

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO**  
**FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS.**



**EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS EN GATAS**  
**(*Felis catus*) ESTIMULADAS CON HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE**  
**(FSH).**

Tesis de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria.

**Leonardo Alexis López Zamorano**  
**Temuco-Chile**  
**2004**

**PROFESOR GUÍA**

**Dr. Alfonso Sánchez R.**

---

**PROFESOR INFORMANTE INTERNO**

**Dr. Mauricio Silva J.**

---

**PROFESOR INFORMANTE EXTERNO**

**Dr. Fernando Saravia R.**

---

**PROFESOR INVITADO**

**Prof. Marco Berland O.**

---

**FECHA EXÁMEN DE GRADO:**

**27 de Diciembre de 2004**

## INDICE

<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>SUMARY.</b>	<b>3</b>
<b>1. ANTECEDENTES.</b>	<b>5</b>
<b>2. HIPOTESIS.</b>	<b>9</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>9</b>
<b>4. OBJETIVO ESPECÍFICO.</b>	<b>9</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO.</b>	<b>10</b>
<b>6. RESULTADOS.</b>	<b>15</b>
<b>7. DISCUSIÓN.</b>	<b>24</b>
<b>8. CONCLUSIÓN.</b>	<b>28</b>
<b>ANEXOS.</b>	<b>29</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>37</b>

*Dedico a...*

*A mi padre, quien me ha enseñado que el trabajo y la responsabilidad son pilares fundamentales en esta vida, y permitir comenzar este sueño...*

*A mi madre, que con su inconmensurable entrega, amor y dedicación supo estar a mi lado siempre, y permitir concretar una ilusión...*

*A mis hermanos y hermana, quienes jamás me desampararon y siempre tendieron una mano en todo momento, además me demostraron que ni el tiempo ni la distancia son motivos para olvidar...*

*A Javiera, mi aire de cada día...*

*A Pamela, motivo de mi esfuerzo y superación...*

*A todos y cada uno de mis familiares, por confiar en mi...*

*A mis profesores, por su incondicional ayuda...*

*...y a ti mi Dios... por estar presente en cada uno de los antes mencionados...*

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estimar el efecto del tratamiento previo con hormona folículo estimulante (FSH) sobre la calidad de los complejos cumulus-ovocito (CCO) recuperados desde ovarios de gatas. Fueron utilizadas 21 gatas adultas asignadas al azar entre los grupos FSH (n=9) y Control (n=12). A las gatas del grupo FSH se les administró cada 24 horas 5 mg NIH de FSH (Folltropin-V®. Vetrapharm Inc.) vía subcutánea por 4 días consecutivos. El grupo control no recibió estímulo gonadotrófico. Los ovarios fueron obtenidos mediante ovariectomía realizada 24 horas después del término del tratamiento gonadotrófico, luego fueron transportados al laboratorio en PBS al 0,3% a 37°C en un tiempo no mayor a 4 horas. Los CCO fueron recuperados desde los ovarios mediante un fino desmenuzamiento, y seleccionados de acuerdo a la integridad del citoplasma y de la granulosa como aptos para la maduración, en categorías I o excelente y II o buenos para los grupos FSH y Control. Los CCO seleccionados fueron cultivados durante 24 hrs a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, en medio TCM-199, 0,4% BSA, 1µl/ ml FSH, 1µl/ ml LH y 1µg / ml de 17β estradiol, 50 µg/ml Gentamicina, 0.20 mM de piruvato. Posterior a la maduración, los ovocitos fueron desnudados fijados y teñidos, luego se evaluó el estado de maduración, considerando como maduros aquellos en los cuales se observó la presencia de placa metafásica y la expulsión del primer cuerpo polar.

Se recuperó un total de 375 y 499 CCO de los grupos FSH y Control, respectivamente. Se observó un aumento en número y calidad de CCO aptos para maduración *in vitro* recuperados del grupo FSH (25,36%) respecto al grupo Control (17,03%) (p<0.05). Además, resultó significativamente mayor el número de CCO correspondientes a categoría I en el grupo FSH, en comparación al grupo control 30,21%

y 17,6% respectivamente ( $p < 0.05$ ). La tasa de maduración *in vitro*, para el grupo FSH fue de un 73,62%, significativamente superior al grupo control 49,38% ( $p < 0.05$ ).

De los resultados obtenidos en este estudio concluimos que ovocitos colectados desde gatas tratadas con FSH presentan un mayor potencial de maduración *in vitro* en comparación a gatas del grupo control. Además se puede señalar que el estímulo gonadotrófico previo aumenta el número y la calidad de CCO aptos para maduración *in vitro*. También se observó que para ambos grupos existieron tasas similares de maduración *in vitro* entre ovocitos de las categorías I y II.

## SUMMARY

The objective of this research report was to estimate the effect of the previous treatment with FSH over the quality of the recovered complex cumulus-oocyte (CCO) of ovaries in domestic cats. Twenty-one mature cats were assigned randomly between two groups, FSH (n=9) and Control (n=12). The FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>, Vetrapharm Inc.) was administered every 24 hours 5 mg NIH of FSH via subcutaneous for four serial days. The group Control did not receive gonadotrophic stimulus. The ovaries were obtained by means of ovary-hysterectomy that was performed 24 hours after the end of the gonadotrophic treatment. The ovaries were transported in PBS 0,3% at 37°C in a minimal lapse of four hours. The CCO were recovered by means of slicing, and selected according to the integrity of the cytoplasm and of the granulose cells in categories I or excellent and II or good for the groups FSH and Control. The selected CCO were cultivated during 24 hours to 38,5 °C inside a humidified incubator containing 5% CO<sub>2</sub> in air, in medium TCM-199, with 0,4% BSA, 1µL/mL FSH, 1µL/mL LH y 1µg/mL of 17β oestradiol, 50 µg/mL gentamicin, 0.20 mM sodium pyruvate. After *in vitro* maturation, the oocytes were denuded, fixed and stained, then their maturation state was evaluated, considering as mature those in which it was observed the presence of metaphase plate and the expulsion of the first polar body.

A total of 375 and 499 COC were recovered respectively of groups FSH and control. An increase was observed in number and quality of capable CCO for recovered *in vitro* maturation of the group FSH (25.36%) respect to control group (17.03%) (p<0.05). Also, it is significantly higher the number of CCO corresponding to category I in the group FSH, in comparison to the group Control 30,21% y 17,6% respectively (p<0.05). The *in vitro* maturation rate, for the group FSH was of 73.62%, significantly superior to the group Control 49.38% (p<0.05).

The results obtained in this study permit to conclude that obtained oocytes from cats treated with FSH present a higher potential for *in vitro* maturation than oocytes of not treated cats. Also, it is possible to indicate that the previous stimulus increases the number and the quality of capable CCO for *in vitro* maturation. It is also observed that for both groups similar *in vitro* maturation rates exist among oocytes of the categories I and II.

## **1. Antecedentes Generales**

### **1.1. Principales características del ciclo reproductivo en la gata doméstica**

De acuerdo a su clasificación reproductiva la gata doméstica se puede catalogar como una hembra de tipo poliéstrica estacional, que cicla continuamente cada 4 a 30 días si es expuesta a un período constante de 14 horas de luz por día (Johnston y col., 1996; Verstegen, 1998). El proestro es de difícil identificación, ya que la gata muestra signos sutiles que en ocasiones son solamente una conducta afectiva, pero sin permitir el coito, con una duración de tan sólo 12 a 48 horas. (Shille y Sojka, 1995). Durante el estro la gata tiene una conducta receptiva a la cópula. Este estado puede durar entre 2 a 19 días, con un promedio de  $5.8 \pm 3.3$  días (Root y col., 1995). En esta etapa la gata presenta un comportamiento caracterizado por: vocalizaciones frecuentes, roce o frotamiento de cabeza y cuello, lordosis, desviación de la cola. (Shille y Sojka, 1995). Si la fertilización es exitosa la gestación de la gata tiene una duración promedio de 66 días (Root y col., 1995). En el caso contrario la hembra puede experimentar un fenómeno denominado pseudopreñez, que puede durar alrededor de 30 a 40 días. (Feldman y Nelson, 1996). Al momento de la cópula, se induce liberación de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo vía reflejo neuroendocrino, con aumento en la liberación de hormona luteinizante (LH) (Verstegen, 1998).

Se piensa que este aumento induce la ovulación, a pesar de que (Concannon y col., 1980) han demostrado ovulación sin estímulo cervical. La ovulación ocurre entre 48 y 52 horas en promedio después del pico de LH. (Wildt y col., 1981; Schmidt y col., 1983; Shille y col., 1983), siendo la tasa ovulatoria directamente proporcional a la amplitud de la descarga de LH, es decir, una mayor descarga de LH induce una mayor cantidad de ovulaciones (Verstegen, 1998).

## 1.2. Desarrollo y crecimiento folicular en la gata.

El crecimiento de los folículos pre-antrales puede ocurrir sin la presencia de hormonas gonadotróficas; en cambio los folículos antrales son dependientes a la presencia de FSH tanto para su crecimiento como su desarrollo (Roche, 1996).

Durante el período dependiente de gonadotropinas, la FSH cumple un importante rol en la formación del antro y del fluido folicular, además estimula la mitosis de las células de la granulosa, por tanto, el crecimiento y maduración folicular final dependen por completo de FSH y LH (Hafez, 1987; Mc Donald y Pineda, 1989; Shille y Sojka, 1995; Roche, 1996). Además, la FSH provoca sensibilidad en las células de la granulosa a LH por un incremento de sus receptores, lo que induce la luteinización de las células de la granulosa cuando ocurra el pico de LH (Hafez, 1987).

Durante su crecimiento, el ovocito adquiere la capacidad de reiniciar la meiosis en respuesta al estímulo gonadotrófico preovulatorio, desintegrando la envoltura nuclear, eliminando el primer corpúsculo polar y continuando la meiosis hasta la metafase de la segunda división meiótica, etapa en la cual el ovocito queda nuevamente detenido en metafase II (Wassarman, 1994). Aunque Goodrowe y col. (1988) señalan que la capacidad de reanudar la meiosis (*in vitro*) puede ocurrir sin la presencia de hormonas gonadotróficas, estas son necesarias para completar la maduración nuclear. Un ovocito competente es aquel capaz de reanudar el proceso meiótico desde la profase de la primera división meiótica, con una correcta transcripción genética (Thibault y col., 1993).

### **1.3. Uso de gonadotrofinas en gatas para inducción de desarrollo folicular**

Wood y Wildt, (1997) señalan que en cualquier momento dado, en la gata doméstica, aproximadamente un 65% de los CCO están expresando atresia, relacionada con cambios en el citoplasma del ovocito o en las células del cumulus, y ésta ocurre en un alto porcentaje en folículos antrales pequeños (0,5-1,0 mm). Por tanto, el objetivo de usar gonadotrofinas es evitar la atresia de estos folículos y de este modo favorecer que éstos alcancen el estado preovulatorio, esto ha sido descrito en varias especies animales (Mapletoft y Pierson, 1995).

En el año 1935 Foster e Hisaw usaron extracto crudo de pituitaria de cerdo para inducir desarrollo folicular, conducta estral y ovulación en la gata doméstica; sin embargo, el primer uso de gonadotrofina parcialmente purificada para estimular ovulación en gatas fue reportado por Colby (1970).

Con el objetivo de obtener desarrollo folicular se han empleado gonadotrofinas, tales como FSH de origen porcino (FSH-p) (Dresser y col., 1988; Pope y col., 1992; Sánchez y Silva, 2003); humana (huFSH) (Orosz y col., 1992); gonadotrofina menopáusica humana (hMG) (Orosz y col., 1992) y gonadotrofina coriónica equina (eCG) (Niwa y col., 1985; Goodrowe y col., 1988; Johnston y col., 1991; Donoghue y col., 1992; Kanda y col., 1998).

En la gata el número de folículos preovulatorios aumenta de manera considerable al administrar hormonas gonadotróficas y éste aumento es independiente del origen de la hormona (Goodrowe y col., 1988; Donoghue y col., 1992; Orosz y col., 1995; Sánchez y Silva, 2003).

Respecto al número total de ovocitos, Sánchez y Silva, (2003) obtuvieron un aumento significativo en el número de CCO potencialmente aptos para ser madurados *in vitro*, respecto a los obtenidos de gatas no estimuladas gonadotroficamente; señalando además que el aumento del número CCO aptos, se puede asociar directamente al mayor número de folículos disponibles para la aspiración en los ovarios de las gatas tratadas. Además demuestran que no existen diferencias significativas en la vía de administración, subcutánea v/s intramuscular, lo que facilitaría el manejo de los animales y se reduciría el tiempo del tratamiento.

Es importante señalar que una gata adulta durante el proestro temprano se desarrollan alrededor de 3 a 7 folículos primarios de tamaño < 1 mm. (Foster e Hisaw, 1935; Feldman y Nelson, 1996); y durante un estro normal se pueden encontrar entre 2 a 8 folículos preovulatorios (Shille y Sojka, 1979).

## **2. Hipótesis**

?? Ovocitos obtenidos de gatas tratadas con FSH presentan un mayor potencial de maduración *in vitro* que ovocitos de gatas no tratadas.

## **3. Objetivo general**

?? Evaluar la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de gatas tratadas con FSH.

## **4. Objetivos específicos**

?? Evaluar la tasa de recuperación y calidad de complejos cumulus-ovocito en gatas tratadas previamente con hormona folículo estimulante.

?? Realizar maduración *in vitro* en ovocitos recuperados de gatas estimuladas con FSH

## 5. Material y Métodos

Se utilizaron 21 gatas adultas, de edad entre 6 meses y 6 años, clínicamente sanas, de entre 2.0 y 3.5 kilos de peso, las cuales fueron destinadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

?? Grupo **(FSH)** con estímulo gonadotrófico (n = 9): la administración fue cada 24 horas de 5 mg NIH de FSH (Folltropin-V®. Vetrapharm Inc.) 0.25 mL. vía subcutánea durante 4 días.

?? Grupo **(Control)** sin estímulo gonadotrófico (n = 12), cada 24 horas se les aplicó 1mL. de suero fisiológico vía subcutánea por 4 días.

Las gatas fueron anestesiadas utilizando una asociación de Ketamina 20 mg/kg. (Ketostop ® Drag pharma.) y Xilacina 2 mg/kg (Rompum® Bayer). Las ovariectomías fueron realizadas en distintas clínicas veterinarias localizadas en la ciudad de Temuco, veinticuatro horas después del término del tratamiento gonadotrófico y de la última inyección de suero fisiológico para los grupos FSH y Control, respectivamente.

### 5.1. Obtención de los Ovarios.

Inmediatamente después de la Ovariectomía, los ovarios fueron depositados en un tubo de ensayo con una solución compuesta por 9 gr de NaCl, 0.08 gr. de Penicilina sódica, 0.1 gr. de estreptomina en un litro de agua destilada, a una temperatura de 37°C aproximadamente, luego fueron transportados al Laboratorio de

Reproducción Animal de la Universidad Católica de Temuco, en un tiempo no superior a las 4 horas post cirugía.

Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados con una solución de igual composición a la utilizada para el transporte de los ovarios, a una temperatura de 37°C aproximadamente.

## **5.2. Recuperación de los ovocitos.**

Una vez lavados los ovarios, los CCO fueron obtenidos mediante finos cortes transversales de los ovarios ("slicing"), mediante una hoja de bisturí sobre una placa petri 60 mm de diámetro, con Fosfato Buffer Salino (PBS) al 0,3% (en 100 ml de PBS se agregan 300 mg de BSA) temperado a 37 °C aproximadamente.

El medio resultante posteriormente del fino corte de los ovarios fue observado bajo lupa estereoscópica (Nikon, SMZ-2B, Tokio Japón) a un aumento de 20X sobre una platina temperada a 38 °C, para realizar la recuperación y evaluación de los ovocitos. Los CCO con citoplasma finamente granular y completamente rodeado por una corona radiada y células del *cumulus oophorus*, se utilizaron para el estudio, como lo describen Goodrowe y col., (1988) y Johnston y col., (1989).

## **5.3. Criterio de clasificación de los ovocitos**

El criterio de clasificación para la selección de CCO recuperados de ovarios de gata fue basado en lo descrito por Wood y col. (1997), quienes clasificaron los CCO en cuatro distintos grados: Categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme, núcleo redondo, con 5 o más capas compactas de *cumulus oophorus*; ovocitos Categoría

II (buenos): presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero rodeado por menos de 5 capas de *cumulus oophorus*; ovocitos categoría III (regulares): presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del *cumulus oophorus* presentes son menos compactas; ovocitos categoría IV (malos): presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del *cumulus oophorus* se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad. El ovocito de la gata doméstica es de apariencia oscura debido a una alta concentración intracelular de lípidos (Guraya y col.,1965). Por tanto, de acuerdo a esta clasificación los ovocitos fueron categorizados como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la maduración *in vitro*.

#### **5.4. Lavado de ovocitos.**

Los ovocitos antes seleccionados como aptos (categorías I y II), fueron transferidos en un volumen mínimo de PBS, a una placa Falcon 1008 con medio de MIV, este lavado se realizó 2 veces.

#### **5.5. Preparación del medio de maduración.**

El medio de maduración fue compuesto de la siguiente manera: TCM-199, 0,4% BSA (4 mg de BSA por cada 1mL de TCM-199), 1 $\mu$ L/mL FSH, 1 $\mu$ L/mL LH, 50  $\mu$ g/mL gentamicina, 0.20 mM de piruvato. Luego fue sometido a una filtrado (0.2  $\mu$ M.) para finalmente ser depositado en un matraz de 50 mL. Una vez terminado este proceso se agregó 1 $\mu$ g/mL de 17- $\beta$  estradiol.

## 5.6. Maduración *in vitro* de ovocitos de gata.

Los ovocitos seleccionados de ambos tratamientos fueron destinados a un medio de maduración estándar, claramente rotulados, separados en dos grupos:

?? **Grupo 1 (FSH):** Maduración de ovocitos de gatas tratadas con FSH

?? **Grupo 2 (Control):** Maduración de ovocitos de gatas sin tratamiento.

Para ambos grupos el medio de maduración fué dispensado en gotas de 25  $\mu$ l e inmersas en parafina líquida. Se depositaron 5 ovocitos por gota de medio de maduración aproximadamente. El período de maduración fué de 24 horas, a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, en ambiente saturado de humedad

## 5.7. Fijado, tinción y decoloración de los ovocitos post maduración.

Completado el período de maduración, los ovocitos fueron extraídos de las gotas de cultivo por medio de una pipeta, y depositados en una placa petri con PBS. Enseguida se procedió a remover mediante agitación mecánica las células del *cumulus oophorus*. Una vez removidas, los ovocitos fueron montados en una gota sobre un porta-objetos. Luego se retiró la mayor cantidad de gota, para cubrirla con un cubre-objeto el cual contenía parafina sólida en sus cuatro esquinas, con el objetivo de evitar directa presión sobre los ovocitos. La presión necesaria para inmovilizar los ovocitos se determinó por la formación de un halo alrededor de cada ovocitos y por una leve expansión citoplasmática al momento de ejercer presión.

Enseguida los ovocitos fueron fijados por medio de una solución etanol: ácido acético (3:1), aplicada suavemente por capilaridad, y mantenida durante 24 horas en el

interior de una placa petri (90 mm). Después de 24 horas, se retiró el medio de fijación por capilaridad, con la ayuda de trozos de papel absorbente. Para evaluar el estado de maduración celular en que se encontraban los ovocitos, se utilizó una tinción de orceína al 1% por 30 minutos. Pasados los 30 minutos se procedió a aclarar los ovocitos mediante la solución decolorante la cual elimina el exceso de orceína, permitiendo distinguir en mejor forma la conformación y distribución de los cromosomas, así como también la localización del corpúsculo polar. Luego, se extrajo el líquido decolorante dejando limpia y seca la muestra fijada. Posterior a esto se procedió a sellar los bordes del cubre objeto.

### **5.8. Evaluación de la maduración nuclear.**

La evaluación de la maduración nuclear se realizó por medio de un microscopio a un aumento de 40X. El criterio para evaluar la maduración nuclear fue la siguiente:

1. **Maduros** : caracterizado por la formación de la placa metafásica y expulsión del primer cuerpo polar
2. **Inmaduros**: caracterizado por estadios avanzados posterior a la reanudación de la meiosis, sin alcanzar Metafase II.
3. **Degenerados**: fragmentados o distintamente irregular en su forma fueron clasificados como degenerados.

### **6. Análisis estadístico**

#### **Parámetros a evaluar:**

?? Número y calidad de ovocitos aptos para maduración *in vitro*, Tasa de maduración de ovocitos

#### **Método a utilizar**

?? El Análisis estadístico se realizara por medio de la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), con un 95% de confianza ( $p > 0.05$ ).

## 7. Resultados

### 7.1 Recuperación y clasificación de ovocitos de gatas.

Se logró recuperar un promedio por gata de  $41,66 \pm 6.2$  y  $41,58 \pm 9.9$  CCO del grupo FSH y control, respectivamente. Existe un mayor número promedio de CCO recuperados y clasificados como aptos para maduración *in vitro* en aquellas gatas que fueron previamente estimuladas con FSH ( $10.6 \pm 3.6$ ) en comparación al grupo control ( $7.08 \pm 2.8$ ) ( $p < 0.05$ ).

De la cantidad total de CCO recuperados y clasificados como aptos para la maduración *in vitro*, se recuperó el 30.21 % correspondientes a categoría I en el grupo de gatas estimuladas con FSH, mientras que en el grupo Control el porcentaje de recuperación sólo alcanzó al 17.65 % ( $p < 0.05$ ). Respecto a la categoría II, en el grupo de gatas estimuladas con FSH se obtuvo un 69,08% y en el grupo control 82,35 % ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 1 y Figura 1). Los CCO recuperados y categorizados según la integridad del *cumulus oophorus* y la apariencia del citoplasma se presentan en la Figura 2.

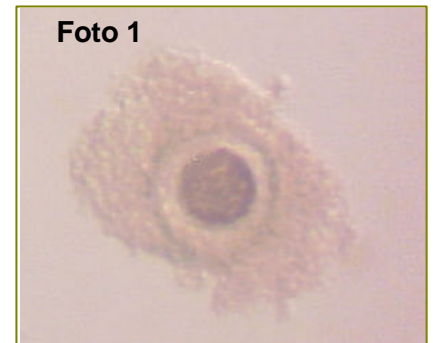
**Cuadro 1. Recuperación y clasificación de complejos cumulus-ovocito obtenidos de ovarios de gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH).**

Grupo Tratamiento	N° CCO Recuperados	Complejos cumulus-ovocito aptos para maduración <i>in vitro</i>		
		% CCO seleccionados (n)	Categoría I	Categoría II
FSH	375	25,6 % <sup>a</sup> (96)	30,2 % <sup>a</sup> (29/96)	69,8 % <sup>a</sup> (67/96)
Control	499	17,0 % <sup>b</sup> (85)	17,6 % <sup>b</sup> (15/85)	82,4 % <sup>b</sup> (70/85)

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>: letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

**Figura 1. Categorías de complejos cumulus-ovocito recuperados de ovarios de gatas, de acuerdo a la integridad en células del cumulus oophorus y apariencia del citoplasma.**

**Foto 1:** CCO de gata apto para maduración *in vitro*, correspondiente a la categoría I o excelente, posee un citoplasma uniformemente oscuro, núcleo esférico, corona radiada intacta y está rodeado por 5 o más capas de células del *cumulus oophorus*



**Foto 2:** CCO de gata apto para maduración *in vitro*, correspondiente a la categoría II o bueno, este posee un citoplasma uniforme oscuro, núcleo esférico, corona radiada intacta y esta rodeado completamente por menos de 5 capas de células del *cumulus oophorus*.



**Fotos 3, 4, 5 y 6:** CCO de gata no aptos para maduración *in vitro*.

**Fotos 3 y 4** Muestran ovocitos con citoplasma fragmentado, translucido y células del *cumulus oophorus* no compactas. **Fotos 5 y 6** Muestran ovocitos desnudos, con citoplasma fragmentado y presencia de vacuolas.

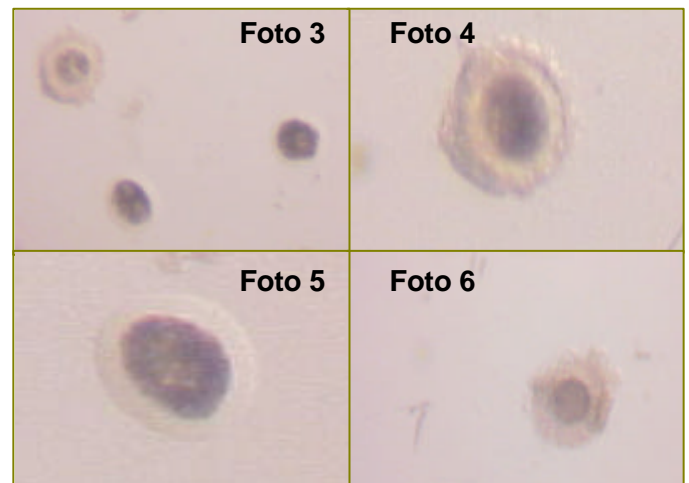
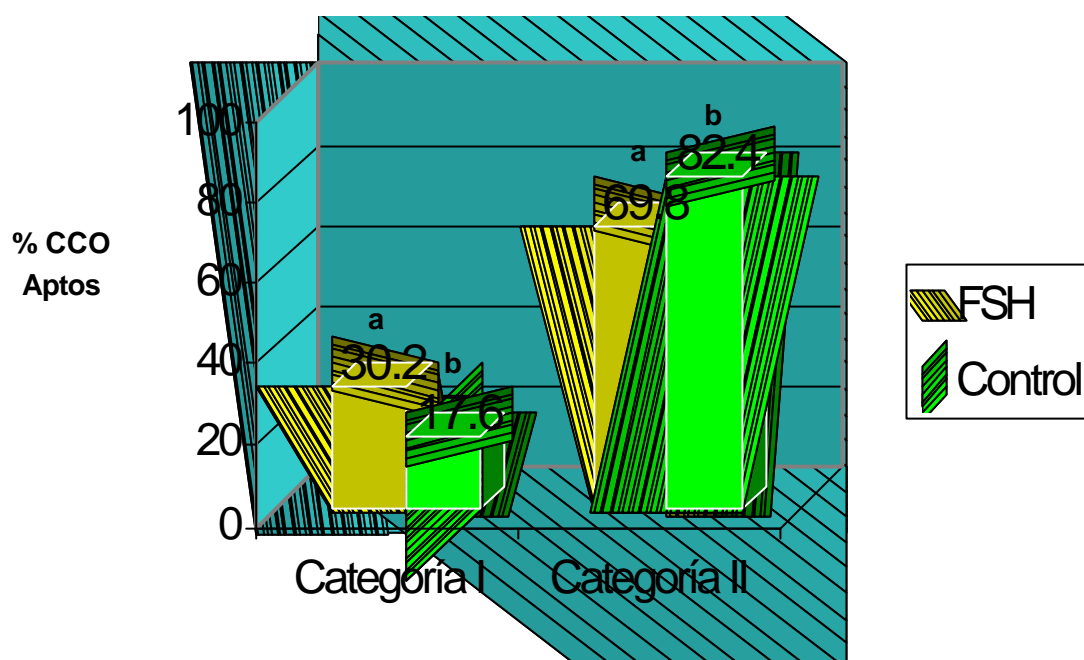


Figura 2. Porcentajes de CCO aptos para maduración *in vitro* recuperados de gatas de los grupos FSH y Control, según las categorías I y II.



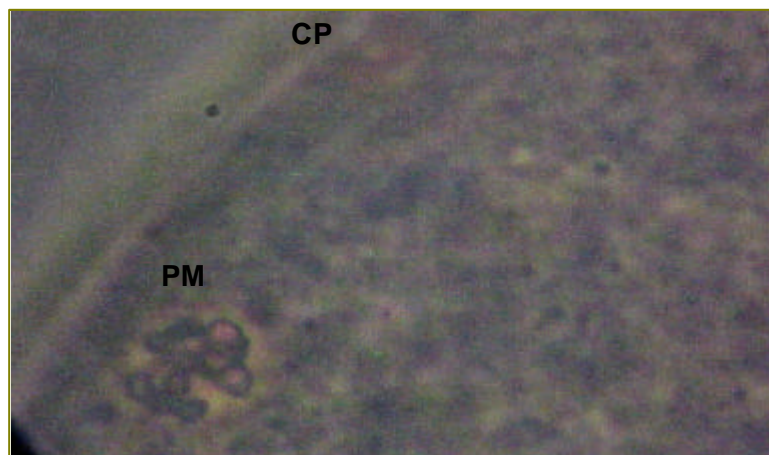
a, b: Letras distintas en una misma categoría indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## 7.2 Maduración *in vitro* de ovocitos de gata

De un total de 181 CCO cultivados, 9 (4,97%) se perdieron durante el desarrollo de las técnicas de lavado, eliminación de células del *cumulus* y fijación. En el grupo de gatas previamente estimuladas con FSH fue evaluado un total de 91 ovocitos, de los cuales 67 (73,62%) se clasifican en metafase II; 15 (16,48%) son inmaduros y 9 (9,89%) degenerados. Respecto a las gatas control, de 81 ovocitos evaluados, un total de 40 (49,38%) alcanzan la metafase II; 25 (30,86%) inmaduros y 16 (19,75%) degenerados. En la Figura 3 se puede observar un ovocito de gata en estado de metafase II, caracterizado por la placa metafásica y expulsión del primer cuerpo polar.

En el Cuadro 2 se puede observar una mayor tasa de maduración *in vitro* para los ovocitos obtenidos de ovarios de gatas estimuladas con FSH en comparación al grupo Control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observó diferencia significativa entre las proporciones de ovocitos inmaduros y degenerados, tanto para el grupo FSH como para el grupo Control ( $p > 0.05$ ). Además, no existieron diferencias significativa entre las tasas maduración *in vitro* para las categorías I y II, tanto para el grupo FSH como para el grupo Control ( $p > 0.05$ ) (Figura 4).

**Figura 3. Ovocito de gata en estado de metafase II, caracterizado por la formación de la placa metafásica (PM) y expulsión del primer cuerpo polar (CP).**



**Cuadro 2. Estados de maduración *in vitro* de ovocitos de gata previamente estimuladas con FSH y no tratadas.**

Grupo tratamiento	% Maduros	No Maduros		
		% Inmaduros	% Degenerados	Total No Maduros
Grupo FSH	73,62 <sup>a</sup> % (67/91)	16,48 % (15/91)	9,89 % (9/91)	26,38 <sup>a</sup> % (24/91)
Grupo Control	49,38 <sup>b</sup> % (40/81)	30,86 % (25/81)	19,75 % (16/81)	50,62 <sup>b</sup> % (41/81)

a, b: letras distintas en la misma columna significa diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### 7.2.1 Tasa de maduración ovocitos categoría I

En el grupo de gatas tratadas con FSH se evaluó un total de 28 ovocitos de los cuales 24 (85.71 %), alcanzan la metafase II; en el grupo control de un total de 15 ovocitos evaluados, 8 (53.33 %) lograron la metafase II. Por tanto, la tasa de maduración *in vitro* para ovocitos procedentes de CCO de la categoría I de gatas estimuladas con FSH es significativamente mayor a CCO categoría I provenientes del grupo control ( $p < 0.05$ ). (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tasa de Maduración *in vitro* de ovocitos categoría I o excelentes recuperados de ovarios de gatas estimuladas con FSH.**

Grupo tratamiento	% Metafase II	% No Metafase II
FSH	85,71 % <sup>a</sup> (24/28)	14,29 % <sup>a</sup> (6/28)
Control	53,33 % <sup>b</sup> (8/15)	46,67 % <sup>b</sup> (7/15)

<sup>a, b</sup>: letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### 7.2.2 Tasa de maduración ovocitos categoría II.

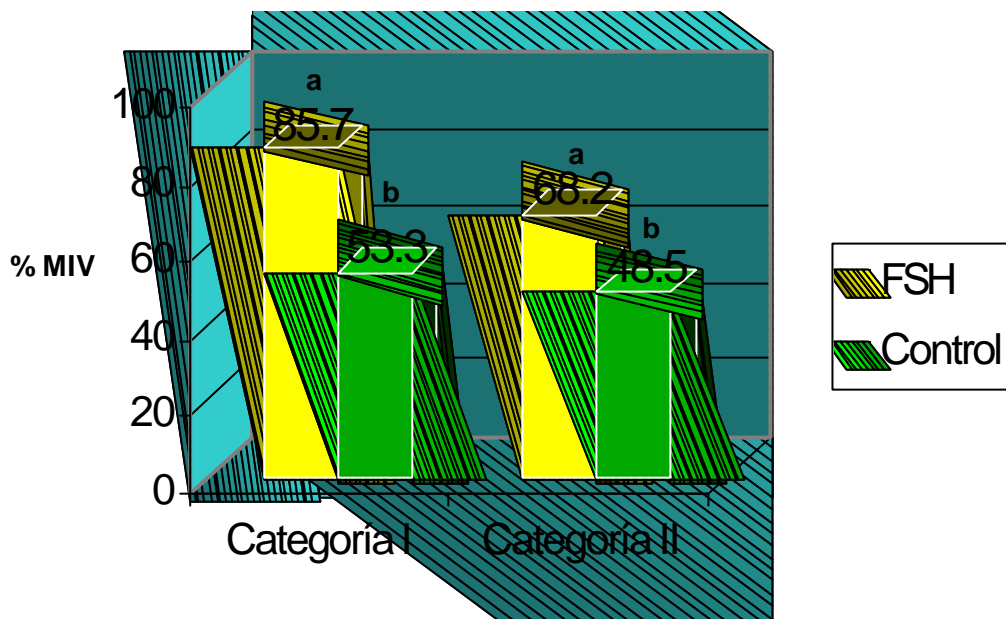
Un total de 63 ovocitos fue evaluado en el grupo de gatas previamente estimuladas con FSH, de los cuales 43 (68.25%), alcanzan la metafase II; en el grupo control de un total de 66 ovocitos evaluados, 32 (48.48%) logran la metafase II. Lo anterior indica que la tasa de maduración *in vitro* para ovocitos procedentes de CCO de categoría II del grupo tratado con FSH fue significativamente mayor a CCO de la categoría II del grupo control ( $p < 0.05$ ). (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Tasa de Maduración *in vitro* de ovocitos categoría II o Buenos recuperados de ovarios de gatas estimuladas con FSH.**

Grupo tratamiento	% Metafase II	% No Metafase II
Grupo FSH	68,25 % <sup>a</sup> (43/63)	31,71 % <sup>a</sup> (20/63)
Grupo Control	48,48 % <sup>b</sup> (32/66)	51,52 % <sup>b</sup> (34/66)

<sup>a, b</sup>: letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Figura 4. Porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos de gatas de los grupos FSH y Control, según las categorías I o “excelentes” y categoría II o “buenos”.



<sup>a, b</sup>: Letras distintas en una misma categoría indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## 8. Discusión

### 8.1 Tasa de Recuperación.

En general existe escasa información sobre maduración *in vitro*, ya que la mayoría de los estudios en técnicas de reproducción asistida realizan maduración *in vivo* (Dresser y col., 1987; Goodrowe y col., 1988; Pope y col., 1993; Pope y col. 1994; Crichton y col. 2003), esto debido a que se logran mejores resultados de fertilización y desarrollo embrionario, en contraste a la maduración *in vitro* (Wood y col., 1995). Debido a lo anterior, resulta insuficiente la información acerca de la cantidad y calidad de CCO aptos que se pueden obtener para maduración *in vitro*. Sin embargo creemos necesario el desarrollo de la técnica de maduración *in vitro*, como una alternativa para el rescate de material genético en casos de necesaria ovariectomía.

El número promedio de CCO aptos para MIV recuperados en ovarios de gatas del grupo FSH encontrado en este estudio ( $10,6 \pm 3.6$ ) resulta levemente superior a lo reportado por Sánchez y Silva, (2003), quienes logran recuperar un promedio de  $9,0 \pm 3.0$  CCO, bajo el mismo protocolo de estimulación que el presente estudio; esta diferencia se puede atribuir a que estos autores recuperan los CCO en ovarios de gatas mediante la técnica de aspiración folicular, lo cual es menos eficiente comparado con el desmenuzamiento o slicing.

A pesar de que en el presente estudio no se contabilizó la población folicular, Sánchez y Silva (2003) señalan que el aumento significativo de CCO aptos para maduración *in vitro* sería debido a un mayor número de folículos preovulatorios

disponibles; esto mismo se ha descrito en felinos salvajes (Goodrowe y col. 1989, Donoghue y col. 1990, Pope y col.,1999).

Respecto al aumento de CCO aptos para maduración *in vitro* en el grupo de gatas que fueron estimuladas con FSH, se pudo recuperar un mayor número promedio de CCO correspondientes a la categoría I por gata, en comparación al grupo control ( $p < 0.05$ ). Este resultado es similar obtenido por Goodhand y col. (1998), quienes al estimular vacas con FSH obtienen un mayor número de ovocitos categoría I ( $2,8 \pm 0.4$ ), respecto a los animales no estimulados ( $1,6 \pm 0.4$ ) ( $p < 0.05$ ).

Este aumento significativo de CCO de categoría I o excelentes en la gata, obedece a que al estimular con FSH se observa un aumento significativo en el número de folículos mayores a 2 mm de diámetro; considerando que la mayoría de los CCO de categoría I son originados de folículos mayores a 2 mm de diámetro (Orosz y col., 1992; Wood y Wildt, 1997; Sánchez y Silva, 2003).

De acuerdo a lo anterior podemos deducir que el estímulo con FSH al aumentar la cantidad de folículos preovulatorios permite un aumento en la proporción de ovocitos aptos para MIV, y esto a su vez permite un aumento en la proporción de ovocitos categoría I o excelentes por gata, y por ende una disminución en la proporción de ovocitos categoría II, en comparación al grupo control.

## **8.2 Tasa de maduración *in vitro***

El presente estudio demuestra que existe una mayor tasa de maduración *in vitro* en ovocitos obtenidos de ovarios de gatas previamente estimuladas con FSH, comparado con el grupo control, (73.62% v/s 49.38%). En la literatura resultan escasos los resultados de maduración *in vitro* en gatas estimuladas con FSH. Pope y col. (2000) al estimular con FSH, logran una tasa de maduración *in vitro* de 59.2%, valor inferior a la tasa alcanzada en este estudio en el grupo estimulado con FSH pero superior al grupo control, destacando que en el mismo estudio alcanza una tasa de maduración *in vivo* similar a la tasa de maduración *in vitro* del presente estudio.

En varias especies se ha demostrado que existe una relación positiva entre mayor tamaño folicular en hembras previamente estimuladas gonadotroficamente y mejor competencia meiótica. Investigaciones realizadas en primates (Adachi y col., 1982; Tsuji y col., 1985; Lefevre y col., 1989; Schramm y Bavister, 1995), roedores (Iwamatsu y Yanagimachi, 1975; Mattson y Albertini, 1989, y Cerdos (Tsafiriri y Channing, 1975; Motlik y Fulka, 1986) señalan que la adquisición de la competencia del ovocito que ocurre en folículos de mayor diámetro, se asocia con la condensación de la cromatina alrededor del nucleolo, comúnmente llamado encapsulamiento nucleolar (Schramm y col., 1993). Pope y col., (1997) señalan que la competencia meiótica depende de la calidad del ovocito. Confirmando lo anterior Wood y Wildt, (1997) señalan que existe una baja competencia meiótica en ovocitos con citoplasma fragmentado o traslucido.

Al comparar las tasas de maduración *in vitro* entre ovocitos de una misma categoría, se puede apreciar que existió una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), dando como resultado una mayor tasa de maduración *in vitro* en ovocitos procedentes de gatas estimuladas con FSH. Por lo tanto, se puede deducir que el estímulo gonadotrófico con FSH permite obtener ovocitos con una mayor capacidad de reiniciar la meiosis, y debido a esto, mejoraría sustancialmente la tasa de maduración *in vitro* en ovocitos de gata previamente estimuladas con FSH, en comparación al grupo control.

Wood y Wildt, (1997) afirman que existe una mayor tasa de maduración *in vitro* en los ovocitos provenientes de CCO correspondientes a la categoría I, por sobre la categoría II ( $p < 0.05$ ), de acuerdo a lo señalado anteriormente se podría deducir que los ovocitos derivados de los CCO categoría I, tendrían una mayor capacidad de reiniciar la meiosis o “competencia del ovocito”, por sobre los ovocitos originados de CCO categoría II, y eso nos llevaría a pensar que se podría atribuir la mayor tasa de maduración *in vitro* del grupo FSH, a causa de haber recuperado y cultivado una mayor proporción de ovocitos originados de complejos cumulus ovocitos I o excelentes, en comparación al grupo control. Según lo observado en este estudio, descartamos la posibilidad de obtener una mayor tasa de MIV a causa de tener una mayor proporción de CCO categoría I, debido a que no existen diferencias significativas entre las distintas categorías en un mismo tratamiento ( $p > 0.05$ ), por lo tanto, es probable que la maduración *in vitro* del ovocito de gata no sea afectada por la cantidad de células del cumulus que la rodean, esto debido a no encontrar diferencias significativas entre las categorías I y II para ambos grupos de gatas.

## 9. Conclusiones

?? Ovocitos obtenidos de gatas tratadas con hormona folículo estimulante presentan un mayor potencial de maduración *in vitro* que ovocitos de gatas no tratadas

?? Es posible recuperar en ovarios de gatas previamente estimuladas con FSH un mayor número y calidad de CCO aptos para Maduración *in vitro*.

**Anexo 1.**

**Planilla de Registro.**

<b>Grupo control</b>
<b>Grupo FSH</b>

**Datos Paciente**

<b>Nombre</b>
<b>Edad</b>
<b>Peso</b>

<b>Ex. Clínico</b>
<b>Observaciones:</b>

**Exámen clínico Reproductivo**

<b>Celo (Cuando, duración):</b>	
<b>Ha estado preñada:</b>	
<b>Descarga vaginal:</b>	
<b>Abortos:</b>	

<b>Observaciones:</b>
-----------------------

<b>Fecha</b>	. / /
<b>Hora extracción ovarios</b>	
<b>Hora inicio maduración</b>	

### Morfología de los ovarios

<b>Tamaño</b>	<b>Aspecto</b>
<b>Cuerpos Luteos</b>	<b>Cuerpos hemorrágicos</b>
<b>Observaciones:</b>	

<b>Placa Recuperados</b>			
<b>Morfología Ovocito</b>	<b>Cantidad</b>		
<b>Inmaduros</b>			
<b>Ovocitos categoría *</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III IV</b>
<b>Degenerados</b>			
<b>Nº de ovocitos totales aptos para MIV</b>			
<b>Total</b>			
<b>Tasa de recuperación de ovocitos</b>	<b>/</b>		

\* Según Wood y col. 1997.

<b>Evaluación maduración</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Inmaduros</b>	
<b>Metafase II</b>	
<b>Degenerados</b>	
<b>Nº ovocitos para fijación</b>	

Fecha

<b>Fijación ovocitos</b>	
<b>Hora inicio fijación</b>	
<b>Hora termino fijación</b>	

Fecha

<b>Tinción y decoloración ovocitos</b>	
<b>Hora inicio tinción</b>	
<b>Hora inicio decoloración</b>	

	<b>Inmaduros</b>	<b>Metafase II</b>	<b>Degenerados</b>	<b>Total</b>
<b>Ovocitos (cantidad)</b>				

**Anexo 2.**

**Análisis chi-cuadrado de las frecuencias observadas y esperadas de la recuperación de complejos cumulus-ovocito en gatas estimuladas con FSH y control.**

Grupo tratamiento	Aptos	No Aptos	Total
Grupo FSH	96 (78)	279 (297)	375
Grupo control	85 (103)	414 (396)	499
Total	181	693	874

( ) Valores esperados

$$X^2 = 9.2 > 3.841$$

**Anexo 3.**

**Análisis chi-cuadrado de las frecuencias observadas y esperadas de la recuperación de CCO aptos para maduración *in vitro* (I y II) en gatas estimuladas con FSH y control.**

Grupo tratamiento	Categoría I	Categoría II	Total
Grupo FSH	29 (23)	67 (73)	85
Grupo control	15 (21)	70 (64)	96
Total	44	137	181

( ) Valores esperados.

$$X = 4.33 > 3.841$$

**Anexo 4.**

**Análisis chi-cuadrado de la proporción de ovocitos en metafase II obtenidos de gatas estimuladas previamente con hormona folículo estimulante (FSH)**

<b>Grupo tratamiento</b>	<b>Metafase II</b>	<b>No Metafase II</b>	<b>Total</b>
<b>Grupo FSH</b>	<b>67(57)</b>	<b>24(34)</b>	<b>91</b>
<b>Grupo control</b>	<b>40(50)</b>	<b>41(31)</b>	<b>81</b>
<b>Total</b>	<b>107</b>	<b>65</b>	<b>172</b>

**() Valores esperados.**

$$X= 9.92 > 3.841$$

**Anexo 5**

**Análisis chi-cuadrado de las tasas de maduración in vitro en la categoría I entre los grupos FSH y Control.**

<b>Complejos cumulus ovocito categoría I</b>	<b>Metafase II</b>	<b>No Metafase II</b>	<b>Total</b>
<b>Grupo FSH</b>	<b>24 (21)</b>	<b>4 (7)</b>	<b>28</b>
<b>Grupo control</b>	<b>8 (11)</b>	<b>7 (4)</b>	<b>15</b>
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>11</b>	<b>43</b>

**() Valores esperados**

$$X= 4.78 > 3.841$$

## Anexo 6

Análisis chi-cuadrado de las tasas de maduración *in vitro* en la categoría II entre los grupos FSH y Control.

Complejos cumulus ovocito categoría II	Metafase II	No Metafase II	Total
Grupo FSH	43 (37)	20 (26)	63
Grupo control	32 (38)	34 (28)	66
Total	75	54	129

() Valores esperados

$$X = 4.59 > 3.841$$

## Anexo 7

Análisis chi-cuadrado entre las tasas de maduración *in vitro* de complejos cumulus ovocito I y II en el grupo FSH.

Grupo FSH	Metafase II	No Metafase II	Total
CCO I	24 (21)	4 (7)	28
CCO II	43 (46)	20 (17)	63
Total	67	24	91

() Valores esperados

$$X = 2.43 < 3.841$$

## Anexo 8

Análisis chi-cuadrado entre las tasas de maduración *in vitro* de complejos cumulus ovocito I y II en el grupo control.

Grupo Control	Metafase II	No Metafase II	Total
CCO I	8 (7)	7 (8)	15
CCO II	32 (33)	34 (33)	66
Total	40	41	81

() Valores esperados

$$X = 0.32 < 3.841$$

**Anexo 9.**

**Datos brutos de CCO recuperados, seleccionados de ovarios de gatas estimuladas con FSH, y evaluados posterior a las 24 horas de maduración *in vitro*.**

	<b>Grupo FSH</b>	<b>Grupo Control</b>
<b>N° de gatas</b>	<b>9</b>	<b>12</b>
<b>CCO recuperados y seleccionados.</b>		
<b>CCO categoría I</b>	<b>29</b>	<b>15</b>
<b>CCO categoría II</b>	<b>67</b>	<b>70</b>
<b>Total CCO aptos</b>	<b>96</b>	<b>85</b>
<b>Total CCO no aptos (categorías III y IV)</b>	<b>279</b>	<b>414</b>
<b>Total CCO recuperados</b>	<b>375</b>	<b>499</b>
<b>Ovocitos evaluados posterior a las 24 hrs de MIV.</b>		
<b>Total Ovocitos en metafase II</b>	<b>67</b>	<b>40</b>
<b>Inmaduros</b>	<b>15</b>	<b>25</b>
<b>Degenerados</b>	<b>9</b>	<b>16</b>
<b>Total Ovocitos evaluados</b>	<b>91</b>	<b>81</b>

## Bibliografía

ADACHI, M., M. YOKOYAMA, Y. TANIOKA,. 1982. Culture of marmoset ovarian oocytes *in vitro*. *Jpn J. Anim. Reprod.*, 28: 51–55.

COLBY, E.D. 1970. Induced estrus and timed pregnancies in cats. *Lab. Anim. Care.*, 20: 1075-1080.

CONCANNON, P.W., B. HODGSON, D. LEIN.1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulation. *Biol. Reprod.*, 23: 111-117.

CRICHTON, E. G., C.E. POPE, N. M. LOSKUTOFF. 2002. Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). *Biol. Reprod.*, 68: 105-113.

DONOGHUE, A., L. JOHNSTON, U. SEAL, R.TILSON, P. WOLF, D. WILDT. 1990. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.* 46: 733 - 744.

DONOGHUE, A., L. JOHNSTON, L.. MUNSON, J. BROWN, D. WILDT. 1992. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol. Reprod.*, 46: 972-980.

DRESSER, B., C. S. SEHLHORST, K. B.WACHS, G. L. KELLER, E.J. GELWICKS y J. L. TURNER. 1987. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat. (*Felis catus*). *Theriogenology* 28: 915-927

DRESSER, B., E. GELWICKS, K. WACHS, G. KELLER. 1988. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *J. Exp. Zool.*, 216: 180- 186.

FELDMAN, E., R. NELSON. 1996. Canine and feline endocrinology and reproduction. W. B. Saunders Co., USA.

FOSTER, M., F. HISAW. 1935. Experimental ovulation and the resulting pseudopregnancy in anoestrous cats. *Anat. Rec.*, 62: 75-93.

GOODHAND, K.L., R.G. WATT, M.E. SATINES, J.S. HUTCHINSON y P.J. BROADBENT. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51: 951-961.

GOODROWE, K., R. WALL, S. O'BRIEN, P. SCHMIDT y D. WILDT. 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 39: 355-372.

GOODROWE, K., WILDT, D., M. C. SCHIEWE, P.M. SCHMIDT, J.G. HOWARD, L.G. PHILLIPS. 1989. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. (Suppl.) *J. Reprod. Fert.*, 39: 73-90.

GOODROWE, K., M. HAY, W. KING. 1991. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 45: 466-470.

GOODROWE, K., G.J. CRAWSHAW, K.G. MEHEREN. 1991. Stimulation of ovarian activity and oocyte recovery in the caracal (*Felis caracal*) and cheetha (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo Wild Med.* 22: 42-48

GURAYA S.S. 1965. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog, *J. Exp. Zool.*, 160: 123-136

HAFEZ, E. 1987. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5° ed. Editorial Interamericana, México.

HOWARD, J. 1998. Assisted reproductive techniques in non domestic carnivores. In: Fowler ME y Miller (ed), *Zoo Wildlife medicine; Current Therapy*, Vol.4 Philadelphia: W.B. Saunders Co.,449-457.

IWAMATSU, T., R. YANAGIMACHI. 1975. Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamster. *J. Reprod. Fertil.* 45: 83-90.

JOHNSTON, L. A., S.J. O'BRIEN y D.E. WILDT. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gam. Res.*, 24: 343-356.

JOHNSTON, L., A. DONOGHUE, S. O'BRIEN, D. WILDT. 1991. Culture medium and protein supplementation influence *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat. *J. Exp. Zool.*, 257: 350-359.

JOHNSTON, S., M. ROOT, P. OLSON. 1996. Ovarian and testicular function in the domestic cats: clinical management of spontaneous reproductive disease. *Animal Reprod. Sci.*, 42: 261-274.

KANDA, M., T. MIYAZAKI, M. KANDA, H. NAKAO, T. TSUTSUI. 1998. Development of *in vitro* fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: Influence of protein supplements and culture dishes on fertilization success and blastocyst formation. *J. Vet. Med. Sci.*, 60: 423-431.

LEFEVRE, B., GOUGEON, A., F. NOME, J. TESTART. 1989. *In vivo* changes in oocyte germinal vesicles related to follicular quality and size at mid-follicular phase during stimulated cycles in the cynomolgus monkey. *Reprod. Nutr. Develop.* 29: 523-532.

MAPLETOFT, R., R. PIERSON, 1995. Recruitment of follicles for superovulation. En relaciones embrio-maternas y biotecnologías reproductivas. Una visión interdisciplinaria. C. Del campo, M. Patiño, M. Del campo (eds). Universidad Austral de Chile.

MATTSON, B.A., D.F. ALBERTINI. 1989. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Molec. Reprod. Devel.* 25: 374-383.

MC DONALD, L., M. PINEDA. 1989. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. 4° ed. Interamericana. México.

MOTLIK, J., J. FULKA. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25: 87-96.

NIWA, K., K. OHARA, Y. HOSOI, A. IRITANI. 1985. Early events of *in-vitro* fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 74: 657- 660.

OROSZ, S., P. MORRIS, M. DOODY, G. NIEMEYER, J. CORTELYOU LEE, N. EATON, C. LOTHROP. 1992. Stimulation of folliculogenesis in domestic cats with human FSH y LH. *Theriogenology*, 37: 993-1004.

POPE C.,E. GELWICKS, G.KELLER, B.DRESSER. 1992. *In vitro* fertilization in the domestic cat: effect of media and culture interval on *in vitro* development and pregnancy rate following transfer. *Theriogenology*, 37: 275.

POPE, C. E., M.A. MC RAE, B.L. PLAIR, G.L. KELLER, D.L.DRESSER 1994. Successful *in vitro* and *in vivo* development of *in vitro* fertilized two-to- four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology*, 42: 513-525.

POPE,C.E., M.A. MC RAE, B.L. PLAIR, G.L. KELLER, D.L.DRESSER. 1997. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fertil. (Supp. 51)*: 69-82

POPE, C. E., R. SCHMID, S. MIKOTA, B. DRESSER, G. PIRIE, K. LAMB, N. LOSKUTOFF. 1999. *In vitro* production of tiger (*Panthera tigris*) embryos after daily gonadotropin treatment and offsite laparoscopic oocyte retrieval. Proceedings of the 7<sup>th</sup> Int Conf on Breeding Endangered Species in Captivity, Cincinnati, OH. 244.

POPE, C.E., M. GOMEZ, R. HARRIS, A. DAVIS, S. MIKOTA, B. DRESSER. 2000. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 423-433.

ROCHE, J 1996. Control and regulation of folliculogenesis – A symposium in perspective. *Rev. Repr.*, 1: 19-27.

ROOT, M., S. JOHNSTON, P. OLSON. 1995. Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cats. *J.A.A.H.A.* 31: 429-433.

SÁNCHEZ A., M. SILVA. 2003. Evaluación de la respuesta ovárica y calidad ovocitaria en gatas tratadas con hormona foliculo estimulante (FSH) y utilizando dos esquemas de administración. *Arch. Med. Vet.*, 35 (1):119-126.

SCHRAMM, R.D., M. T. TENNIER, D. E. BOATMAN, B. D. BAVISTER. 1993 Chromatin configuration and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys. *Biol. Reprod.* 48: 349-356.

SCHRAMM, R.D. y B. D. BAVISTER.1995. Effects of granulosa cells and gonadotrophins upon nuclear and cytoplasmic maturation in vitro of oocytes from nonstimulated rhesus monkeys. *Hum. Reprod.*,10: 887-895.

SCHMIDT, P.M. y col. 1983. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation, and the postpartum estrus. *Biol. Reprod.*, 28 (3): 657-671.

SHILLE, V., K. LUNDSTROM, G. STABENFELDT. 1979. Follicular function in the domestics cat as determined by estradiol – 17  $\beta$  concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol. Reprod.*, 21: 953-963.

SHILLE, V.M. y col. 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *J. Reprod. Fert.*, 69 (1): 29-39.

SHILLE, V., N. SOJKA. 1995. Feline reproduction. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. S. Ettinger, E. Feldman (eds). W. B. Saunders Co. USA.

THIBAUT C. 1993. Reproduction in Mammals and man. Ed. Ellipses. Francia. pp: 315

TSAFIRI, A., C. P. CHANNING. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pigs oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 43: 149-152.

TSUJI, A., M. SOWA, M. NAKANO.1985. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol. Reprod.* 32: 413-417.

VERSTEGEN, J. 1998. Physiology and Endocrinology of Reproduction in Female Cats. In: Manual of Small Animalreproduction and Neonatology. British Small Animal Veterinary Association. United Kingdom: 11- 16.

WASSARMAN, P. 1994. Gamete interaction during mammalian fertilization. *Theriogenology*, 41: 57-66.

WILDT, D. E. y col. 1981. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus induced lileal phase and the estrous period without mating. *Biol. Reprod.*, 25 (1): 15-28

WOOD, T., D. WILDT. 1997. Effect of the quality of the cumulus-ovocito complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and development into blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*,110: 355-360.