

Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona foliculo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración

Evaluation of ovarian response and oocyte quality in domestic cats treated with two administration schemes of follicle stimulating hormone (FSH)

A.E. SANCHEZ ¹, M.V., M.Sc., Dr. (c) Cs. Vet.; M.E. SILVA ², M.V., M.Sc.

¹Becario Conicyt, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

²Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco, Chile.

SUMMARY

The purpose of this work was to study the effects of FSH administration upon follicular and oocyte characteristics of female cats. Two FSH administration schemes were compared and their effects on the number of follicles and good grade oocytes for IVM obtained by follicular puncture was determined. Twenty adult female cats were randomly distributed on 3 experimental groups: Group SC (n=7) received 5 mg/day of FSH for 4 days, subcutaneously; Group IM (n=6) received 2 mg/day of FSH for 5 days, intramuscular and Control Group (n=7) which did not receive any treatment. The ovaries were surgically removed from all female cats and follicles were counted and measured and the oocytes were recovered. Follicles were classified according to their diameter on < 2 mm y ≥ 2 mm (preovulatory). Gonadotrophine treatment increased the total number of follicles and follicles with ≥ 2 mm diameter when compared to control group ($P < 0.05$), regardless the FSH administration schemes. The FSH treatment also increased the total number of oocytes recovered and number of good grade oocytes for IVM when compared to control group ($P < 0.05$), regardless FSH administration schemes total recovery rates for oocytes and good grade oocytes were higher ($P < 0.05$) for follicles ≥ 2 mm than for follicles with < 2 mm diameter. It can be concluded that intramuscular or subcutaneous administration of FSH in the female cat increases the number of preovulatory follicles and also the number of good grade oocytes obtained. Moreover, the subcutaneous administration of FSH, proposed in this work, enable an easy and faster handling of animals during treatment.

Palabras claves: gata, ovocito, hormona foliculo estimulante.

Key words: cat, oocyte, follicle stimulating hormone.

INTRODUCCION

En años recientes se ha podido observar un aumento importante en la cantidad de trabajos sobre biotecnología reproductiva en felinos. En la mayoría de estos estudios se ha utilizado a la

gata doméstica (*Felis catus*) como modelo experimental. Cabe destacar que el principal propósito de este tipo de investigación ha sido generar información con potencial aplicación a la reproducción de felinos silvestres en peligro de extinción (Farstad, 2000; Luvoni, 2000).

En diferentes laboratorios, a través del mundo, se ha descrito la maduración *in vitro* (MIV) y fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos

de gata (Johnston y col., 1991; Goodrowe y col., 1991; Roth y col., 1994; Wolfe y Wildt, 1996; Luvoni, 2000). Además, se ha reportado el nacimiento de crías vivas posterior a la FIV de ovocitos madurados *in vivo* (Goodrowe y col., 1988); el nacimiento de crías vivas luego de transferir embriones de 4 y 5 días de cultivo, producidos al madurar y fecundar *in vivo* ovocitos de gata (Pope y col., 1992), y también se ha informado de preñez en gatas mediante la transferencia de embriones producidos por inyección intracitoplasmática de espermatozoides a ovocitos madurados *in vitro* (Gómez y col., 2000; Bogliolo y col., 2001). No obstante los promisorios resultados alcanzados en MIV/FIV de ovocitos de gata, han sido inferiores a los reportados en ratas (Eppig y col., 1992) y vacas (Gordon, 1994; Trounson y col., 1994). Según Wood y col. (1997), este menor porcentaje de éxito podría explicarse ya que la gata, al ser una hembra de ovulación inducida, durante el ciclo estral presenta altos porcentajes de complejos *cumulus* – ovocitos (CCO) experimentando cambios relacionados con atresia folicular.

Wood y Wildt (1997) basándose en una detallada caracterización de los eventos relacionados con la atresia normal de CCO, diseñaron una escala de clasificación de ovocitos de gata, considerando las características morfológicas del ovoplasma y de las células del *cumulus oophorus*.

En felinos se ha demostrado que la calidad del CCO tiene una implicancia directa sobre el potencial de maduración de los mismos, siendo, por tanto, sugerido el clasificar y seleccionar los ovocitos destinados a la MIV, utilizando preferentemente aquellos que presentan ovoplasma homogéneo y varias capas compactas de células del *cumulus* (Lengwinat y col., 1992; Wood y Wildt, 1997).

Durante el ciclo sexual de la gata, el crecimiento folicular coincide con el comienzo del proestro, los folículos aumentan su diámetro desde menos de 1 mm en el proestro temprano a 1.5 mm en el comienzo del estro, alcanzando un diámetro igual o superior a 2 mm en su estado preovulatorio (Wildt y Seager, 1980; Goodrowe y col., 1988; Shille y Sojka, 1995). Según Shille

y Sojka (1995), el desarrollo folicular durante el ciclo estral es dependiente de un incremento en los niveles séricos de la hormona folículo estimulante (FSH).

Los folículos antrales inicialmente se hacen receptivos a la FSH para luego llegar a ser dependientes de esta hormona y así llevar a cabo su desarrollo. La FSH tiene una función importante en el inicio de la formación del antro al estimular la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular (Roche, 1996). El rol de la FSH en la foliculogénesis de la gata ha sido descrito por Orosz y col. (1992).

El uso de gonadotrofinas con el objeto de evitar la atresia de los folículos y de este modo favorecer que éstos alcancen el estado preovulatorio, ha sido estudiado en varias especies animales (Mapletoft y Pierson, 1995). Para la inducción de desarrollo folicular en gatas, se han empleado gonadotrofinas, tales como hormona folículo estimulante de origen porcino (FSH-p) (Dresser y col., 1988; Pope y col., 1992) y humano (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; Roth y col., 1994; Kanda y col., 1998).

Cabe destacar que el uso de FSH para la estimulación del desarrollo folicular en la gata se ha realizado convencionalmente por administración intramuscular de 2 mg/kg/día por 5 días, no describiéndose experiencias que utilicen otra vía de administración. Sin embargo, en otras especies la administración de gonadotrofinas vía subcutánea ha demostrado ser tan eficiente como la vía intramuscular (Hafez, 1987). Dadas las características de la especie felina, en términos de la dificultad de manejo al momento de aplicar inyecciones intramusculares por varios días, resulta de interés estudiar un esquema de tratamiento alternativo que permita disminuir el estrés en los animales, por ello en el presente estudio proponemos un esquema que considera la disminución del tiempo de tratamiento, aumentando la dosis de 2 a 5 mg/kg/día con administración subcutánea.

El presente trabajo plantea como hipótesis que la estimulación ovárica con una hormona foliculo estimulante exógena, independiente del esquema de administración, tendría un efecto positivo sobre el desarrollo de folículos preovulatorios, así como sobre la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos por punción folicular en gatas.

Los objetivos propuestos fueron: estudiar el efecto del tratamiento gonadotrófico con FSH sobre las características foliculares y de los ovocitos de gatas adultas, y comparar 2 esquemas de administración de FSH en relación con el número de ovocitos potencialmente aptos para la maduración *in vitro*.

MATERIAL Y METODOS

Veinte gatas adultas, mestizas, clínicamente sanas, con pesos entre 2.5 y 3.5 Kg, presentadas para ovariectomía, fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

- a) Grupo SC (n = 7), administración cada 24 horas de 5 mg NIH de FSH¹ vía subcutánea por 4 días consecutivos.
- b) Grupo IM (n = 6), administración cada 24 horas de 2 mg NIH de FSH vía intramuscular por 5 días consecutivos.
- c) Grupo control (n = 7), sin tratamiento.

Veinticuatro horas después del término del tratamiento gonadotrófico se realizó la ovariectomía. Las gatas fueron anestesiadas utilizando una asociación de ketamina² 20 mg/kg y xilacina³ 0.1 mg/kg. Las gónadas fueron mantenidas en suero fisiológico y procesadas dentro de las 2 horas posteriores a la cirugía.

Los ovarios fueron observados bajo lupa para realizar el recuento de folículos, los cuales se midieron con un pie de metro, estas estructuras fueron clasificadas en dos categorías de acuerdo

a su diámetro: folículos < 2 mm y folículos preovulatorios ≥ 2 mm. El contenido de cada uno de ellos fue aspirado usando una jeringa desechable de 5 ml, conteniendo 1 ml de Fosfato Buffer Salino (PBS), con aguja de 26G.

El contenido aspirado fue depositado en placas Petri de 60 mm de diámetro. Luego de cada aspiración la jeringa fue lavada 2 veces con el mismo medio PBS con el objeto de asegurar la recuperación de los ovocitos desde cada folículo aspirado. El medio proveniente de la aspiración y de los 2 lavados sucesivos fue observado bajo lupa estereoscópica para recuperación y evaluación de los ovocitos a un aumento de 20X.

Los ovocitos fueron clasificados bajo un aumento de 40X como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV, basándose en las características de las células del *cumulus oophorus* y corona radiada y la homogeneidad del citoplasma, tal como lo describen Wood y Wildt (1997). En resumen, ovocitos categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del *cumulus*; ovocitos categoría II (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del *cumulus*; ovocitos categoría III (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del *cumulus* presentes son menos compactas; ovocitos categoría IV (malos) presentan citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y del *cumulus* se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

El análisis estadístico comprendió la determinación de medias y desviación estándar para las características ováricas y de los ovocitos, las comparaciones se realizaron mediante un análisis unilateral de la varianza, por rangos, de Kruskal - Wallis. Las tasas de recuperación de ovocitos fueron analizadas mediante la prueba binomial de proporciones. En ambos análisis se consideró un valor de P < 0.05 como estadísticamente significativo. Se utilizó el programa computacional Win Episcopo 2.0.

¹ Folltropin-V®. Vetrapharm Inc.

² Vetalar®. Parke-Davis.

³ Rumpun®. Bayer.

RESULTADOS Y DISCUSION

Independiente del esquema de tratamiento, la administración de la gonadotrofina aumentó significativamente ($P < 0.05$) el número total de folículos en comparación al grupo control, sin que se observaran diferencias entre los grupos tratados (cuadro 1). De la misma manera, el número de folículos preovulatorios (≥ 2 mm) de ambos grupos tratados alcanzó un valor significativamente superior al del grupo control ($P < 0.05$), no observándose diferencias entre grupos tratados (cuadro 1). Los resultados obtenidos en las gatas tratadas son semejantes a los descritos por Goodrowe y col. (1988), quienes usando 150 UI de eCG reportan un promedio de $11,7 \pm 0,7$ folículos preovulatorios y superiores a los descritos por Orosz y col. (1992), tanto con el uso de huFSH (6.7 ± 4.6) como con hMG (6.8 ± 4.0). Si bien los estados iniciales de la foliculogénesis ocurren independientemente de las hormonas gonadotróficas, inicialmente los folículos antrales se hacen receptivos y luego dependientes de la FSH para continuar su desarrollo (Roche, 1996). El mayor número de folículos totales y con diámetro mayor o igual a 2 mm observados en ambos grupos tratados podría explicarse entonces por el efecto estimulador de la FSH sobre la población folicular receptiva presente en los ovarios al momento de iniciar los tratamientos, estímulo que estuvo ausente en el grupo control.

Con respecto al número de ovocitos recuperados, cabe destacar que ambos esquemas de tratamiento permitieron obtener un número significativamente superior ($P < 0.05$) respecto al grupo control (cuadro 2); no observándose diferencias entre los grupos tratados. El aumento del número de ovocitos recuperados, se puede asociar directamente al mayor número de folículos disponibles para la aspiración en los ovarios de las gatas tratadas. El número de ovocitos aptos para MIV, recuperados de gatas estimuladas hormonalmente, independiente del esquema de tratamiento, fue significativamente superior al grupo control ($P < 0.05$), sin que tampoco se observaran diferencias entre los grupos tratados (cuadro 2). Esto último se podría atribuir al mayor número de folículos preovulatorios aspirados, lo que apoyaría una relación entre mayor tamaño folicular y mejores características morfológicas de los ovocitos, postulada en otras especies, en base a que el microambiente de folículos de mayor diámetro, mayor a 6 mm, en el caso de los bovinos, mejora la calidad del ovocito (Lonergan, 1992). En las figuras 1 y 2 se muestran ovocitos de gata clasificados como aptos y no aptos para MIV, respectivamente, de acuerdo a criterios establecidos por Wood y Wildt (1997). Se ha sugerido que la mayoría de los CCO de categoría I en la gata son originados desde folículos mayores a 2 mm de diámetro (Wood y Wildt, 1997), lo que correspondería a folículos de Graaf (Wildt y Seager, 1980). Wood y Wildt (1997) además indican que la atresia ovocitaria ocurre en un alto

CUADRO 1: Número de folículos clasificados según diámetro, medidos en ovarios de gatas tratadas con dos esquemas de administración de FSH.

Number of follicles classified according to their diameter measured on cat ovaries from females treated with two administration schemes of FSH.

Grupos	Número de folículos con tamaño folicular		Total
	< 2.0 mm	≥ 2.0 mm	
CONTROL (n=7)	8.0 ± 3.5 a	1.1 ± 2.2 a	9.1 ± 2.3 a
FSH – IM (n=6)	11.8 ± 7.1 a	9.2 ± 2.8 b	21.0 ± 7.8 b
FSH – SC (n=7)	13.0 ± 5.2 a	10.3 ± 3.9 b	24.1 ± 6.3 b

a, b: letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

CUADRO 2: Número de ovocitos totales y ovocitos aptos para maduración *in vitro* recuperados mediante aspiración folicular en ovarios de gatas tratadas con dos esquemas de administración de FSH.
Total number of oocytes and good grade oocytes for *in vitro* maturation recovered by follicular puncture from ovaries of female cat treated with two administration schemes of FSH.

Grupos	Número de ovocitos	
	Aptos para MIV	Total de recuperados
CONTROL (n=7)	2.8 ± 1.3 a	4.9 ± 2.7 a
FSH – IM (n=6)	10 ± 5.5 b	14.8 ± 8.4 b
FSH – SC (n=7)	9.0 ± 3 b	15.4 ± 3.3 b

a, b: letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

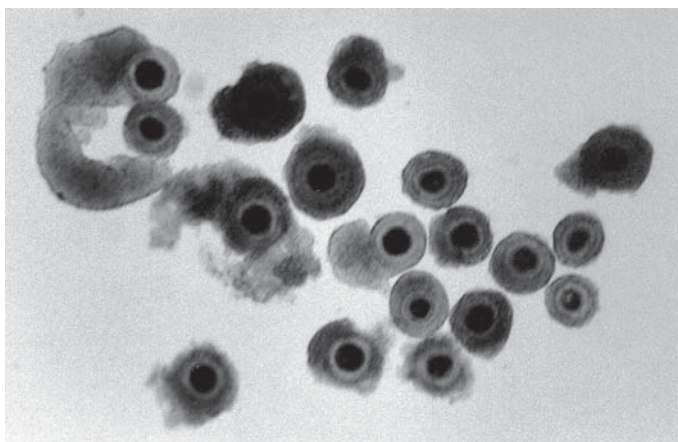


FIGURA 1. Ovocitos de gata clasificados como aptos para maduración *in vitro* (categorías I y II, según Wood y Wild, 1997).

Good quality oocytes for *in vitro* maturation (grade I and II, according to Wood and Wild, 1997).

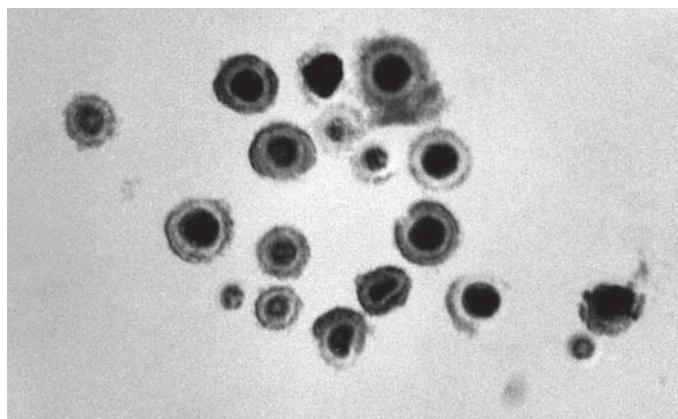


FIGURA 2. Ovocitos de gata clasificados como no aptos para maduración *in vitro* (categorías III y IV, según Wood y Wild, 1997).

Poor quality oocytes for *in vitro* maturation (grade III and IV, according to Wood and Wild, 1997).

porcentaje de los folículos antrales pequeños (0.5 - 1 mm), mientras que los primeros signos de atresia en los folículos de mayor tamaño ocurren a nivel de la granulosa mural más que en el ovocito mismo. Estos autores, señalan además que ovocitos que presentan diferentes grados de alteraciones relacionadas con la atresia varían en su funcionalidad *in vitro*, esto en términos de la habilidad para alcanzar la madurez nuclear, ser fertilizados y desarrollarse posteriormente. Por el contrario, ovocitos clasificados como categoría I presentan una alta probabilidad de dividirse posterior a la inseminación y alcanzar estados de mórula y blastocisto en proporciones similares a las observadas en oviducto y cuernos uterinos 5 a 6 días después de la monta natural (Swanson y col., 1994).

Una vez observado el efecto del tratamiento con FSH, considerando sólo los grupos tratados, al clasificar los folículos en < 2 mm y ≥ 2 mm, se observó que la tasa total de recuperación de ovocitos (total de ovocitos recuperados/total folículos aspirados) fue significativamente superior ($P < 0.05$) en los folículos preovulatorios (≥ 2 mm), así como también lo fue la tasa de recuperación de ovocitos aptos para MIV (total ovocitos aptos recuperados/total folículos aspirados) (cuadro 3). La relación entre mayor diámetro folicular y aumento en la tasa de recuperación total podría obedecer a una mejor manipulación y capacidad de aspiración en

folículos preovulatorios. Respecto a la mayor tasa de recuperación de ovocitos aptos para MIV desde folículos preovulatorios, cabe señalar que si bien en felinos no existe información, en bovinos se ha descrito una relación entre mayor tamaño folicular y mejores características morfológicas de los ovocitos, postulándose que los folículos grandes (> 6 mm) proveen al ovocito de un microambiente que mejora su calidad (Loneragan, 1992). Ovocitos bovinos colectados desde folículos medianos (> 2 y < 6 mm) o grandes (> 6 mm) tienen una mayor capacidad de madurar, ser fertilizados y continuar con su desarrollo embrionario que aquellos provenientes de folículos pequeños (< 2 mm) (Tan y Lu, 1990; Pavlok y col., 1992). Esto se atribuye principalmente al hecho de que los folículos bovinos de mayor tamaño contienen ovocitos que poseen 5 o más capas de células compactas del *cumulus oophorus* (DeLoos y col., 1989; Blondin y Sirard, 1995). Cabe agregar que el ambiente intrafolicular se encuentra permanentemente experimentando modificaciones con respecto a las hormonas esteroidales y peptídicas, factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas, las cuales pueden actuar solas o en conjunto para influenciar el desarrollo folicular y ovocitario (Gordon, 1994).

Los resultados del presente trabajo adquieren gran valor a la luz de antecedentes que señalan que en la gata menos del 15% de todos los

CUADRO 3. Tasas de recuperación de ovocitos y ovocitos aptos para maduración *in vitro*, según tamaño folicular, en gatas tratadas con hormona folículo estimulante, independiente del esquema de administración de FSH

Recovery rates of total oocytes and good grade oocytes for *in vitro* maturation according to follicular size obtained from female cats treated with gonadotrophin.

Diámetro folicular	Total de folículos**	Nº (%) de ovocitos recuperados	Nº (%) de ovocitos aptos para MIV*
$< 2,0$ mm	168	93 (55%) a	51 (30%) a
$\geq 2,0$ mm	127	103 (80%) b	72 (57%) b

* Basado en la clasificación de Wood y Wildt (1997).

** Total de folículos, pool de datos de ambos esquemas de tratamiento con FSH.

a, b: letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

ovocitos intraováricos recuperados pueden ser clasificados como excelentes (Wood y Wildt, 1997), sugiriendo que a menos que se descubra un método alternativo para rescatar ovocitos de baja calidad, las tasas de éxito de la MIV y FIV continuarán siendo restringidas por las características de la calidad de las poblaciones de CCO. Podemos concluir entonces que la administración intramuscular (2 mg por 5 días) o subcutánea (5mg por 4 días), de FSH en la gata, aumenta el número de folículos de tamaño preovulatorio y consecuentemente el número de CCO de buena calidad, aptos para MIV. Además, cabe destacar que la administración subcutánea de FSH, propuesta en este trabajo, tendría la ventaja de facilitar el manejo de los animales y reducir el tiempo de tratamiento.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento gonadotrófico con FSH sobre las características foliculares y ovocitarias de gatas adultas, y comparar dos esquemas de administración de FSH en términos del número de ovocitos potencialmente aptos para MIV. Usando veinte gatas adultas, aleatoriamente, se formaron tres grupos de tratamiento. Grupo SC (n=7) 5 mg/día de FSH por 4 días, vía subcutánea; Grupo IM (n=6) 2 mg/día de FSH por 5 días, vía intramuscular y un Grupo Control (n=7). Las gatas fueron ovariectomizadas y se realizó recuento, medición de folículos y recuperación de ovocitos. Los folículos fueron agrupados en dos categorías: < 2 mm y ≥ 2 mm (considerados como preovulatorios). El tratamiento gonadotrófico aumentó (P<0.05) el número total de folículos y número de folículos ≥ 2 mm, comparado con el grupo control, independiente del esquema de administración de FSH. El tratamiento gonadotrófico, también aumentó (P<0.05) el número total de ovocitos recuperados y el número de ovocitos aptos para MIV, comparado con el grupo control, independiente del esquema de administración de FSH. Las tasas de recuperación de ovocitos totales y ovocitos aptos para MIV fueron superiores (P < 0.05) en folículos ≥ 2 mm versus folículos < 2 mm. Podemos concluir entonces que la administración,

intramuscular o subcutánea de FSH, aumenta el número de folículos de tamaño preovulatorio y, consecuentemente, el número de CCO de buena calidad, aptos para MIV. Además, cabe destacar que la administración subcutánea de FSH propuesta en este trabajo tendría la ventaja de facilitar el manejo de los animales y reducir el tiempo de tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

- BLONDIN, P., M. SIRARD. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 54-62.
- BOGLIOLO, L., G. LEONI, S. LEDDA, S. NAITANA, M. ZEDDA, A. CARLUCCIO, S. PAU. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cat with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 56: 955 - 967.
- DELOOS, F., C. VAN VLIET, P. VAN MAURIK, TH. KRUIP. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam. Res.* 24: 197-204.
- 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., 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.
- EPPIG, J., A. SCHROEDER, J. O'BRIEN. 1992. Developmental capacity of mouse oocytes matured *in vitro*: effects of gonadotrophin stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fert.* 95: 119 - 127.
- FARSTAD, W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 375-387
- GOMEZ, M., C. POPE, B. DRESSER. 2000. Pregnancy in a domestic cat after transfer of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes. In: Proc. 14th Int. Congr. Anim. Reprod. Stockholm, Sweden.
- GOODROWE, K., R. WALL, S. O'BRIEN, P. SCHMIDT, D. WILDT. 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* 39: 355-372.
- GOODROWE, K., M. HAY, W. KING. 1991. Nuclear

- maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 45: 466-470.
- GORDON, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, UK.
- HAFEZ, E. 1987. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5° ed. Editorial Interamericana, México.
- 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.
- 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.
- LENGWINAT, T., C. PITRA, S. BLOTTNER. 1992. Developmental competence of domestic cat follicular oocyte after fertilization *in vitro* with epididymal sperm and co-culture of feline oviductal epithelial cells. *Reprod. Dom. Anim.* 27: 236-243.
- LONERGAN, P. 1992. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. Ph.D. Thesis. National University of Ireland, Dublin.
- LUVONI, G. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reprod. Nutr. Dev.* 40: 505-512.
- 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.
- 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. NIEMAYER, J. CORTELYOU LEE, N. EATON, C. LOTHROP. 1992. Stimulation of folliculogenesis in domestic cats with human FSH and LH. *Theriogenology* 37: 993-1004.
- PAVLOK, A., A. LUCAS-HAHN, A. NIEDMANN. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 63-67.
- 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.
- ROCHE, J. 1996. Control and regulation of folliculogenesis – A symposium in perspective. *Rev. Repr.* 1: 19-27
- ROTH, T., W. SWANSON, D. WILDT. 1994. Development competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 51: 441-451.
- SWANSON, W., T. ROTH, D. WILDT. 1994. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 51: 452-464.
- SHILLE, V., N. SOJKA. 1995. Feline reproduction. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. S. Ettinger, E. Feldman (eds). W. B. Saunders Co., USA.
- TAN, S., K. LU. 1990. Effects of different oestrus cycle stages of ovaries and sizes of follicles on generation of IVF early embryos. *Theriogenology* 33: 335.
- TROUNSON, A., D. PUSHETT, L. MACLELLAN, I. LEWIS, D. GARDNER. 1994. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 41: 57 - 66.
- WOLFE, B., D. WILDT. 1996. Development to blastocyst of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. *J. Reprod. Fert.* 106: 135-141.
- WILDT, D., S. SEAGER. 1980. Ovarian and uterine morphology during the reproductive cycle. In: Current Therapy in Theriogenology. D. Morrow (ed). W. B. Saunders Co., USA.
- WOOD, T., D. WILDT. 1997. Effect of the quality of the cumulus-oocyte 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.
- WOOD, T., R. MONTALI, D. WILDT. 1997. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 190-200.