuerdo a la fase lunar (media \pm E.E)

Folículos	Fases de la luna				Efecto lunar valor de P
	Nueva	Cresciente	Llena	Menguante	
Antrales grandes					
número	$1,2 \pm 0,16^a$	$0,8 \pm 0,15^{a,c}$	$0,2 \pm 0,15^{b,c}$	$0,4 \pm 0,17^c$	0,0005
porcentaje	$3,0 \pm 0,49^{1,2}$	$2,0 \pm 0,48^2$	$0,6 \pm 0,46^{3,4}$	$0,8 \pm 0,49^4$	0,0014
Antrales medianos					
número	$4,4 \pm 0,60$	$5,6 \pm 0,58$	$4,2 \pm 0,56$	$4,7 \pm 0,63$	0,3653
porcentaje	$14,5 \pm 1,87^{4,5,6,7}$	$18,0 \pm 1,83^{5,7}$	$11,7 \pm 1,77^6$	$18,5 \pm 1,87^7$	0,0316
Antrales pequeños					
número	$3,1 \pm 0,44$	$3,7 \pm 0,43$	$4,0 \pm 0,42$	$4,0 \pm 0,46$	0,4861
porcentaje	$10,5 \pm 1,23$	$9,4 \pm 1,21$	$10,8 \pm 1,16$	$13,8 \pm 1,23$	0,0749
Secundarios					
número	$5,2 \pm 0,57$	$4,2 \pm 0,55$	$4,6 \pm 0,54$	$5,2 \pm 0,60$	0,5622
porcentaje	$15,0 \pm 1,41$	$11,0 \pm 1,39$	$13,7 \pm 1,33$	$15,5 \pm 1,42$	0,1159
Primarios					
número	$2,0 \pm 0,31$	$2,1 \pm 0,30$	$1,5 \pm 0,30$	$2,0 \pm 0,32$	0,5392
porcentaje	$5,4 \pm 0,87$	$5,2 \pm 0,85$	$4,1 \pm 0,82$	$6,6 \pm 0,87$	0,2237
Primordiales					
número	$18,8 \pm 1,66^{c,d,e}$	$20,3 \pm 1,62^{d,e}$	$22,5 \pm 1,57^e$	$13,3 \pm 1,74^f$	0,0019
porcentaje	$51,5 \pm 2,60^{7,8}$	$54,2 \pm 2,55^{8,9}$	$58,9 \pm 2,46^9$	$44,6 \pm 2,60^{10}$	0,0013

Letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b, d-f, e-f} $P<0,01$; ^{c-f} $P<0,05$. Números diferentes en la misma línea difieren:

1-2, 1-3, 5-7, 7-10, 9-10 $P<0,01$; 2-3, 5-6, 7-9 $P<0,05$; 2-4 $P=0,0583$; 8-10 $P=0,0616$. Líneas sin superíndice no mostraron diferencias estadísticas entre fases lunares

4. Número de cuerpos lúteos en cortes histológicos

El análisis mostró que no hubo efecto de la fase lunar en el número de cuerpos lúteos, aunque se observaron mayor cantidad de estructuras luteales en cuarto menguante que en las demás fases lunares (Figura 16).

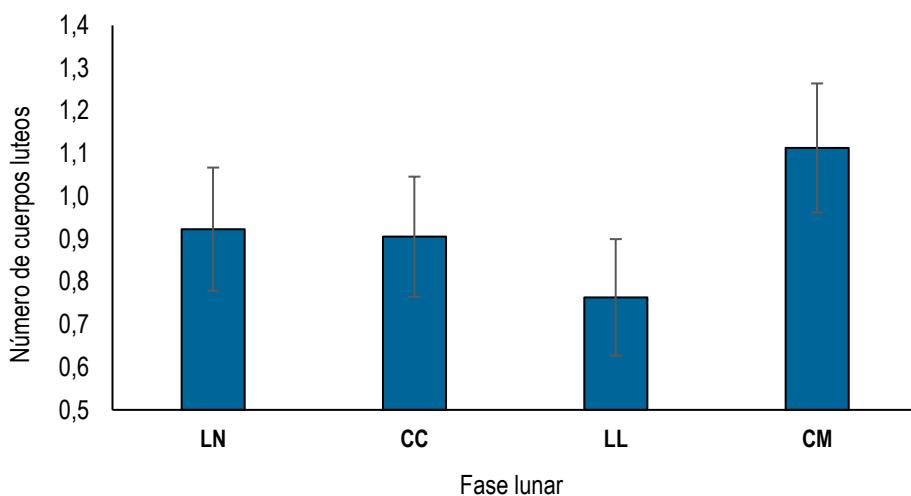


Figura 16. Número de cuerpos lúteos de acuerdo a la fase del ciclo lunar ($P > 0,05$).

LN: luna nueva; **CC:** cuarto creciente; **LL:** luna llena; **CM:** cuarto menguante.

5. Expresión génica de los receptores de melatonina, IGF-I y LH en el ovario

En base al método de PCR convencional, los resultados evidenciaron que existió expresión génica de los receptores de melatonina, LH y IGF-I, sin embargo, cómo se puede observar en las siguientes figuras, no hubo un patrón que nos permita asociar el ciclo lunar con la cantidad de ARN en cada fase del ciclo lunar (Figura 17).

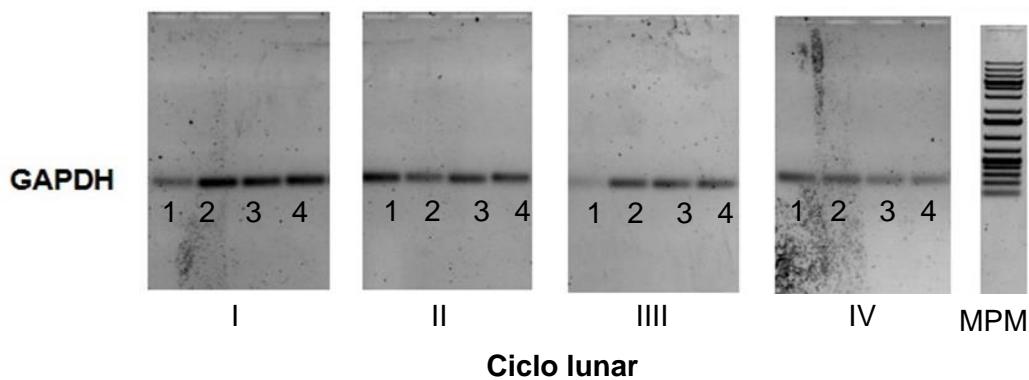


Figura 17. Expresión génica del receptor control GAPDH de acuerdo a cada fase de los ciclos lunares estudiados. **1:** luna nueva; **2:** cuarto creciente; **3:** luna llena; **4:** cuarto menguante. **MPM:** marcador de peso molecular.

En la Figura 18 se presenta la imagen de los productos de PCR de los genes de los receptores A y B de melatonina. Mediante este método de separación de los productos a través de la electroforesis, se aprecia que, en el primer caso, no hubo un patrón que se repitiera en cada ciclo lunar que indique influencia de la fase lunar. No obstante, el patrón de MTRB es menos variable, y parece indicar, por la intensidad y grosor de la banda, una mayor cantidad de ARNm en luna nueva que en las demás fases lunares.

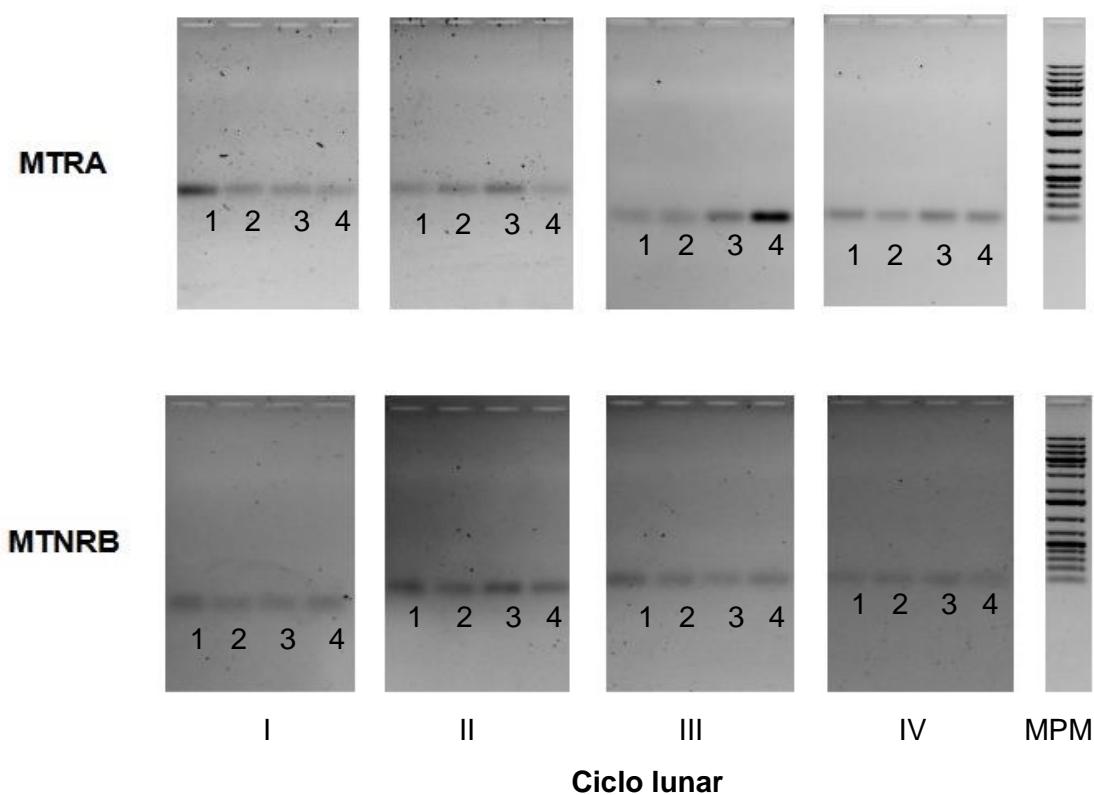


Figura 18. Expresión genética de los receptores de melatonina A (MTRA) y B (MTRB). **1:** luna nueva; **2:** cuarto creciente; **3:** luna llena; **4:** cuarto menguante. **MPM:** marcador de peso molecular.

En el caso del receptor de LH, en 3 de los 4 ciclos estudiados se observó una aparente mayor concentración de ARNm en cuarto creciente y luna llena que en cuarto menguante y luna nueva. Sin embargo, el patrón no fue constante en todos los ciclos lunares estudiados (Figura 19).

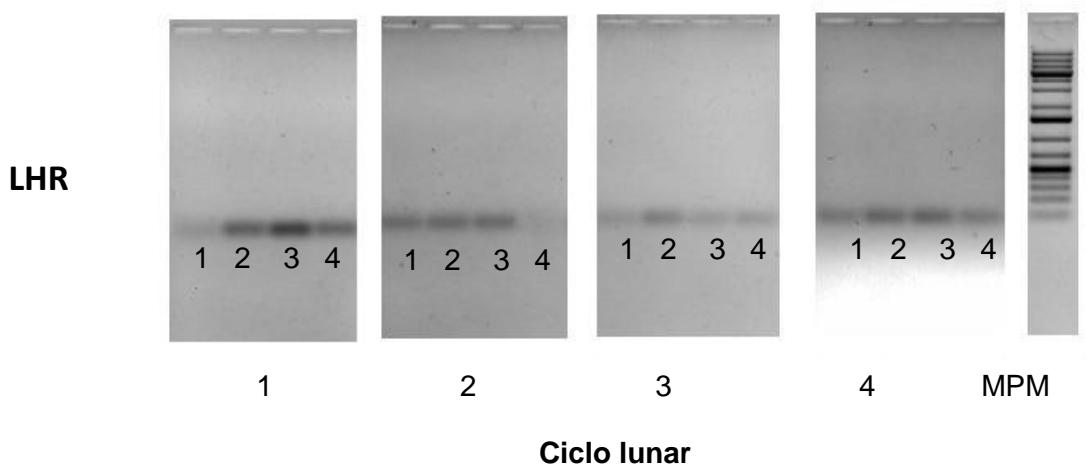


Figura 19. Expresión genética para el receptor de la hormona luteinizante (LH). **1:** luna nueva; **2:** cuarto creciente; **3:** luna llena; **4:** cuarto menguante. **MPM:** marcador de peso molecular.

El gen del receptor de IGF1 se muestra con un nivel de expresión similar en cada fase lunar de los cuatro ciclos lunares estudiados (Figura 20).

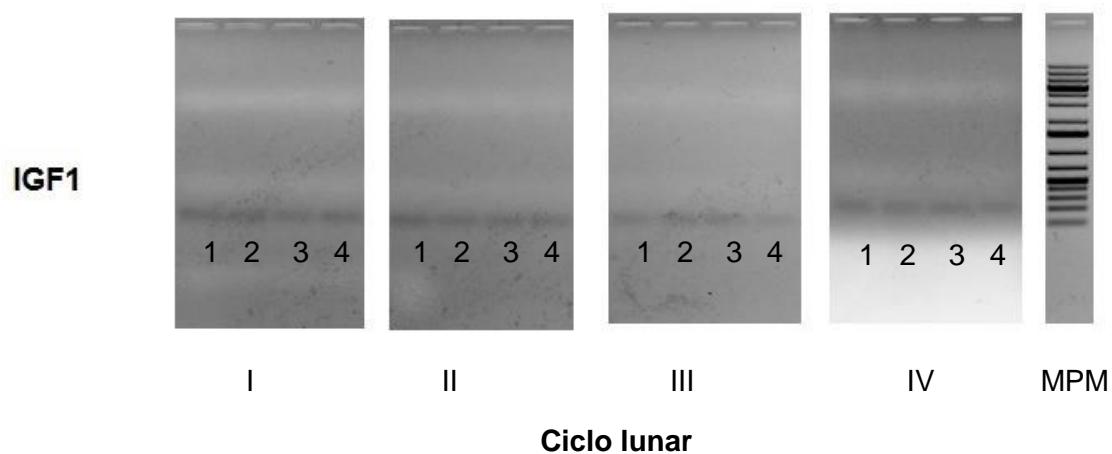


Figura 20. Expresión genética para el receptor de IGF1. **1:** luna nueva; **2:** cuarto creciente; **3:** luna llena; **4:** cuarto menguante. **I:** primer ciclo lunar; **II:** segundo ciclo lunar; **III:** tercer ciclo lunar; **IV:** cuarto ciclo lunar; **MPM:** marcador de peso molecular.

Discusión

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del ciclo lunar en algunas características morfológicas y funcionales del ovario en cobayas, lo cual hasta la actualidad no ha sido investigado. Se evidencia por primera vez la influencia del ciclo lunar sobre las concentraciones séricas de progesterona y estradiol y el recuento de algunas categorías de folículos en cobayas.

La relación expresada en porcentaje entre el peso del ovario y el peso corporal es el índice gonadosomático, fue algo menor ($9.5 \pm 2.9 \times 10^{-3}$) en este estudio que en el de Fernández et al. (2022) ($1.2 \pm 0.09 \times 10^{-2}$) en cobayas mejoradas. Hay que tener en cuenta que en dicho estudio las cobayas fueron multíparas, es decir, tuvieron entre 1 y 3 partos, mientras que en este estudio fueron nulíparas.

Diferentes factores influyen en el peso del ovario de las cobayas, entre ellas el grupo genético, puesto que en el estudio realizado por Fernández et al. (2022), el peso del ovario fue mayor en las cobayas mejoradas (118.3 ± 7.7 g) que en las nativas (62.3 ± 8.1 g). El peso promedio de los ovarios en este estudio, que corresponde a cobayas nulíparas mejoradas, fue de 100.8 ± 3.6 g y algo menor que el de las cobayas mejoradas multíparas del estudio de Fernández et al. (2022). Aunque el peso de los ovarios y el índice gonadosomático en este estudio fue numéricamente mayor en cuarto menguante que en las demás fases del ciclo lunar, las diferencias no fueron significativas.

Este estudio evaluó la influencia del ciclo lunar sobre la concentración sérica de progesterona y estradiol en cuatro momentos del ciclo lunar, la cual, independientemente de la fase del ciclo estral en la que se encontraba la cobaya, fue significativamente más alta en luna nueva que en las demás fases lunares. Como una proporción similar de cobayas en fase luteal conformaron las cuatro fases lunares, es muy probable que, por un mecanismo aun no descrito, los animales en luna nueva tuvieron mayor capacidad esteroidogénica que los que estaban en otras fases del ciclo lunar. Esto es aún más evidente en relación a la producción de estradiol, ya que la proporción de cobayas en fase folicular fue algo menor en luna nueva que en las demás fases lunares.

Esta es la primera evidencia de la influencia del ciclo lunar en las concentraciones de esteroides gonadales en cobayas. Solo hay un estudio publicado en animales de interés productivo en el que se demostró un efecto de la luna en las

concentraciones de progesterona. El-Darawany et al., (2021) encontraron que las cabras nacidas en luna llena alcanzaron la pubertad más joven y tuvieron concentraciones de progesterona a las 26 y 27 semanas de edad más altas que las nacidas en otros momentos del ciclo lunar.

En seres humanos también se observó efecto de la luna en la secreción de otro esteroide gonadal, la testosterona, cuyas concentraciones, tanto en las muestras tomadas en la mañana como en la noche, fueron significativamente mayores en luna llena que en luna nueva (Dergaa et al., 2021). Estos hallazgos junto con los observados en este estudio demuestran que el movimiento de la luna alrededor de la Tierra tiene influencia la actividad funcional de las góndolas de los mamíferos modificando la capacidad esteroidogénica de ovarios y testículos. E incluso, puede tener un efecto a largo plazo como demostraron en cabras (El-Darawany et al., 2021) al observar que las cabritas nacidas en luna llena alcanzaron la pubertad antes que las que nacieron en otros momentos del ciclo lunar.

Otro hallazgo novedoso en este estudio fue observar un efecto del ciclo sobre el número y proporción de algunas categorías de folículos, particularmente los antrales grandes y los primordiales. En el primer caso, estos folículos fueron más numerosos en luna nueva que en las demás fases lunares; este hallazgo es consistente con el hecho que en luna nueva la concentración de estradiol fue mayor que en los otros momentos muestreados del ciclo lunar. Aunque no ha sido estudiado en cobayas, es bien conocido que en los mamíferos los folículos de mayor tamaño producen mayor cantidad de estradiol que los folículos más pequeños (Senger, 2012), lo que se refleja en una mayor concentración sérica de esta hormona en los períodos en los que estos son más grandes y funcionalmente más activos, como en proestro y estro (Spicer & Echternkamp, 1986).

En relación a los folículos primordiales, estos fueron numérica y proporcionalmente más numerosos en luna llena y fueron disminuyendo en cuarto creciente, luna nueva y cuarto menguantes. En este caso es más difícil saber porque estos fueron más numerosos en esta fase particular del ciclo lunar. Varios factores afectan a la reserva folicular ovárica como la edad, estado nutricional, medio ambiente, estrés, entre otros (Boeta et al., 2018). Según estos resultados el ciclo lunar también puede modificarla. Estos folículos continuamente pasan de la fase de quiescencia a la de folículo primordial como resultado de una serie de estímulos paracrinos (Fortune et al., 2000). Aparentemente, mediante un mecanismo no conocido todavía el ciclo lunar moduló estos factores, ya que, según estos resultados, estos estímulos fueron mayores

en cuarto menguante, dado que fue en esta fase en la que hubo menor porcentajes de folículos primordiales y mayor porcentaje de primarios. De hecho, con excepción de los folículos antrales grandes y de los primordiales, las demás categorías de folículos fueron proporcionalmente más numerosos en cuarto menguante que en las demás fases lunares.

En la presente investigación no se encontró diferencia en el número de cuerpos lúteos que oscilaron entre 0,76 y 1,13 en luna llena y cuarto menguante respectivamente. Luna nueva, cuando se registró la mayor concentración de progesterona no coincidió con la mayor cantidad de tejido luteal, sin embargo, las diferencias en cuerpos lúteos entre fases fueron tan pequeñas, que probablemente no se puedan explicar la diferencia en las concentraciones de progesterona en las diferentes fases del ciclo lunar por la cantidad de tejido luteal en cada fase; además, la presencia de tejido luteal no necesariamente es indicativo de capacidad esteroidogénica, dado que el cuerpo lúteo persiste algunos días luego de la luteólisis pero no produce progesterona. Algunos de los cuerpos lúteos cuantificados podrían haber sido estructuras luteales no funcionales.

El o los mecanismos que explican la influencia del ciclo lunar sobre la actividad reproductiva no ha sido descrita aún, aunque hay un conjunto de evidencias que señalan que la melatonina podría ser responsable de modular esos cambios, como se ha demostrado en algunas especies de peces (Ikegami, Takeuchi, & Takemura, 2014). Estudios en ratas y ratones demostraron que la luna causa cambios funcionales y estructurales en la glándula pineal que resultan en mayor secreción de melatonina en luna llena que en luna nueva (Gerasimov et al., 2014). Como se han detectado receptores de melatonina en los ovarios de mamíferos (Steffens et al., 2015; Tamura et al., 2009), es posible que esta hormona haya regulado los cambios morfológicos y hormonales observados en este estudio.

Se planteó evaluar la expresión de los receptores de melatonina y de LH e IGF1 con el fin de fundamentar las bases bilógicas de los cambios que pudieran encontrarse en este estudio; sin embargo, mediante la evaluación subjetiva de los productos de PCR separados por electroforesis, que indican la cantidad relativa de ARNm de estos receptores, no fue posible asociar el ciclo lunar con su nivel de expresión, y a su vez explicar los cambios que se observaron por influencia de la luna. Es necesario aplicar métodos cuantitativos o semicuantitativos para tener resultados más objetivos y concluyentes al respecto.

Conclusiones

- La fase lunar no influenció el peso de los ovarios ni el índice gonadosomático en cobayas nulíparas.
- Las concentraciones de progesterona y estradiol sérico fueron mayores en luna nueva que en las demás fases lunares estudiadas.
- La luna influenció el número y proporción de los folículos antrales grandes y primordiales, que fueron más numerosos en luna nueva y luna llena respectivamente.
- El número de cuerpos lúteos no varió por efecto del ciclo lunar
- Mediante un método cualitativo, no fue posible asociar el nivel de expresión de los receptores de melatonina, LH e IGF1 con las fases del ciclo lunar.

Referencias

- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3–4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Aguirre, A. A., Palomares, R. A., Ondiz, A. D. De, Soto, E. R., Perea, M. S., Hernández-fonseca, H. J., & Perea, F. P. (2021). *Lunar Cycle Influences Reproductive Performance of Crossbred Brahman Cows Under Tropical Conditions*. 160–168. <https://doi.org/10.1177/0748730420983638>
- Al-Saffar, F., & Al-Ebbadi, H. (2019). Histomorphological and Histochemical Study of the Ovary and the Uterine Tubes of the Adult Guinea Pigs (Cavia porcellus). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, D. Histology & Histochemistry*, 11(2), 1–22. <https://doi.org/10.21608/eajbsd.2019.56024>
- Áldas, C. M. O. (2008). *Evaluación de dos métodos de sincronización del estro en cuyes*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Aliaga, L., Moncayo, R., Rico, E., & Caycedo, A. (2009). *Producción de cuyes*. Fondo Editorial Universidad Católica Sedes Sapientiae.
- Andreatta, G., & Tessmar, K. (2020). The Still Dark Side of the Moon: Molecular Mechanisms of Lunar-Controlled Rhythms and Clocks. *Journal of Molecular Biology*, 432(12), 3525–3546. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.03.009>
- Aranda, A. (2010). La Superfamilia de los Receptores Nucleares. *Sebbm Divulgación*, 107(1), 1–2.
- Avilés, D., Landi, V., Delgado, J. V., & Martínez, A. M. (2014). El pueblo ecuatoriano y su relación con el cuy. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 4, 38–40.
- Barrett, P., Conway, S., & Morgan, P. J. (2003). Digging deep - Structure-function relationships in the melatonin receptor family. *Journal of Pineal Research*, 35(4), 221–230. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00090.x>
- Bean, A. D. (2013). Ovarian Cysts in the Guinea Pig (Cavia porcellus). *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16(3), 757–776. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2013.05.008>
- Bennie, J. J., Duffy, J. P., Inger, R., & Gaston, K. J. (2014). Biogeography of time

partitioning in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38), 13727–13732.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216063110>

Bermeo, M., & Guamán, A. (2022). *Evaluar la sincronización de celo con PG y su efecto estimado sobre la fertilidad y prolificidad en cobayas nativas*. Universidad de Cuenca.

Bevington, M. (2015). Lunar biological effects and the magnetosphere. *Pathophysiology*, 22(4), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2015.08.005>

Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J. L., Hernández, J., Hernández, J., Páramo, R., Parras, A., Rangel, L., Salgado, B., Valencia, J., & Zarco, L. (2018). *Fisiología reproductiva animales domésticos* (primera).

Bookhout, C. G. (1945). The development of the guinea pig ovary from sexual differentiation to maturity. *Journal of Morphology*, 77(2), 233–263.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1050770207>

Borodina, A. Y. (2023). Reference intervals of mass coefficients of internal organs of guinea pigs. In *Laboratornye Zhivotnye dlya nauchnykh issledovanii* (Laboratory Animals for Science) (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.57034/2618723x-2023-03-05>

Caligioni, C. S. (2009). Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 48(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>

Chakraborty, U. (2014). Effects of different phases of the lunar month on humans. *Biological Rhythm Research*, 45(3), 383–396.
<https://doi.org/10.1080/09291016.2013.830508>

Chinchilla, J., Kerns, K., & Rothschild, M. (2018). Lunar and climatic effects on boar ejaculate traits. *CAminal Reproduction Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.006>

Dergaa, I., Romdhani, M., Fessi, M. S., Saad, B., Varma, A., Salem, A. Ben, Gadhavi, B., Souissi, N., & Hammouda, O. (2021). Does lunar cycle affect biological parameters in young healthy men? *Chronobiology International*, 00(00), 1–8.
<https://doi.org/10.1080/07420528.2021.1897609>

- Dos Santos, A. C., Favaron, P. O., Viana, D. C., Ferreira, A. O., Oliveirae Silva, F. M., Alcântara, D., Vasconcelos, B. G., Rici, R. E. G., De Assis-Neto, A. C., & Miglino, M. A. (2016). Intrauterine development of female genital organs in *Cavia porcellus* (Rodentia: Caviidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 48(2), 389–397.
- El-Darawany, A., Mahmoud, S., Khaled, M., & Mostafa, A. (2021). Effect of lunar cycle on some reproductive aspects of female goats. *Biological Rhythm Research*, 00(00), 1–12. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1600264>
- Espinoza, J., Ortega, R., Palacios, A., Valencia, J., & Aréchiga, C. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Revista Interciencia Internacional*, 32(2).
- Eurell, J. A. (2004). *Veterinary Histology* (primera). Printes Inc. <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=odN5KmGAKCQC&oi=fnd&pg=PA2&dq=Eurell,+J.+2004.+Veterinary+Histology.+Tetan+NewMedia.+USA&ots=c ev4cAD1Vs&sig=0rxO6OqGaLNEonxM5xKk1HnHuXM#v=onepage&q&f=false>
- Farrell, R. E. (2010). Principles of Detection. In *RNA Methodologies* (pp. 301–320). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374727-3.00014-0>
- Felipe, A. E., & Masson, P. . (2005). Un modelo descriptivo del sistema reproductor hembra del coipo (*Myocastor coypus*) I: el ovario (A descriptive model of the female reproductive system of coypu (*Myocastor coypus*) I: the ovary). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VI(12), 1–22.
- Fernández, A., Encalada, T., Garzón, H., Guaman, A., Ayala, L., Rosales, C., Argudo, D., & Perea, F. (2018). Caracterización morfométrica de útero, ovarios y ovocitos de cobayas criollas (*Cavia porcellus*) de la sierra sur de Ecuador. *XXVI Reunión de La Asociación Latinoamericana de Producción Animal V Simposio Internacional de Producción Animal*, 149. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30751/1/documento.pdf>
- Fernández, E., Rosales, C., Garzón, J., Argudo, D., Ayala, L., Guevara, G., Maldonado, J., & Perea, F. (2022). Morphological and histological characteristics of ovaries from two genetic groups of guinea pigs (*Cavia porcellus*) from South America. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 33(4), 1–11. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i4.23349>

- Fortune, J. E., Cushman, R. A., Wahl, C. M., & Kito, S. (2000). *The primordial to primary follicle transition*. 163, 53–60.
- Garverick, H. A., & Smith, M. F. (1993). Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 9(2), 223–247. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30643-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30643-5)
- Gerasimov, A. V., Kostyuchenko, V. P., Solovieva, A. S., & Olovnikov, A. M. (2014). *La glándula pineal como sensor lunar gravitacional endocrino: Manifestación de Dependiente de la Fase Lunar Cambios morfológicos en ratones*. 79.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: Formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4), 283–301. <https://doi.org/10.1177/074873001129001980>
- González, H., & González, M. (2005). Biotecnología reproductiva: Una alternativa para mejorar la producción animal. *Biotempo*, 5, 5–11.
- Goodman, R. L., & Inskeep, E. K. (2015). Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. In *Physiology of Reproduction* (Vol. 2, pp. 1259–1305). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00027-2>
- Graham, E. M., Kubin, J. A., Zubrow, A., Mishra, O. P., & Delivoria-Papadopoulos, M. (2001). Effect of gestational age and hypoxia on activity of ribonucleic acid polymerase in fetal guinea pig brain. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 184(4), 736–742. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.111794>
- Gregoire, A. (2012). Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) : production et évaluation des embryons. *Sciences Agricoles*.
- Grollman, A. (1965). Biologic Rhythms. *Postgraduate Medicine*, 38(4), A-132-A-134. <https://doi.org/10.1080/00325481.1965.11696832>
- Guo, Y., Bao, Y., Meng, Q., Hu, X., Meng, Q., Ren, L., Li, N., & Zhao, Y. (2012). Immunoglobulin Genomics in the Guinea Pig (*Cavia porcellus*). *PLoS ONE*, 7(6), e39298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039298>
- Hargaden, M., & Singer, L. (2012). Anatomy, Physiology, and Behavior. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 575–602). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1>

- Hasan, K. N. uru., Moniruzzaman, M., & Maitra, S. K. uma. (2014). Melatonin concentrations in relation to oxidative status and oocyte dynamics in the ovary during different reproductive phases of an annual cycle in carp Catla catla. *Theriogenology*, 82(8), 1173–1185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.001>
- Herington, J. L., Reese, J. C., Paria, B. C., & Hall, L. (2018). *Rodents*. 2, 674–681. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20526-8>
- Hernandez-Fonseca, H. J., Bosch, P., Miller, D. M., Wininger, J. D., Massey, J. B., & Brackett, B. G. (2005). Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. *Fertility and Sterility*, 83(4 SUPPL.), 1180–1187. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.07.985>
- Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., & Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 461–477. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.013>
- Ikegami, T., Takeuchi, Y., Hur, S.-P., & Takemura, A. (2014). Impacts of moonlight on fish reproduction. *Marine Genomics*, 14, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.11.007>
- Ikegami, T., Takeuchi, Y., & Takemura, A. (2014). Lunar Clock in Fish Reproduction. *Department of Chemistry, Biology and Marine Science, June 2015*. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55261-1>
- Kemppainen, R. J. (2023). *Manual MSD Manual Veterinario*. Universidad de Auburn.
- Kriner, A. (2004). Phases of the moon : how and when teach them ? *Ciência & Educação*, 10(1), 111–120.
- Landi, V., Avilés, D., Martínez, A., & Delgado, J. (2014). El cuy (Cavia porcellus): un recurso andino de interés agroalimentario The guinea pig (Cavia porcellus): An Andean resource of interest as an agricultural food source. *Animal Genetic Resources/Ressources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales*, 55, 87–91. <https://doi.org/10.1017/S2078633614000368>
- Lema, E., & Tenecela, M. del C. (2024). Efecto del flushing energético sobre la población

folicular, el número de cuerpos lúteos y calidad ovocitaria en cobayas primerizas. In *Universidad de Cuenca*.

Lerner, A. et al. (1958). Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 80(2), 2587.

Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 1199–1257). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00026-0>

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.

Llambí, S., Victoria, M., & Laviña, A. (2018). *Selecciones De Genética Veterinaria I*.
https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/23919/1/Selecciones_Genetica_Veterinaria.pdf

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. *The Anatomical Record*, 243(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/ar.1092430106>

Martínez-Soriano, F., Ruiz-Torner, A., Armañanzas, E., & Valverde-Navarro, A. (2002). Influence of light/dark, seasonal and lunar cycles on serum melatonin levels and synaptic bodies number of the pineal gland of the rat. *Histology and Histopathology*, 17(1), 213–222. <https://doi.org/10.14670/HH-17.213>

Mercier, A., Zhao Sun, Baillon, S., & Hamel, J. F. (2011). Lunar rhythms in the deep sea: Evidence from the reproductive periodicity of several marine invertebrates. *Journal of Biological Rhythms*, 26(1), 82–86. <https://doi.org/10.1177/0748730410391948>

Mikulecky, M., & Bounias, M. (1997). Worker honeybee hemolymph lipid composition and synodic lunar cycle periodicities. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(2), 275–279. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1997000200018>

Moujir, F., Sanchez-Franco, F., Santana, C., Cacicedo, L., & Alonso, R. (1990). Immunoreactive Levels of Pineal Arginine Vasopressin Change During the Rat Estrous Cycle. *Journal of Pineal Research*, 8(4), 359–366.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1990.tb00896.x>

- Nilsson, E., & Skinner, M. (2001). Cellular interactions that control primordial follicle development at folliculogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(00\)00099-x](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(00)00099-x)
- Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., Fauche, J. L., Delagrange, P., Canet, E., & Boutin, J. A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31311–31317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005141200>
- Nowak, R. A. (2018). Estrous and Menstrual Cycles. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 114–120). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64631-7>
- Obregón, D. (2009). *Utilización de dos métodos de sincronización de celos en cuyas multíparas* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <https://revistas.ufrj.br/index.php/rce/article/download/1659/1508%0Ahttp://hipatiapress.com/hpjournals/index.php/qre/article/view/1348%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09500799708666915%5Cnhttps://mckinseyonsociety.com/downloads/reports/Educa>
- Ortíz, E., Uría, E., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2003). Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerbi 1833) (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). *Hidrobiológica*, 13(2), 145–150.
- Palacios, C., & Abecia, J. A. (2014). Does lunar cycle affect lamb production after artificial insemination in sheep? *Biological Rhythm Research*, 45(6), 869–873. <https://doi.org/10.1080/09291016.2014.923621>
- Pazmino, A., & Pangol, E. (2021). Efecto del estadio del ciclo estral y de la categoría de los complejos cúmulo-ovocito (COC's) sobre las características morfológicas y funcionales de ovocitos de cobaya (*Cavia porcellus*). In *Universidad de Cuenca*.
- Perea, M. F., Fernández, E. A., Garzón, J. P., Rosales, C. A., Hernández-fonseca, H., Perdomo, D. A., Perea, F. P., Perea, M. F., Fernández, E. A., Garzón, J. P., Rosales, A., Hernández-fonseca, H., Perdomo, D. A., Perea, F. P., & Hernández-H. (2024). The moon cycle influences reproductive and productive traits in guinea pigs (*Cavia porcellus*) from a tropical Andean area. *Chronobiology International*, 41(1), 127–136. <https://doi.org/10.1080/07420528.2023.2294044>
- Pichazaca, W., & Zhirzhán, L. (2023). *Efecto de la época del año y del ciclo lunar sobre*

variables reproductivas en porcinos. Universidad de Cuenca.

- Pino, T. (2015). *Descripción histológica de ovarios y testículos de cuyes (Cavia porcellus) a los dos meses de edad, suplementados con nucleótidos*. Universidad Católica de Santa María.
- Pisarev, M. A., & Calandra, R. S. (2014). *Fisiopatología encórina: Bioquímica y Métodos Diagnósticos*. Química Montpellier S.A.
- Portelli, C. (2013). *Superovulation and Embryo Recovery in the Guinea Pig* [Szent Istvan University]. <http://www.huveta.hu/handle/10832/973>
- Pritt, S. (2012). Taxonomy and History. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (pp. 563–574). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00019-5>
- Quesenberry, K. . (1994). Guinea pigs. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 24(1), 67–87. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(94\)50003-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(94)50003-2)
- Quesenberry, K., Donnelly, T., & Mans, C. (2012). *Biology, Husbandry, and Clinical Techniques of Guinea-pigs and Chinchillas* (pp. 279–294).
- Revel, F. G., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J. D., & Simonneaux, V. (2009). Melatonin controls seasonal breeding by a network of hypothalamic targets. *Neuroendocrinology*, 90(1), 1–14. <https://doi.org/10.1159/000219588>
- Sadeu, J., Adriaens, I., Cortvriendt, R., & Smitz, J. (2007). Study of folliculogenesis in vivo in guinea pig. *Theriogenology*, 68(9), 1228–1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.028>
- Senger, P. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition* (3th ed.). Redmond (OR): Current Conceptions.
- Shi, F., Watanabe, G., Trewin, A. L., Hutz, R. J., & 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. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.1311>
- Shomer, N., Holcombe, H., & Harkness, J. (2014). Número de ovulaciones por ciclo estral en cuyes (Cavia porcellus) Andina y Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 25(1), 29–36.

- Sisk, D. B. (1976). Physiology. In J. E. Wagner & P. J. Manning (Eds.), *The Biology of the Guinea Pig* (pp. 63–98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-730050-4.50012-0>
- Solís, R. J., & Chávez, P. N. (2015). *Evaluación De Producción in Vitro De Embriones En Cuyes (Cavia Porcellus)* [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2895/1/T-UTC-00419.pdf>
- Solorzano, J., & Sarria, J. (2014). *Crianza, producción y comercialización de cuyes* (Primera). Editorial Macro EIRL.
- Sower, S. A., Grove-Strawser, D., Ronsheim, P. M., Connolly, J. B., Bourn, C. G., & Rubin, B. S. (2002). Guinea pig GnRH: Localization and physiological activity reveal that it, not mammalian GnRH, is the major neuroendocrine form in guinea pigs. *Endocrinology*, 143(5), 1602–1612. <https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8803>
- Spicer, L., & Echternkamp, E. (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 2(62), 428–451.
- Steffens, F., Zhou, X., Sausbier, U., Sailer, C., Motejlek, K., Ruth, P., Olcese, J., Korth, M., & Wieland, T. (2015). *Melatonin Receptor Signaling in Pregnant and Nonpregnant Rat Uterine Myocytes as Probed by Large Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Activity*. 17(November), 2103–2115. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0047>
- Suzuki, O., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y., & Matsuda, J. (2002). Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Molecular Reproduction Development*, 64(2), 219–225. <https://doi.org/10.1002/mrd.10242>
- Takemura, A., Rahman, M. S., & Park, Y. J. (2010). External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fishes. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 7–26. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02481.x>
- Tamura, H., Ph, D., Nakamura, Y., Ph, D., & Korkmaz, A. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility*, 92(1), 328–343. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.016>
- Terranova, P., & Greenwald, G. (1981). Increased ovulation rate in the cyclic guinea-pig

after a single injection of an antiserum to LH. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61(1), 37–42. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0610037>

Trujillo, R. (1996). *Biología del cuy* (2nd ed.). Editorial Pedagógica “Freire.”

Usca, J., Flores, L., Tello, L., & Navarro, M. (2022). *Manejo general en la cría del cuy*. Aval ESPOCH. [http://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion-publicaciones/public/docs/books/2022-04-05-161827-Manejo general en la cria del cuy.pdf](http://cimogsys.esPOCH.edu.ec/direccion-publicaciones/public/docs/books/2022-04-05-161827-Manejo%20general%20en%20la%20cria%20del%20cuy.pdf)

Wagner, J. E. (1976). Chapter 1 - Introduction and Taxonomy. In J. E. Wagner & P. J. Manning (Eds.), *The Biology of the Guinea Pig* (pp. 1–4). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-730050-4.50006-5>

Walsh, J. L., Percival, A., & Turner, P. V. (2017). *Efficacy of Blunt Force Trauma, a Novel Mechanical Cervical Dislocation Device, and a Non-Penetrating Captive Bolt Device for On-Farm Euthanasia of Pre-Weaned Kits, Growers, and Adult Commercial Meat Rabbits*. 1–15. <https://doi.org/10.3390/ani7120100>

Welker, H., Semm, P., Willig, R., Commentz, J., Wiltschko, W., & Vollrath, L. (1983). *Effects of an Artificial Magnetic Field on Serotonin N-Acetyltransferase Activity and Melatonin Content of the Rat Pineal Gland*. 1983, 426–432.

Zimecki, M. (2006). The lunar cycle: effects on human and animal behavior and physiology. *Postepy Hig Med Dosw*, February 2006, 1–7.

Anexos

Figura 21. Colocación del antifaz a la cobaya



Figura 24. Pesaje de los ovarios



Figura 22. Toma de muestra para citología vaginal



Figura 25. Balanza analítica



Figura 23. Tinción Wright



Figura 26. Tubos al vacío con formol al 10%



Figura 27. Extracción del ARN de las muestras



Figura 30. Colocación de las muestras en el termociclador



Figura 28. Preparación de primers, la reacción y los NTPS



Figura 31. Colocación de las muestras en el gel de agarosa para la electroforesis



Figura 29. Preparación de las reacciones para PCR



Figura 32. Fotodocumentador

