

## Veterinaria México

Volumen 34  
Volume

Número 4  
Number

Octubre-Diciembre 2003  
October-December

*Artículo:*

### Tecnología de embriones en los felinos domésticos (*Felis catus*)

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

# Tecnología de embriones en los felinos domésticos (*Felis catus*)

## Embryo technology in the domestic cat (*Felis catus*)

Marcos Renato Franzosi Mattos\*  
Lucilene Simões-Mattos\*\*  
Lúcia Daniel Machado de Silva\*\*\*

---

### Abstract

The present report is a review of scientific publication data on embryo technology in the domestic cat (*Felis catus*), emphasizing the cat as an experimental model for wild felids. Subtopics include: *in vitro* embryo production, including oocyte retrieval and maturation, *in vitro* fertilization and culture; cloning by nuclear transfer, embryo collection and transfer, and cooling and cryopreservation of gametes and embryos. A brief historical survey is presented, the latest results are discussed, delineating perspectives and challenges for future improvements.

**Key words:** EMBRYO TECHNOLOGY, DOMESTIC CAT, REPRODUCTION.

### Resumen

Este trabajo muestra una revisión de los datos obtenidos en publicaciones científicas relacionadas con la tecnología de embriones de los felinos domésticos (*Felis catus*), dando énfasis en su importancia como modelo experimental para los felinos salvajes. Los subtemas presentados incluyen la producción *in vitro* de embriones, incluso la recolección y la maduración de ovocitos, fecundación y cultivo *in vitro*; clonación por transferencia de núcleos, recolección y transplante de embriones, refrigeración y crioconservación de gametos y embriones. Se hace un breve relato histórico y se discuten los resultados más actuales, señalando las perspectivas y los desafíos al futuro.

**Palabras clave:** TECNOLOGÍA DE EMBRIONES; FELINO DOMÉSTICO; REPRODUCCIÓN.

---

### Introduction

The final objective of assisted reproductive technologies is to enhance the performance of breeders, which is very important for the conservation of the biodiversity of carnivores.<sup>1-4</sup> Of the 37 existing felid species, only the domestic cat (*Felis*

### Introducción

El objetivo final de las técnicas de reproducción controlada es incrementar la producción de los reproductores, esto es de gran importancia en la conservación de la biodiversidad en carnívoros.<sup>1-4</sup> De las 37 especies de la familia Felidea, sólo el gato domés-

---

Recibido el 26 de noviembre de 2002 y aceptado el 23 de abril de 2003.

\* Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil, 60715-100. Correo electrónico: mattos@latinmail.com

\*\* Becario de investigación científica de la FUNCAP.

\*\*\* Becario de investigación científica del CNPq.

*catus*) is not on the endangered list or threatened with extinction.<sup>2,4</sup> In this respect, it is important to rescue genetic material from wild species, since most of the time the reproduction of these animals in captivity is difficult.<sup>2</sup> Thus, the development of assisted reproductive technologies for wild felids in captivity is essential as part of a broad program for the reproduction of these species.<sup>1,4</sup> In the development of these biotechnologies, the domestic cat has been used as an experimental model for studies about the reproductive physiology and biotechnology of small and big felids.<sup>2,4-10</sup> The present review will approach the aspects related to embryo technology in a feline model (*Felis catus*), more specifically the advances of techniques of *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), somatic cloning by nuclear transfer (NT), embryo transfer (ET), and oocyte and embryo cryopreservation.

### **Controlled reproduction and assisted reproductive biotechnologies in the domestic cat**

Over the last decades, great progress has been made in assisted reproductive technology (ART) for domestic cats. In this model, ovarian stimulation with the use of exogenous hormones, artificial insemination, oocyte retrieval from females treated or not with gonadotropins, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture, nuclear transfer, gamete and embryo cryopreservation and embryo transfer have been performed. According to Luvoni,<sup>2</sup> embryo technology, more specifically the association of IVF followed by *in vitro* culture (IVC) and ET, is a tool of great potential importance, which is currently available for the rescue of genetic material from wild species. Embryo technology includes all biotechnologies related to embryos, such as production, maintenance, transport, storage, transfer, and others. Current embryo technology includes *in vitro* embryo production, nuclear transfer, embryo transfer and cryopreservation.

#### ***In vitro* embryo production (IVP)**

*In vitro* embryo production (IVP) includes techniques of oocyte recovery, IVM, IVF and IVC. More recently, NT was included in the IVP technology. In the last decade, considerable progress has been made with IVP in the domestic cat and, according to several authors,<sup>4,11-14</sup> important successes were obtained when these technologies were used in wild felids.

*Felis catus*) no vive amenazado o en peligro de extinción;<sup>2,4</sup> en este sentido, es importante que se guarde material genético de las especies salvajes, ya que la mayoría de las veces la reproducción de estos animales en cautiverio es deficiente.<sup>2</sup> Así el desarrollo de las técnicas de reproducción controlada en félidos salvajes en cautiverio es esencial como parte de un amplio programa para la reproducción de estas especies.<sup>1,4</sup> En el desarrollo de esa biotecnología se ha usado el gato doméstico como modelo experimental para los estudios en la fisiología reproductiva y biotecnología de pequeños y grandes félidos.<sup>2,4-10</sup> Así la presente revisión abordará los aspectos relacionados con tecnología de embriones en el modelo felino (*Felis catus*), más específicamente con el avance de las técnicas de maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV), clonación por transferencia de núcleos (TN), trasplante de embriones (TE) y crioconservación de ovocitos y embriones.

### **Reproducción controlada y biotecnologías de la reproducción en los felinos domésticos**

En las últimas décadas se ha obtenido un gran progreso en lo que se refiere a la reproducción controlada en gatos domésticos, en los cuales se demostró la posibilidad de llevar a cabo la estimulación ovárica con el uso de hormonas exógenas, la inseminación artificial, recolección de ovocitos de hembras tratadas o no con gonadotropinas, maduración, fecundación y cultivo *in vitro*, clonación por transferencia de núcleos, crioconservación de gametos, embriones y el trasplante de estos últimos. Para Luvoni<sup>2</sup> la tecnología de embriones, más específicamente la asociación de las técnicas de FIV, seguidas por cultivo *in vitro* (CIV) y TE, se tornan herramientas de gran importancia como consecuencia de su elevado potencial y actual disponibilidad en lo que se refiere a preservación de material genético de especies raras. La tecnología de embriones reúne todas las biotécnicas que se relacionan con el embrión: producir, mantener, transportar, almacenar, trasplantar, etcétera. En la actualidad la tecnología de embriones incluye la producción *in vitro* de embriones, transferencia de núcleo, trasplante de embriones y crioconservación.

#### ***Producción in vitro* de embriones (PIV)**

La producción *in vitro* de embriones (PIV) incluye técnicas de recolección-recuperación del ovocito, maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y el CIV de embriones; hace poco en la PIV se incluyó la clonación por transferencia de núcleo (TN). En la última década se ha obtenido un progreso considerable en la PIV en gatos domésticos y, según varios autores,<sup>4,11-14</sup> se lograron importantes éxitos en el mo-

## Oocyte recovery

In early studies, the oocytes were obtained from oviducts of donors treated with eCG and hCG.<sup>7,15-18</sup> The oocytes of preovulatory follicles can be recovered from donors by laparoscopy<sup>7,19</sup> or laparotomy<sup>9</sup> between 24 and 26 h after hCG administration. After treatment of donor females with 150 IU of eCG and 100 IU of hCG, between 8.7<sup>18</sup> and 21.0<sup>17</sup> oocytes were obtained. Similar quantities of oocytes were obtained from donors treated with 100 or 200 IU of hCG to induce ovulation.<sup>7</sup> In another study, an average of 23 to 28.1 preovulatory oocytes were retrieved after treatment with 1.5 to 4.0 mg of FSH for four days.<sup>9,20</sup> Recently, 15.1 to 19.6 preovulatory oocytes were obtained from 25 cats treated with 2 or 3 IU and 5 IU of FSH, respectively.<sup>4</sup>

The earliest studies performed oocyte retrieval by aspiration of antral follicles or by slicing the ovary after ovary-hysterectomy, without a previous gonadotropin stimulus and the oocytes were submitted to IVM.<sup>14,21-33</sup> Today, oocyte recovery from domestic cats is also used to prove the efficiency of *in vitro* capacitation procedures for the spermatozoa of wild felids.<sup>6,23-25</sup>

## In vitro maturation (IVM)

At the time of ovulation, feline oocytes are in metaphase II of meiosis and are very dark due to the high intracellular lipid concentration.<sup>2</sup> About 90% of the oocytes obtained by slicing of the ovaries are immature,<sup>27</sup> as opposed to only 20 to 25% of the preovulatory oocytes from donors treated with gonadotropins.<sup>9,34-36</sup> A recent study<sup>33</sup> indicated the possibility that feline oocytes mature at two very different times (17-18 h versus 28-30 h) in IVM, presenting different degrees of immaturity. Thus, errors may occur in the evaluation of the IVM procedure since oocytes are evaluated in non-homogeneous groups.

Factors such as time of year, culture medium, and oocyte morphology may change the IVM<sup>33</sup> since, as also observed in other animal species, the meiotic capacity is closely related to oocyte quality.<sup>4,33</sup> On this basis, the oocyte must be submitted to a morphologic selection before its maturation. The characteristics considered for this selection, aiming to obtain oocytes most likely to mature, are: spherical shape, with perfectly visible contours of the granulosa cells, uniformly dark cytoplasm color, and an intact zona pellucida (without defects or rupture) surrounded by the corona radiata and by a thick layer (5 or more layers) of compact cells.<sup>2,21,33,37</sup> This evaluation is important not only for IVM but also for IVF and embryo development in IVC. Thus, after

mento en que estas técnicas fueron utilizadas en felinos salvajes.

## Recolección de ovocitos

En estudios iniciales, los ovocitos se obtenían de los oviductos de las donantes tratadas con eCG y hCG.<sup>7,15-18</sup> Los ovocitos de folículos preovulatorios pueden recuperarse de las donantes a través de laparoscopia<sup>7,19</sup> o laparotomía,<sup>9</sup> entre 24 y 26 h después de la administración del hCG. Después del tratamiento con 150 UI de eCG y 100 UI de hCG en las hembras, se recolectaron entre 8.7<sup>18</sup> y 21.0<sup>17</sup> ovocitos. Cantidades similares se obtuvieron de hembras donantes que recibieron 100 o 200 UI de hCG para inducir la ovulación.<sup>7</sup> En otro trabajo se recuperó un promedio de 23 a 28.1 ovocitos preovulatorios después de la administración de 1.5 a 4.0 mg de FSH durante cuatro días.<sup>9,20</sup> Recientemente empleando 25 gatos se recuperaron entre 15.1 y 19.6 ovocitos preovulatorios después del tratamiento con 2 o 3 UI y 5 UI de FSH, respectivamente.<sup>4</sup>

Los más recientes trabajos han realizado la recolección de ovocitos mediante la punción o por fragmentación (*licing*) de los ovarios obtenidos después de la ovariectomía, sin previo estímulo por gonadotropinas y se destinan a la MIV.<sup>14,21-33</sup> Actualmente la recolección de ovocitos de gatas domésticas también se emplea para probar la eficiencia de técnicas de capacitación *in vitro* de los espermatozoides de felinos salvajes.<sup>6,23-25</sup>

## La maduración in vitro (MIV)

En el momento de la ovulación los ovocitos de felinos se encuentran en metafase II de la meiosis, y son muy oscuros debido a la alta concentración intracelular de lípidos.<sup>2</sup> Cerca de 90% de los ovocitos obtenidos por la fragmentación de los ovarios son inmaduros,<sup>27</sup> mientras que sólo de 20% a 25% de los ovocitos aspirados de folículos ováricos preovulatorios de donantes tratadas con gonadotropinas son inmaduros.<sup>9,34-36</sup> Un estudio reciente<sup>33</sup> señala la posibilidad de que los ovocitos felinos maduren en dos tiempos bien distintos (17-18 h contra 28-30 h) en la MIV, por presentar diferentes grados de inmadurez. Así, pueden estar ocurriendo errores en la evaluación de la MIV luego que los ovocitos son evaluados en grupos no homogéneos.

Se ha comprobado que la época del año, medios de cultivo y la morfología de los ovocitos<sup>33</sup> son factores que interfieren en la MIV, siendo que como en otras especies animales la capacidad meiótica está muy relacionada con la calidad del ovocito,<sup>4,33</sup> por lo que es necesario hacer una selección morfológica de éste antes de la maduración. Las características consideradas para esta selección con el fin de obtener los ovocitos con más capacidad de madurar son: formato esférico con los contornos de las células

IVM and IVF, oocytes classified as excellent showed 37.4 % cleavage rates, 30.9% morula formation rates, 24.4% blastocyst, 17.1% expanded blastocyst, and 6.5% hatching blastocyst rates. In contrast, oocytes classified as low quality presented 0.8% and 0.3% rates of cleavage and morula, respectively, without reaching the advanced stages.<sup>21</sup> On the other hand, the frequency of meiotic maturation and fertilization can be enhanced in lower quality oocytes by the addition of hCG to the IVM medium, but other gonadotropins are ineffective.<sup>37</sup>

Although Spindler *et al.*<sup>24</sup> consider morphologic selection to be an inadequate method, this continues to be the method most commonly used for IVM. The cited authors state that the metabolism of the oocytes and their maturation are intrinsically related. Thus, metabolism can be a more precise parameter to be used to measure the quality and maturation stage of feline oocytes.<sup>38</sup> In this respect, supplementation of the culture medium with cysteine<sup>39</sup> did not affect the rates of maturation and degeneration of the oocytes evaluated by morphology. However, even though this supplementation did not affect the morphology, in another study, cysteine enhanced oocyte metabolism.<sup>25</sup>

In the first study of feline IVM/IVF,<sup>40</sup> the frequency of oocytes in metaphase II was high (above 60%) after 48 h of culture in minimum essential medium (MEM) + FSH/LH + 3 mg/ml of bovine serum albumin (BSA) + 1 fetal bovine serum (FBS). While at 24, 30 and 40 h, the frequencies of metaphase II were more than 10, 40 and 50%, respectively. In subsequent studies, the gonadotropins added to the culture medium had a positive effect, but bovine serum<sup>41-43</sup> and estral feline serum<sup>44</sup> had a negative effect on maturation compared to BSA. There were no differences in the incidence of IVM between 24 and 48 h in culture with 10% FBS medium.<sup>42</sup>

There are differences in the capacity of *in vitro* oocyte maturation and embryo cleavage in different seasons of the year, a fact suggesting a seasonal variation.<sup>23</sup> On the other hand, the donor's reproductive cycle does not seem to interfere with the maturation rate.<sup>27</sup> It is important to point out that, although it is possible to obtain complete nuclear maturation *in vitro*, on many occasions inadequate cytoplasm maturation of the oocytes occurs, a feature that is very difficult to evaluate. Also, Gómez *et al.*<sup>45</sup> stated that this inadequate cytoplasm maturation is the main deficiency in oocyte activation in IVF, requiring further studies of IVM in felids. In this respect, in other investigations, alterations in the components of the culture medium, mainly sugars, amino acids and gonadotropins, or the reproductive status of oocyte donors did not alter the

que lo acompañan perfectamente visibles, coloración del citoplasma uniformemente oscura, zona pelúcida (ZP) entera y sin defectos, envueltos por la corona radiada y rodeada por una capa espesa (cinco o más capas) de células compactas.<sup>2,21,33,37</sup> Esta evaluación no es importante apenas para la MIV, una vez que esta selección también influye en la FIV y desarrollo embrionario en la CIV. Así, aquellos ovocitos clasificados como excelentes presentan después de MIV y FIV, las tasas de 37.4% de división, 30.9% de mórula, 24.4% de blastocisto, 17.1% de blastocisto expandido, y 6.5% de blastocisto en eclosión. Mientras que los ovocitos clasificados como de baja calidad presentaron 0.8% y 0.3% de división y mórula, respectivamente, sin haber alcanzado los estadios siguientes.<sup>21</sup> Por otro lado, la maduración meiótica y la frecuencia de fecundación pueden ser incrementadas en los ovocitos de calidad baja mediante el enriquecimiento del medio de MIV con hCG, pero no con otras gonadotropinas.<sup>37</sup>

Spindler *et al.*<sup>24</sup> consideran que la selección morfológica inadecuada continúa siendo el método más utilizado para MIV. Afirman que el metabolismo del ovocito y su maduración están intrínsecamente ligados. Así, el metabolismo puede ser un parámetro más preciso para medir la calidad y estado de maduración de los ovocitos felinos.<sup>38</sup> En este sentido, la adición del antioxidante cisteína al medio de cultivo<sup>39</sup> no afectó la tasa de maduración y de degeneración de ovocitos evaluada por la morfología. A pesar de no afectar la morfología, en otro estudio se observó que este aminoácido benefició el metabolismo de los ovocitos.<sup>25</sup>

En la primera descripción de MIV/FIV en los gatos,<sup>40</sup> la frecuencia de ovocitos en metafase II fue alta (mayor que 60%) después de 48 h de cultivo en medio esencial mínimo (MEM) + FSH/LH + 3 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) + 1% suero fetal bovino (SFB). A las 24, 30 y 40 h, las frecuencias fueron mayores que 10%, 40% y 50%, respectivamente. En los estudios subsecuentes, las gonadotropinas agregadas al medio de cultivo ejercieron un efecto positivo, pero el suero bovino<sup>41-43</sup> y el suero de gata en estro<sup>44</sup> presentaron un efecto negativo en la maduración, cuando se comparó con el BSA. No se ha notado diferencia en la incidencia de MIV entre los intervalos de 24 y 48 h de cultivo en medio que contiene 10% de SFB.<sup>42</sup>

Existen diferencias en la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos y división de los embriones en diferentes épocas del año, lo que sugiere una variación estacional.<sup>23</sup> Por otro lado, el ciclo reproductivo de la donante no parece interferir en la tasa de maduración.<sup>27</sup> Vale resaltar que aunque se obtenga la completa maduración nuclear *in vitro*, en muchas ocasiones ocurre una maduración inadecuada del citoplasma de los ovocitos, siendo ésta muy difícil de evaluar. Además, Gómez *et al.*<sup>45</sup> afirman que esta maduración inadecuada del citoplasma es la mayor de las deficiencias en la activación

IVM rate, but modified the IVF and embryo development rates.<sup>4,27-29,32,45</sup> The harmful influence of this inadequate IVM was also verified when embryos originating from IVM oocytes were cryopreserved. These embryos showed a lower survival rate and a smaller number of cells than embryos originating from *in vivo* maturation.<sup>45</sup>

### In vitro fertilization (IVF)

In the first IVF study on cats, the donors were treated with eCG and hCG, and the oocytes were retrieved from the oviducts 30 h after hCG administration. These structures presented cleavage after 18 h of co-incubation with spermatozoa capacitated by 2-24 h *in utero* pre-incubation, but not with the spermatozoa of fresh semen.<sup>15</sup> Nevertheless, these embryos did not develop *in vitro*, and the possible occurrence of parthenogenesis was not assessed. Seven years later,<sup>16</sup> fertilization was confirmed when the oocytes obtained after estrus induction (100-150 IU of eCG) and ovulation (2.5 mg of hCG) were incubated with fresh spermatozoa (without capacitation) recovered from the vas deferens. In the cited investigation, cleavage was observed in approximately 80% (81/102) of the oocytes between 20 and 28 h after co-incubation. These embryos remained in culture and the first feline IVP blastocysts were obtained.

After these initial trials, a detailed IVF study on felines was published in 1988,<sup>7</sup> showing for the first time: a) preovulatory oocyte retrieval by follicular aspiration using laparoscopy after the ovarian stimulus with eCG and hCG, b) *in vitro* capacitation of feline spermatozoa, and c) birth of kittens after transfer of IVP embryos. In the first studies in which IVF was carried out on oocytes matured *in vitro* for 45-50 h, there was cleavage in some structures that developed more than 16 cell stages.<sup>40-43,46,47</sup> The most recent results have shown improvement of the number and quality of oocytes retrieved *in vivo* and/or after IVM, with a consequent enhancement of *in vitro* embryo development.<sup>4</sup>

Usually, the cleavage rates of embryos obtained by IVF of IVM range from 30 to 70%.<sup>27,37,38,40,46,47</sup> According to Pope,<sup>6</sup> the cleavage rate of IVF embryos originating from preovulatory oocytes varied in several studies, with rates ranging from less than 50% to more than 80% in culture medium containing BSA or bovine serum. Kanda *et al.*<sup>48</sup> obtained more than 95% of fertilized oocytes by using modified Earle medium containing 10% human serum.

Sperm penetration starts 30 minutes after co-incubation with spermatozoa, and more than 90% of the oocytes were penetrated from 30 minutes to 3 hours

del ovocito durante la FIV, por lo que es necesario realizar otros estudios en MIV con félidos. En este sentido, en otros trabajos alteraciones en los componentes del medio de cultivo, principalmente azúcares, aminoácidos y gonadotropinas, así como el estatus reproductivo de la donante de los ovocitos, no afectaron la tasa de MIV, pero sí la tasa de FIV y el desarrollo de los embriones.<sup>4,27-29,32,45</sup> También se verificó influencia dañina de la MIV cuando embriones provenientes de ovocitos MIV fueron crioconservados. Éstos presentaron menor tasa de supervivencia y menor número de células que los embriones provenientes de maduración *in vivo*.<sup>45</sup>

### La fecundación in vitro (FIV)

En el primer trabajo de FIV se usaron gatas donantes que fueron tratadas con eCG y hCG, de ellas se recolectaron ovocitos de los oviductos 30 h después de la administración del hCG. Estas estructuras presentaron división después de 18 h de co-incubación con espermatozoides capacitados por preincubación de 2-24 h en el útero, pero no con los espermatozoides de semen fresco.<sup>15</sup> No obstante, estos embriones no desarrollaron *in vitro*, tampoco se evaluó si hubo partenogénesis. Siete años después<sup>16</sup> la fecundación se confirmó cuando los ovocitos obtenidos después de la inducción del estro (100-150 UI de eCG) y ovulación (2.5 mg de hCG) fueron incubados con espermatozoides frescos (sin capacitación) provenientes del conducto deferente. En esta investigación se observó división en aproximadamente 80% (81/102) de los ovocitos entre 20 y 28 h después de la incubación. Manteniendo estos embriones en cultivo se obtuvieron los primeros blastocistos felinos por FIV.

Después de estos intentos iniciales, un estudio más detallado de FIV en los felinos fue publicado en 1988.<sup>7</sup> Este estudio fue el primero en que hubo: a) recolección de ovocitos procedentes de folículos preovulatorios por medio de aspiración folicular a través de laparoscopia después del estímulo ovárico con el eCG y hCG; b) capacitación *in vitro* de espermatozoides felinos; c) nacimiento de cría viva después del TE de embriones FIV. En los primeros estudios en que fue hecha la FIV a partir de ovocitos madurados *in vitro* durante 45-50 h, hubo división en algunas estructuras que desarrollaron estadios mayores de 16 células.<sup>40-43,46,47</sup> Hallazgos más recientes han mejorado el número y la calidad de ovocitos recuperados *in vivo* y de MIV, perfeccionándose el desarrollo de embriones *in vitro*.<sup>4</sup>

Actualmente las tasas de división de embriones obtenidos mediante FIV de ovocitos madurados *in vitro*, de una manera general, varían entre 30% y 70%.<sup>27,37,38,40,46,47</sup> La tasa de división de embriones mediante FIV de ovocitos preovulatorios, según Pope,<sup>6</sup> varió en muchos estudios, entre menos de 50% y más

after co-incubation.<sup>9,49</sup> Oocyte/spermatozoa co-culture for 6 or 15 h yielded a similar cleavage rate.<sup>50</sup> However, in another study, when the time of co-culture was change from 2 to 18 h, the cleavage rate was doubled.<sup>35</sup> Currently, most of the oocytes in metaphase II (approximately 70%) cleave *in vitro* between 24 and 28 h after co-incubation and the remaining ones cleave after up to 40 h, with close to 100% cleavage being reached on some occasions.<sup>4</sup>

In the 1990's, the first feline blastocysts originating from IVM/IVF were obtained from oocytes fertilized at 24 h of maturation culture.<sup>21,37,51,52</sup> However, in one study,<sup>52</sup> when IVF was performed at 32 h of IVM, the blastocyst rate was higher than that obtained at 24 h of IVM (13% and 9%, respectively). Up to now, IVF has shown encouraging results despite the problems with IVM, which are probably limiting factors in terms of a better success of IVF.

### ***In vitro* fertilization by ICSI and SUZI**

Poor semen quality is a characteristic of several felid species, limiting the success of assisted reproduction of wild felids,<sup>2,4,9,45</sup> possibly causing techniques such as IVF to be impracticable. In this respect, in order to improve this low semen quality, new techniques for IVP of cat embryos are currently being used, mainly intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into mature oocytes. A comparison between IVF and ICSI concerning *in vitro* embryo development in domestic cats demonstrated similar results.<sup>53</sup> Recently, the use of ICSI produced cleavage rates ranging from 40 to 60%,<sup>2,54</sup> and blastocyst rates close to 25%.<sup>2,45</sup> Kittens were obtained after transfer of embryos originating from sub-zonal insemination (SUZI) and ICSI. The latter method was the best due to the stable results produced and the elimination of azoospermia risk.<sup>53,55</sup> The offspring were born after transfer of embryos originating from ICSI when the oocytes were matured *in vivo*<sup>53</sup> and *in vitro*.<sup>45</sup> In this last study, 18 recipients received embryos in the morula stage originating from oocyte IVM and submitted to ICSI, and three pregnancies and two births were obtained.

### ***In vitro* culture**

At present, the indications concerning the methodologies and culture medium for IVC are controversial. The *in vitro* embryo development rate after the use of FSH or eCG was higher in TCM 199 than in HAM F10 medium.<sup>56</sup> According to the cited author, the supplementation of medium with cow or cat serum did not alter embryo development. The *in vitro* development in modified Earle supplemented with 10% human

de 80% en medio de cultivo conteniendo BSA o suero bovino. En medio Earle modificado con 10% de suero humano, Kanda *et al.*<sup>48</sup> obtuvieron más de 95% de ovocitos fecundados.

La penetración espermática empieza 30 minutos después de la incubación con los espermatozoides, entre 30 minutos y tres horas después de la incubación más del 90% de los ovocitos fueron penetrados.<sup>9,49</sup> La tasa de división fue semejante entre el cocultivo ovocito-espermatozoides de 6 o 15 h.<sup>50</sup> Sin embargo, en otro estudio, cuando el tiempo de co-cultivo pasó de 2 a 18 h, el porcentaje de división se duplicó.<sup>35</sup> Hoy la mayoría de los ovocitos en metafase II se divide *in vitro* entre 24 y 28 h después de la co-incubación (aproximadamente 70%), el resto (aproximadamente 30%) 40 h después de este suceso, pudiendo, en ocasiones, alcanzar valores cercanos a 100%.<sup>4</sup>

En la década pasada se obtuvieron los primeros blastocistos felinos originados de MIV/FIV a partir de ovocitos fertilizados a las 24 h del cultivo de la maduración.<sup>21,37,51,52</sup> Sin embargo, en un estudio,<sup>52</sup> la tasa de blastocistos fue mayor cuando la FIV fue empleada de las 32 h de MIV a las 24 h (13% y 9%, respectivamente). En la actualidad, los resultados de FIV son muy prometedores, a pesar de las deficiencias en la MIV, que son probablemente los factores limitantes para obtener mejores éxitos en la FIV.

### **Fecundación *in vitro* por ICSI y SUZI**

Una calidad seminal baja es característica de varias especies de félidos, lo cual es un factor limitante para el éxito de la reproducción controlada de félidos salvajes<sup>2,4,9,45</sup> y que puede hacer impracticables las técnicas como FIV. En este sentido, buscando mejorar esta baja calidad seminal se han aplicado recientemente en los gatos nuevas técnicas para PIV de embriones, sobre todo la microinyección de espermatozoides en el citoplasma de ovocitos maduros (ICSI). Una comparación de desarrollo *in vitro* después de FIV contra ICSI en los gatos domésticos demostró resultados similares entre estos dos métodos de fecundación.<sup>53</sup> Recientemente el uso de esta técnica produjo tasas de división que varían entre 40% y 60%.<sup>2,54</sup> y tasas de blastocistos alrededor de 25%.<sup>2,45</sup> Se obtuvieron crías tanto por la TE de embriones provenientes de la inseminación subzonal (SUZI), como por la ICSI; este último método fue el favorito debido a los resultados más constantes y ausencia de riesgo de azoospermia.<sup>53,55</sup> Las crías nacieron después del TE de embriones producidos por ICSI cuando los ovocitos fueron madurados *in vivo*<sup>53</sup> e *in vitro*.<sup>45</sup> En este último trabajo, 18 receptoras recibieron los embriones en el estadio de mórula, originada de ovocitos MIV y sometidos a ICSI, con lo cual se obtuvieron tres gestaciones y dos nacimientos de éstas.

serum was higher than in this same medium supplemented with BSA or TCM 199 + SFB.<sup>48</sup> The addition of cysteine to culture under conditions of low atmospheric O<sub>2</sub> concentration enhanced the IVM/IVF embryo development rates from 40% to more than 50%<sup>22</sup> or 70% blastocysts.<sup>2</sup> Similar results were obtained with modified Earle medium containing 10% human serum,<sup>53</sup> with more than 70% of the embryos reaching the blastocyst stage. A sequential culture system using Tyrode solution supplemented with MEM, essential and nonessential amino acids, and BSA/SFB, produced blastocyst rates above 50%.

In spite of the good results recently obtained, the ideal conditions for *in vitro* feline embryo development are not yet available since the results are changeable and inferior to those obtained in other mammalian species such as cattle.<sup>2</sup> The limitation of IVC is related to what is known as *in vitro* embryo developmental block. It is known that the embryological chronology is similar *in vitro* and *in vivo* until the morula stage.<sup>57</sup> Thereafter, even when high fertilization rates are obtained, a delay and/or a block of *in vitro* embryo development is observed,<sup>3,4,7,9,21,37,57-62</sup> with a mean of only 20% or 30% blastocysts originated by IVM/IVF, in spite of some reports of better results.<sup>2,22,53</sup> Generally, embryos produced *in vivo* show better IVC development than IVP embryos. This fact raised the suspicion that the deficiency may occur since the IVM stage. As an example, in one study,<sup>57</sup> 70% of the embryos produced *in vivo* developed *in vivo* up to the blastocyst stage after collection during early stages. However, no IVP embryos reached the blastocyst stage. This blockade of development also occurs in other animal species and is related to the maternal-embryonic transition of the control of development; this, however, does not apply to felines.<sup>62,63</sup> According to these authors, the feline embryo begins to control its cleavages in the 5-8 cells stages and this block occurs later in the transition from morula to blastocyst. In other animal species, this block can be easily avoided with standard modifications of IVC.<sup>19,62</sup> Nevertheless, no success was obtained with feline embryos exposed to alterations of temperature and atmospheric gas,<sup>59</sup> the use of supplements and/or alteration of the media<sup>41,58,59,64</sup> or co-culture with oviduct cells.<sup>19,60</sup> Recent studies<sup>28,29,48,53,65</sup> have obtained more encouraging, although not completely satisfactory, results. In a recent study, the effect of individual or group (different stages and qualities) embryo culture was evaluated.<sup>65</sup> The embryos of intermediate quality cultivated with others of the same quality or of excellent quality showed better development and higher number of cells than embryos cultivated alone or in co-culture with other

## Cultivo *in vitro*

Las indicaciones al respecto de metodologías y los medios de cultivo son polémicos en relación con el CIV. La tasa de desarrollo *in vitro* de embriones producidos *in vivo* después del uso de FSH o eCG fue mayor en medio TCM 199 que en el HAM F10.<sup>56</sup> Según este autor, la adición de suero de vaca o de gato no alteró el desarrollo embrionario. El desarrollo *in vitro* en medio Earle modificado, enriquecido con 10% de suero humano, fue superior al medio Earle modificado, enriquecido con albúmina sérica bovina (BSA) o TCM 199 enriquecido con suero fetal bovino (SFB).<sup>48</sup> La adición de cisteína en cultivo en tensión baja de O<sub>2</sub> en la atmósfera, aumentó las tasas de desarrollo de embriones *in vitro* a partir de MIV/FIV, de aproximadamente 40% a más del 50%<sup>22</sup> o 70% de blastocistos<sup>2</sup> MIV. Resultados semejantes fueron obtenidos en medio Earle modificado con 10% de suero humano,<sup>53</sup> en que más del 70% de los embriones llegaron a blastocisto. Un sistema de cultivo secuencial usando medio Tyrode enriquecido con MEM, aminoácidos esenciales, no esenciales y BSA/SFB, produjo tasas de blastocisto mayores al 50%.

A pesar de los buenos resultados recientemente obtenidos, no se han alcanzado las condiciones ideales de cultivo para el desarrollo *in vitro* de embriones felinos, ya que los resultados son inconstantes e inferiores a los obtenidos en otras especies de mamíferos como en los bovinos.<sup>2</sup> Esta limitación en el CIV está asociada a lo que se conoce como bloqueo *in vitro* del desarrollo embrionario. Se sabe que la cronología embriológica es similar *in vitro* o *in vivo* hasta el estadio de mórula.<sup>57</sup> A partir de este punto, aunque se obtengan altas tasas de fecundación, se observa un retardo y hasta un bloqueo del desarrollo *in vitro* de los embriones,<sup>3,4,7,9,21,37,57-62</sup> con una media de apenas 20% o 30% de blastocistos producidos por MIV/FIV, a pesar de haber algunos informes de mayor eficiencia.<sup>2,22,53</sup> De manera general, los embriones producidos *in vivo* se desarrollan más en CIV que los PIV, llegando a creer que la deficiencia viene desde la MIV. Como ejemplo, en un estudio<sup>57</sup> 70% de los embriones producidos *in vivo* se desarrollaron hasta blastocisto *in vitro* después de la recolección en estadios iniciales. Sin embargo, ninguno de los embriones producidos *in vitro* alcanzó el estadio de blastocisto. Este bloqueo de desarrollo, que también ocurre en otras especies animales, en su mayoría se relaciona con la transición del control del desarrollo materno-embriionario, pero en felinos esto último no se aplica.<sup>62,63</sup> De acuerdo con lo anterior, el embrión comienza a controlar sus divisiones en los estadios de 5-8 células y este bloqueo ocurre posteriormente, en la transición de mórula a blastocisto. En otras especies este bloqueo puede ser fácilmente evitado con modificaciones convencionales al CIV.<sup>19,62</sup> No obstante, no se lograron éxitos



embryos of inferior quality. In a similar way, the embryos of intermediate quality cultivated with others of later stages had a higher number of cells than embryos cultivated alone or with other early embryos in the same developmental stage. This information is important to formulate hypotheses about which factors may hinder the IVC of feline embryos.

### *Cloning by nuclear transfer (NT)*

The cloning of mammals by embryo splitting, blastomere dissection and transfer of a donor cell nucleus into a homologous enucleated oocyte has been a reality for several years. Recently, the possibility of cloning an adult animal was proved with the birth of the Dolly sheep.<sup>66</sup> Five years later, the first feline clone was obtained by NT.<sup>67</sup> Other studies<sup>26,30,31</sup> obtained the development of NT embryos in IVC derived from oocyte IVM. However, up to now, due to the scarcity of information, a detailed discussion of the methodologies and results of NT in cats it is not viable. In any case, the first feline clone raised several expectations concerning the real possibility of preservation of wild felids. In spite of its limitations, especially in terms of genetic diversity, cloning may be a new tool for endangered species preservation. In addition, the development of NT will permit feline oocytes to harbor somatic nuclei from other felids, and these reconstituted embryos can then be transferred to queens that will generate kittens of other felids.<sup>31</sup> This speculation is supported by the observations that oocytes of cats that received nuclei of somatic cells of tigers (*Panthera tigris altaica*) developed morulae and blastocysts *in vitro*.<sup>68</sup> In addition, recently<sup>69</sup> domestic cats became pregnant after ET of NT-derived embryos produced with the nucleus of somatic cells of Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and enucleated oocytes of rabbits. It is opportune to remember that interspecies births have already been obtained in felines.<sup>9,70</sup> Thus, we may speculate that in the next few years queens will be used more intensively in conservation programs, serving as recipients of wild felid cloned embryos.

### *Embryo collection and transfer*

The first successful ET in cats was obtained by Kraemer *et al.*<sup>71</sup> In their study, 47 embryos were collected from the uterus of nine donor queens and transferred to nine recipients (synchrony =  $\pm 1$  day). This trial resulted in three pregnant queens with the birth of four live kittens to two of these females, and a stillborn in the other one. In 1982, a 90% rate of embryo collection was obtained from 12

en felinos expuestos a alteraciones de temperatura y gas atmosférico,<sup>59</sup> uso de suplementos o alteración del medio<sup>41,58,59,64</sup> e, inclusive, con cocultivo con las células del oviducto.<sup>19,60</sup> Estudios recientes<sup>28,29,48,53,65</sup> lograron resultados más alentadores, pero no del todo satisfactorios. En un trabajo reciente se evaluó el efecto del cultivo individual de embriones o en grupos, en diferentes estadios y calidades.<sup>65</sup> Los embriones de calidad intermedia cultivados con otros de la misma calidad o de calidad excelente, presentaron mejor desarrollo y mayor número de células que los cultivados solos o en cocultivo con otros embriones de calidad inferior. De manera similar, los embriones de calidad intermedia cultivados con otros de estadios más avanzados presentaron mayor número de células que los cultivados solos o con otros embriones más jóvenes o del mismo desarrollo. Estas informaciones son importantes para formular hipótesis sobre cuáles son los factores que limitan el CIV de embriones felinos.

### *Clonación por transferencia de núcleo (TN)*

La clonación de mamíferos es real desde hace varios años, a través de la bisección embrionaria, disociación de blastómeros y por medio de la transferencia de núcleos de células embrionarias a ovocitos homólogos anucleados. Con el nacimiento de la oveja Dolly<sup>66</sup> se comprobó la posibilidad de clonación de un animal adulto. Cinco años después fue obtenido el primer clon felino por TN.<sup>67</sup> Otros estudios<sup>26,30,31</sup> obtuvieron el desarrollo de embriones de TN en CIV a partir de ovocitos de MIV, pero, hasta hoy no es viable discutir en detalle los resultados y metodologías de TN en gatos, debido a escasez de información. De cualquier manera, la primera clonación felina despertó varias expectativas en lo que concierne a preservación de félidos salvajes. A pesar de las limitaciones, especialmente con relación a la diversidad genética, la clonación puede ser una herramienta más en el intento de preservar especies en peligro de extinción. También el desarrollo del TN tornará posible que ovocitos felinos reciban núcleos de otros félidos y estos embriones reconstituidos sean trasplantados a gatas, haciendo que éstas produzcan crías de otros félidos.<sup>31</sup> Esta especulación puede ser sostenida por las observaciones de que ovocitos de gatas que recibieron núcleos de células somáticas de tigres (*Panthera tigris altaica*) desarrollaron mórulas y blastocistos *in vitro*.<sup>68</sup> Además, recientemente<sup>69</sup> gatas domésticas gestaron de trasplantes de embriones de TN, producidos con núcleos de células somáticas de Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) y ovocitos anucleados de conejo. Es oportuno recordar que ya se han llevado a cabo nacimientos interespecie en felinos.<sup>9,70</sup> Así, no es difícil especular que pronto, gatas estarán colaborando más con programas de conservación al servir como receptoras de embriones clonados de félidos salvajes.

cats and the embryos were directly transferred. However, the females did not become pregnant.<sup>72</sup> Some years later, there were births after ET of embryos collected from the uterus of donors treated with 0.25 to 2.0 mg of FSH per day.<sup>8,73</sup>

In one study<sup>8</sup> the number of collected embryos was similar for both natural or induced estrus. However, the fertilization rate was low and embryo development was slow after a stimulus with 10 mg of FSH (2 mg/day through five days). After ET in queens submitted to the same superstimulation protocol, a low pregnancy rate was obtained for both embryos originating from induced estrus (13%) and embryos originating from natural estrus (29%). In another study,<sup>73</sup> daily treatment with FSH for 3-8 days induced estrus in most of the queens during the non-breeding season, and embryos were obtained from four of five donors. Pregnancy occurred in six recipients, but only one treated with progesterone maintained it until term. Kanda *et al.*<sup>74</sup> collected embryos in early stages of development after ovarian stimulation with eCG. These embryos were cultivated *in vitro*, and after ET to queens with hCG-induced ovulation, pregnant queens and kittens were obtained. In the cited study, better results were obtained with the transfer of embryos in the morula stage compared with the blastocyst stage. It was only after 2000 that ET was first carried out in felids of Latin America.<sup>75,76</sup> In 2001,<sup>75</sup> one donor and three recipients received 2 mg/day of FSH (5-7 days), and embryos were collected and transferred to the three recipients, resulting in two gestations and the birth of one animal. In the second report,<sup>76</sup> in the following year there was a new birth after ET. On that occasion, a donor cat was stimulated with 160 IU of eCG and 100 IU of hCG, and the recipient, in natural estrus, did not receive hormonal treatment and her ovulation was induced by mechanical stimulation of the vagina. In spite of the poor quality of the collected and transferred embryos, one viable offspring was born.

The main purpose of all embryo IVP techniques, including NT, is ET followed by pregnancy and viable offspring.<sup>2,69</sup> In this way, since the birth of the first IVP-derived kittens,<sup>7</sup> other laboratories have produced pregnancies and/or births of domestic felines after IVP/ET.<sup>9,14,48,73,77,78</sup> In most of these studies, the transferred embryos were fresh IVP-derived embryos originating from *in vivo*-matured oocytes. However, kittens were also obtained after ET of IVP embryos after IVM/IVF,<sup>14,37</sup> including NT.<sup>67</sup>

When ET is applied, donor and recipient queens can have their estrus in a natural or induced way. Oocyte retrieval after the use of gonadotropins in donors and recipients is desired<sup>4</sup> since there is the

## Recolección y trasplante de embriones

El primer éxito del TE en gatos fue obtenido por Kraemer *et al.*<sup>71</sup> En este trabajo se recolectaron 47 embriones del útero de nueve hembras, que fueron trasplantados a nueve receptoras (sincronía de  $\pm$  1 día), de los cuales se obtuvieron tres hembras preñadas, con el nacimiento de cuatro crías vivas de dos de éstas, y una nacida muerta en la otra. En 1982, de 12 gatas se obtuvo una tasa de 90% de recolección de embriones, que fueron trasplantados directamente; sin embargo, no se alcanzó la gestación.<sup>72</sup> Algunos años después nacieron crías de TE de embriones recolectados en el útero de las donantes tratadas con 0.25 a 2.0 mg de FSH por día.<sup>8,73</sup>

En otro estudio<sup>8</sup> el número de embriones recolectados fue similar en ambos ciclos, natural o inducido, pero la tasa de fecundación fue menor y el desarrollo retardado después del estímulo con 10 mg de FSH (2 mg/día durante cinco días). Después del TE en hembras en que se cumplió el mismo protocolo de superestimulación, se logró bajo índice de preñez, tanto con los embriones originados de ciclo inducido (13%), como de los de ciclo natural (29%). En otro trabajo<sup>73</sup> el tratamiento diario con FSH entre 3-8 días, indujo el estro en la mayoría de las gatas fuera de la estación sexual, con lo cual se obtuvieron embriones en cuatro de cinco donantes. En las seis receptoras hubo preñez, pero sólo una hembra tratada con progesterona la mantuvo hasta el final. Kanda *et al.*<sup>74</sup> recolectaron embriones en estadios iniciales de desarrollo después del estímulo ovárico con eCG. Estos embriones fueron cultivados *in vitro* y, después del TE, en gatas con ovulación inducida con hCG, se obtuvieron hembras preñadas y nacimientos. En este trabajo, los mejores resultados se dieron con trasplante de embriones en el estadio de mórula comparado con el de blastocistos. En la actual década se han efectuado trasplantes de embriones en félidos en América Latina.<sup>75,76</sup> En 2001<sup>75</sup> una donante y tres receptoras recibieron 2 mg/día de FSH (5-7 días), y se recolectaron embriones que al ser trasplantados a tres receptoras, se lograron dos gestaciones y el nacimiento de un animal. En el segundo informe,<sup>76</sup> en el año siguiente, hubo un nuevo nacimiento de TE. En esta ocasión, una gata donante se estimuló con 160 UI de eCG y 100 UI de hCG, y la receptora, en estro natural, no recibió tratamiento hormonal y su ovulación fue inducida por estímulo mecánico de la vagina. A pesar de la baja calidad de los embriones recolectados y trasplantados, hubo nacimiento de una cría viable.

El objetivo primordial de todas las técnicas de PIV de embriones, inclusive la de TN, es el TE y la consecuente preñez y parto de crías viables.<sup>2,69</sup> Así, desde el nacimiento de las primeras crías de embriones PIV y trasplantados,<sup>7</sup> otros laboratorios producen preñez en los felinos domésticos después de PIV/TE.<sup>9,14,48,73,77,78</sup> En la mayoría

possibility of adjusting the interval between oocyte aspiration and embryo transfer in a synchronous manner. This synchronism between the endometrium and the embryo is essential for the maintenance of pregnancy and birth in farm animals and humans.<sup>79</sup> Thus, several complications are avoided, such as failure of embryo implantation, early embryo mortality and altered development (quick or slow). It is easy to believe that these alterations are similar in felines. In addition, gonadotropins can produce other deleterious effects since oocytes from donors treated with 100 IU of hCG presented a lower degeneration rate and higher IVM and IVF rates than oocytes from queens treated with 200 IU.<sup>7</sup> Thus, as also observed in other species, oocytes and embryos are believed to be negatively affected by gonadotropin-induced abnormalities.<sup>4,7</sup> In addition, gonadotropins cause additional formation of *corpora lutea* and ancillary follicles that may cause alterations in the uterine environment, modifying the rhythmic contraction of the uterus and oviducts, harming fertilization and the consequent embryo development.<sup>4,5,61</sup> An inadequate concentration of estradiol-17 $\beta$  during estrus and an early increase in progesterone are the possible causes,<sup>5</sup> as also observed in several other animal species. In farm animals, the harmful influence of high progesterone concentrations occurs due to a direct action of progesterone itself on the endometrium, causing a higher release of growth factors of and/or a higher passage of these factors to fetal blood. These factors may promote the development of abnormal metabolism in an irreversible way. It is also thought that in situations in which progesterone is high, supplying nutrients, mainly amino acids, is not ideal.<sup>79</sup> On the other hand, according to Roth *et al*,<sup>80</sup> it seems that luteal function is not compromised in eCG/hCG-treated queens. Nonetheless, there are high concentrations of estradiol in the feces of cats treated with eCG, and this concentration remains high even after the induction of ovulation by hCG.<sup>81</sup> In addition, there is a negative correlation between the rate of embryos collected in the uterus and a high concentration of estradiol (-0.91) and the presence of persistent follicles (-0.87).

Concerning transfer site, some researchers prefer to transfer early developmental stage embryos into the oviduct,<sup>7,73</sup> while others choose to transfer morula or blastocyst stages into the uterus.<sup>9,14,48,74-76</sup> There is only one study in which non-surgical ET was carried out by the transcervical route.<sup>10</sup>

In general, ET is successful in cats. However, when gonadotropin therapy is used in ET procedures several inconveniences occur, concerning mainly the uterine environment, and thus limiting

de estos estudios, los embriones transferidos eran frescos y provenientes de la PIV a partir de ovocitos madurados *in vivo*, pero también se produjeron crías del TE de embriones PIV por MIV/FIV,<sup>14,37</sup> inclusive de TN.<sup>67</sup>

Cuando se intenta el TE, las hembras donantes y receptoras pueden tener su estro de manera natural o inducida. La recolección de ovocitos después del uso de gonadotropinas en donantes y receptoras es propicio,<sup>4</sup> luego que hay la posibilidad de controlar el intervalo entre la punción de los ovocitos y el trasplante cronológicamente sincronizado. Este sincronismo entre el endometrio y el embrión es esencial para la manutención de la preñez y nacimiento en los animales de producción y humanos,<sup>79</sup> previniendo diversas complicaciones, como la falla en la implantación del embrión, la mortalidad embrionaria precoz y el desarrollo alterado (acelerado o retardado). Es probable que estas alteraciones sean equivalentes en los felinos. Sin embargo, las gonadotropinas pueden producir otros efectos deletéreos, una vez que los ovocitos que se originaron de las hembras que recibieron 100 UI de hCG presentaron menor tasa de degeneración y mayores tasas de MIV y FIV que las hembras que recibieron 200 UI.<sup>7</sup> Así, semejante a lo que se encontró en otras especies, se propone que los ovocitos y embriones puedan estar comprometidos por anomalías inducidas por las gonadotropinas.<sup>4,7</sup> Además, las gonadotropinas causan formación adicional de cuerpos lúteos CL y folículos accesorios que pueden promover alteraciones en el ambiente uterino, modificando la contracción rítmica del útero y del oviducto, dañando la fecundación y el consecuente desarrollo embrionario.<sup>4,5,61</sup> Una concentración inadecuada de estradiol-17 $\beta$  durante el estro y una elevación precoz de progesterona circulante posiblemente están implicados,<sup>5</sup> similar a lo que se observó en otras especies animales. En animales de producción, la influencia dañina por altas concentraciones de progesterona ocurre por acción directa de esta en el endometrio, causando una mayor liberación de factores de crecimiento o mayor paso de estos factores hacia la sangre fetal. Estos factores promoverían el desarrollo y metabolismo anormal de una manera irreversible. Se piensa también que en situaciones en que la progesterona es elevada, la disposición de los nutrimentos, principalmente aminoácidos, no sea ideal.<sup>79</sup> Por otro lado, según Roth *et al*,<sup>80</sup> parece que la función de la fase lútea no está comprometida en hembras tratadas con eCG/hCG. A pesar de que ha encontrado mayores concentraciones de estradiol en las heces fecales de gatas tratadas con eCG, cuyos niveles altos permanecen incluso después de la ovulación inducida por la administración de hCG.<sup>81</sup> Además, hubo una correlación negativa entre el porcentaje de embriones recolectados en el útero con la concentración alta de estradiol (-0.91) y presencia de folículos persistentes (-0.87).

the use of this technique. Another important limitation is the surgical transfer method. Thus, it is desirable to improve stimulation with gonadotropins and to develop less invasive transfer techniques in order to obtain more efficient ET, mainly in wild felids. The development of such techniques is not only important for direct use in wild felids. According to Pope,<sup>4</sup> domestic queens are of great importance because they may be used as recipients of embryos of several species of small wild felids. This ability to be interspecies recipients was proven in studies in which pregnancy and offspring of a wild cat (*Felis sylvestris* spp.) were obtained after ET to domestic queens.<sup>9,70</sup> In addition, the use of queens as recipients of embryos produced by NT from other animal species is also desired.<sup>69</sup>

### **Gamete and embryo cooling and freezing**

To maximize the use of *in vitro* techniques for the conservation of the genetic material of felids it is necessary to improve the techniques of everlasting or long-term maintenance of gametes and embryos.<sup>2</sup> In this respect, embryos of good quality need to be produced from oocytes conserved for a short time during ovary transport to the laboratory. Spermatozoa and *in vivo* or IVP embryos have been cryopreserved successfully; nevertheless, it is necessary to develop more effective methods for these purposes.<sup>3,4,82</sup> On the other hand, oocyte cryopreservation has not led to appropriate rates of embryo survival, fertilization and development,<sup>2</sup> a fact representing a serious obstacle to the preservation of the genetic material of felids. In this respect, the efficient cryopreservation of oocytes may improve and make possible the techniques of assisted reproduction.<sup>2,4,25</sup>

Concerning cooling, Jewgenow *et al.*<sup>83</sup> mentioned that after 12 h at 4°C, degradation of DNA was not observed in mural granulosa cells. Another study mentioned that the conservation of ovaries in PBS at 4°C for 48 h maintained the morphology and did not promote degeneration of the oocytes.<sup>84</sup> Wolfe and Wildt<sup>52</sup> observed that the potential of IVM, IVF and IVC was maintained in feline oocytes retrieved from antral follicles kept at 4°C up to 24 hours. According to these authors, the oocytes of small preantral follicles were much more sensitive to extended cooling than those of large preantral follicles. A recent study reported that IVM was not affected by storing the ovaries at 10°C for 16 to 24 h.<sup>33</sup> Thus, this supposed resistance of the ovaries to conservation may be of help in the near future in the rescue of gametes for IVM and IVF, and allow long distance transportation.<sup>4,33,84</sup>

Immature feline oocytes are able to survive and to mature *in vitro* after freezing. Half of the immature

En relación con el sitio del trasplante, algunos investigadores prefieren trasplantar los embriones al oviducto en los estadios iniciales de desarrollo,<sup>7,73</sup> mientras que otros adoptan trasplantar en estadios de mórula o blastocisto en el útero,<sup>9,14,48,74-76</sup> habiendo apenas un estudio en que se logró el TE no quirúrgico, por vía transcervical.<sup>10</sup>

En general, el TE en gatas es efectuado con mucho éxito. A pesar de esto último, cuando los procedimientos de TE hacen uso de gonadotropinas, ocurren grandes inconvenientes, sobre todo en lo que se refiere al ambiente uterino, constituyéndose así una limitación de esta técnica. Otra limitación importante es la forma de trasplante que se cumple por vía quirúrgica. Así, se desea perfeccionar la estimulación con gonadotropinas y aplicar técnicas de trasplante menos invasivas, buscando obtener mayor eficiencia del TE, principalmente en relación con los félidos salvajes. Este desarrollo de técnicas no es solamente importante para la utilización directa en este tipo de animales, según Pope,<sup>4</sup> las gatas domésticas tienen gran importancia porque también pueden utilizarse como receptoras de embriones de varias especies de pequeños félidos salvajes. Esta capacidad de funcionar como receptora interespecie ya fue comprobada<sup>9,70</sup> cuando hubo preñez y nacimiento de crías de gato silvestre (*Felis sylvestris* spp), después del TE en gatas domésticas. Sin embargo, también se ambiciona el uso de la gata como receptora de embriones producidos por TN de otras especies animales.<sup>69</sup>

### **Refrigeración y crioconservación de gametos y embriones**

Para aumentar al máximo el uso de las técnicas *in vitro* que buscan la conservación de material genético de los félidos, es necesario perfeccionar las técnicas de mantenimiento permanente o a largo plazo de gametos y embriones.<sup>2</sup> En este sentido, los embriones de buena calidad necesitan ser producidos a partir de ovocitos de ovarios conservados brevemente durante el transporte al laboratorio. Las células espermáticas y los embriones PIV o *in vivo* han sido crioconservados con éxito; no obstante, es necesario desarrollar métodos más eficaces para estos propósitos.<sup>3,4,82</sup> La crioconservación de ovocitos, en cambio, no alcanza todavía tasas apropiadas de supervivencia, fecundación y desarrollo de embriones,<sup>2</sup> ello representa una seria limitante en la preservación de material genético de félidos. En este sentido, la crioconservación eficiente de ovocitos puede ampliar y hacer posible las técnicas de reproducción controlada.<sup>2,4,25</sup>

En relación con la refrigeración, Jewgenow *et al.*<sup>83</sup> señalan que después de 12 h a (4°C) no se observa degradación de ADN en las células de la granulosa. Un estudio informa que la conservación de ovarios en PBS a 4°C

oocytes frozen slowly up to  $-30^{\circ}\text{C}$  in 1.5 M ethylene glycol (EG) or dimethylsulfoxide before plunging into liquid nitrogen ( $\text{N}_2$ ) were morphologically intact after thawing. Of these, 20 to 24% completed IVM to metaphase II, but IVF was not obtained.<sup>85</sup> In the same study, using the ultra-rapid method of cryopreservation, the results were less encouraging, and reactivation of the meiotic process *in vitro* was never obtained even though normal oocyte morphology was maintained after thawing. This fact demonstrates that oocyte morphology after cryopreservation/thawing is not able to predict IVM ability and emphasizes the importance of invisible lesions in the cytoplasm as a consequence of freezing/thawing, damaging the maturation.<sup>2</sup> It was proven that the cryopreserved oocytes of cats can be fertilized and developed *in vitro* when the mature oocytes (MII) are submitted to slow freezing using EG.<sup>3</sup> Despite encouraging results, further studies are necessary to determine the intrinsic characteristics of feline oocytes, since birth of kittens by ET of IVP embryos in which cryopreserved oocytes had been used has not been reported.<sup>2</sup> In this respect, membrane permeability or the presence of intra-cytoplasmic lipid drops can be responsible for the intracellular ice irregular formation that affect the later viability to the cryopreserved/thawed embryos. Damage to the zona pellucida has been reported after cryopreservation/thawing both in oocytes and in embryos. These lesions can be avoided by changes in the freezing procedure<sup>37</sup> or by the addition of dextran 70 to the cryopreservation medium.<sup>14</sup>

Dresser *et al.*<sup>86</sup> were the first authors to perform successful cryopreservation of feline embryos. After the ovarian stimulus with different doses of FSH<sup>6</sup> and embryo collection by laparotomy, morulae and blastocysts were cryopreserved slowly until  $-34^{\circ}\text{C}$  in DPBS + 15% calf serum and 1.35 M EG. The embryos were thawed at 28 or  $37^{\circ}\text{C}$ , submitted to IVC in HAM F10 supplemented medium or Earle medium + 20% calf serum and transferred ( $n = 137$ ) to 11 gonadotropin-treated recipients, resulting in five pregnant queens and 17 viable kittens (12.4% of the embryos transferred).

In spite of the importance of cryopreservation of IVP embryos for genetic material preservation, the viability of these frozen embryos is lower than that of embryos produced *in vivo* or originating from *in vivo* matured oocytes.<sup>14</sup> Even so, success has also been obtained with this procedure.<sup>4</sup> The first success in cryopreservation of IVP-derived embryos was obtained when embryos from two to four cells were frozen at a slow rate until  $-30^{\circ}\text{C}$  in 1.4 M propanediol + 0.125 M sucrose.<sup>20</sup> After thawing, most embryos (73 to 82%) developed *in vitro* until

durante 48 h mantiene la morfología y no promueve la degeneración de los ovocitos.<sup>84</sup> Wolfe y Wildt<sup>52</sup> observaron que el potencial de MIV, FIV y CIV se mantuvo en ovocitos de gatas recolectados de folículos antrales, conservados a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Según éstos, los ovocitos de folículos preantrales pequeños son mucho más sensibles a la refrigeración prolongada que los preantrales mayores. En un estudio reciente se verificó que la MIV no fue afectada por la conservación de los ovarios en tiempos entre 16 a 24 h a  $10^{\circ}\text{C}$ .<sup>33</sup> Así, esta supuesta resistencia de los ovarios a la conservación, quizá pueda auxiliar en el rescate de material para MIV y FIV en un futuro cercano, y permitir el transporte sobre todo en largas distancias.<sup>4,33,84</sup>

Los ovocitos inmaduros de gato son capaces de sobrevivir y madurar *in vitro* después de la congelación. Así, la mitad de los ovocitos inmaduros congelados lentamente hasta  $-30^{\circ}\text{C}$  en 1.5M de etilenglicol (EG) o dimetilsulfóxido, antes de la inmersión en nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ), estaban morfológicamente intactos después de la descongelación. De éstos, 20% a 24% completaron la MIV hasta metafase II; sin embargo, no se consiguió la FIV.<sup>85</sup> En el mismo estudio, con el método de crioconservación ultrarrápido, los resultados fueron menos satisfactorios, siendo que nunca se obtuvo continuación de la división meiótica *in vitro*, a pesar de presentar la morfología normal del ovocito después de la descongelación. Esto demuestra que la morfología de los ovocitos después de la congelación-descongelación no es indicativa de la habilidad de MIV y refuerza la importancia de lesiones no visibles en el sistema citoplasmático, consecuentes a la congelación-descongelación, afectando la capacidad de maduración.<sup>2</sup> Se ha probado que los ovocitos crioconservados de gatas pueden ser fecundados y desarrollados *in vitro*, cuando los ovocitos maduros (MII) son congelados en procedimiento lento con EG.<sup>3</sup> A pesar de los resultados prometedores, se requieren nuevos estudios para conocer las características exclusivas de los ovocitos felinos, ya que actualmente no se sabe de nacimientos de crías de gato por trasplante de embriones de PIV en los cuales se hayan empleado ovocitos crioconservados.<sup>2</sup> En este sentido, la permeabilidad de la membrana o la presencia de gotas de lípidos citoplasmáticos pueden ser responsables de la formación intracelular irregular de cristales de hielo, que afectan la viabilidad posterior a los procedimientos de congelación-descongelación. Lesiones en la ZP son relatadas después de congelación-descongelación tanto en ovocitos como en embriones. Dichas lesiones pueden ser prevenidas por alteraciones en la curva de congelación<sup>37</sup> o con la adición de dextran 70 en medio de congelación.<sup>14</sup>

Dresser *et al.*<sup>86</sup> fueron los primeros en tener éxito en la crioconservación de embriones felinos. Después del estímulo con diferentes dosis de FSH<sup>6</sup> y colecta de los embriones por laparotomía, mórulas y blastocistos fue-

the morula or blastocyst stage similarly to non-frozen control embryos. The ET of 51 morulae and seven blastocysts on the fifth day of IVC after the thawing of cryopreserved embryos produced the birth of kittens in two (50%) out of four synchronized recipients. In another study<sup>37</sup> using a similar freezing methodology, most (~80%) of the IVP embryos cryopreserved from the two-cell to the morula stage maintained their development *in vitro*, even though the blastocyst rate was lower (15%) than for the non-frozen cohort (30%). Better *in vitro* development was obtained for two- and eight-cell embryos cryopreserved in EG than for embryo cryopreserved in propanediol or glycerol.<sup>87</sup> The embryos (n = 40) cryopreserved in EG were transferred to the oviduct of five recipients with a natural or GnRH-synchronized estrous cycle. Three queens (60%) became pregnant by 16 or 20 days after transfer. In a recent study,<sup>14</sup> after slow freezing with propylene glycol, IVP embryos were thawed and IVC/ET resulted in pregnancy and in offspring of the FSH/LH treated-recipients. In addition, the *in vitro* development up to the blastocyst stage was not affected by differences in embryo age at cryopreservation (2, 4 and 5 days).

### Final considerations

The first trials of assisted reproduction in felines were first reported in the 1930's, from 1935 to 1939. Over the last decades, great progress has been made, especially in IVP. However, some problems still persist, representing obstacles for a better efficiency of assisted reproduction in cats, and, consequently, in wild felids. To resolve these limitations, new investigations are needed to try to improve the efficiency of IVM techniques and oocyte cryopreservation and to eliminate the blockade of *in vitro* embryo development. In addition, a less invasive ET and a more effective interspecies pregnancy, including ET of NT-derived embryos, are also required. Even so, the cat has been a model for studies on wild felids, and the studies conducted thus far have shown the importance of these techniques for the preservation of wild fauna. In addition, recent studies reported success in IVF in at least one-third of the wild felid species, obtaining offspring of tigers (*P. tigris*), wild cats (*Felis sylvestris* spp), lynx caracals (*Caracal caracal*) and ocelots (*Leopardus pardalis*) after ET of cryopreserved or fresh IVP embryos.<sup>4,13,14,70,88</sup>

The felids are at the top of the food chain and they stabilize several ecosystems, so that their preservation is essential to permit us to cohabit harmoniously with other forms of life on the planet in the future.

ron crioconservados lentamente hasta -34°C en DPBS + 15% de suero de ternero y 1.35M de EG. Los embriones fueron descongelados a 28 o 37°C, CIV en HAM F10 enriquecido o medio Earle + 20% de suero de ternero y transplantados (n = 137) para 11 receptoras tratadas con gonadotropinas, resultando en cinco hembras preñadas y 17 crías viables (12.4% de los trasplantados).

A pesar de la importancia de la crioconservación de embriones de PIV en la preservación de material genético, el potencial de congelación de estos embriones es menor que el de los embriones producidos *in vivo* o provenientes de ovocitos madurados *in vivo*,<sup>14</sup> además de que se han logrado grandes éxitos en este intento.<sup>4</sup> El primer éxito de crioconservación de embriones PIV se obtuvo en los embriones de dos a cuatro células por tasa de congelación lenta hasta -30°C, en 1.4M de propanodiol + 0.125M de sacarosa.<sup>20</sup> Después de la descongelación, la mayoría de los embriones (73% a 82%) desarrolló *in vitro* hasta mórula o blastocisto, de manera similar con los embriones testigos (no congelados). El TE de 51 mórulas y siete blastocistos en el quinto día de CIV después de la descongelación de estos embriones crioconservados, ha producido nacimiento de crías en dos (50%) de cuatro gatas receptoras sincronizadas. En otro trabajo,<sup>37</sup> usando metodología de congelación similar, la mayoría (~80%) de los embriones PIV crioconservados en el estadio de dos células hasta mórula inicial reasumieron el desarrollo *in vitro*, pero la tasa de blastocisto fue inferior (15%), a la de los testigos sin crioconservación (30%). Se obtuvo un desarrollo *in vitro* mayor de embriones de dos y ocho células crioconservados en EG que en propanodiol o glicerol.<sup>87</sup> Los embriones (n = 40) crioconservados en EG fueron transplantados en el oviducto de cinco receptoras con ciclo estral natural o sincronizado con GnRH, tres (60%) resultaron preñadas hasta 16 o 20 días después del trasplante. Un estudio más reciente<sup>14</sup> demostró que en congelación lenta de embriones de PIV con propileno-glicol puede lograrse la gestación con embriones de CIV/TE y nacimiento de crías de receptoras tratadas con FSH/LH. También se comprobó que el desarrollo *in vitro* hasta blastocistos no es afectado por diferencias en la edad de los embriones crioconservados (dos, cuatro y hasta cinco días).

### Consideraciones finales

Los primeros intentos de reproducción controlada en felinos se remontan a los años 1935-1939, siendo que en las últimas décadas se obtuvieron grandes progresos, sobre todo en PIV. Sin embargo, persisten algunos impedimentos que son hoy limitantes para una mayor eficiencia de la reproducción controlada en gatos, y, por consecuencia, en los félidos salvajes. Así, para resolver estos puntos limitantes, nuevas investigaciones deberán intentar mejorar principalmente la eficiencia de las técnicas de MIV y de crioconservación de

## Referencias

1. Wildt DE, Monfort SL, Donoghue LA, Johnston LA, Howard J. Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* 1992;37:161-184.
2. Luvoni GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reprod Nut Dev* 2000;40:505-512.
3. Luvoni GC, Pellizzari P, Pareti A, Barbero C. Il gatto come specie modello per lo studio dei felini selvatici: produzione *in vitro* di embrioni. *Rassegna di Medicina Felina, Estrato AIVPAFE (Associazione Italiana Veterinari Patologia Felina)*, p.5-10. 2000.
4. Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000;53:163-174.
5. Goodrowe KL, Howard JG, Wildt DE. Embryo recovery and quality in the domestic cat: natural versus induced oestrus. *Theriogenology* 1986;25:156.
6. Dresser BL, Sehlhorset CS, Wachs KB, Keller GL, Turner JL. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 1987;28:915-927.
7. Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien JO, Schmidt PM, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1988;39:355-372.
8. Goodrowe KL, Howard JG, Wildt DE. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17b and progesterone profiles in the domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. *J Reprod Fertil* 1988;82:553-561.
9. Pope CE, Keller GL, Dresser BL. *In vitro* fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development *in vitro*, cryopreservation and successful intra – and interspecies embryo transfer. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;43:189-201.
10. Swanson WF, Godke RA. Transcervical embryo transfer in the domestic cat. *Lab Anim Sci* 1994;44:288-291.
11. Howard J, Wildt DE. Ejaculate-hormonal traits in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by *in vitro* penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990;26:163-174.
12. Donoghue AM, Howard JG, Byers AP, Goodrowe, KL, Bush M, Blumer E, *et al.* Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol Reprod* 1992; 46:1047-1056.
13. Crichton EG, Bedows E, Miller-Lindholm AK, Baldwin DM, Armstrong DL, Graham LH, *et al.* Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian tigers (*Panthera tigris altaica*). *Biol Reprod* 2003;68:105-113.
14. Gómez, MC, Pope E, Harris R, Mikota S, Dresser, BL. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 2003. In press.
15. Hamner CE, Jennings LL, Sojka NJ. Cat (*Felis catus* L) spermatozoa require capacitation. *J Reprod Fertil* 1970;23:477-480.
16. Bowen RA. Fertilization *in vitro* of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. *Biol Reprod* 1977;17:144-147.
17. Donoghue AM, Johnston LA, Brown JL, Munson L, Wildt DE. Influence of gonadotrophin treatment interval on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol Reprod* 1992;46:972-980.
18. Donoghue AM, Johnston LA, Goodrowe KL, O'Brien, SJ, Wildt DE. Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of *in vitro* fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus. *J Reprod Fertil* 1993;98:85-90.
19. Swanson WF, Roth TL, Godkle RA. Persistence of the developmental block of *in vitro* fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. *Mol Reprod Dev* 1996;43:298-305.
20. Pope CE, McRae MA, Plair BL, Dresser, BL. Successful *in vitro* and *in vivo* development of *in vitro* fertilized two to four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 1994;42:513-525.
21. Wood TC, Wildt DE. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1997;110:355-360.
22. Pope CE, Schmid R, Dresser BL. *In vitro* development of cat embryos produced by *in vitro* fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O<sub>2</sub> atmosphere. *Theriogenology* 1999;51:291.
23. Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1999;61:188-194.
24. Spindler RE, Pukazhenti BS, Wildt DE. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 2000;56:163-171.
25. Luvoni GC, Testa P, Biondi PA. Intracellular glutathione content in feline oocytes matured *in vitro* in presence of L-Cysteine. *Theriogenology* 2001;55:483.
26. Fahrudin M, Otoi T, Murakami M, Karja NWK, Ooka A, Suzuki T. The effect of culture medium on *in vitro* development of domestic cat embryos reconstructed by nuclear transplantation. *Theriogenology* 2001;55:268.
27. Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of reproductive cycle. *Theriogenology* 2002;57:2289-2298.

28. Karja NWK, Otoi T, Murakami M, Yuge M, Fahrudin M, Suzuki T. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:291-296.
29. Murakami M, Otoi T, Karja NWK, Ooka A, Suzuki T. Effects of serum-free culture media on *in vitro* development of domestic cat embryos following *in vitro* maturation and fertilization. *Reprod Dom Anim* 2002;37:352-356.
30. Skrzyszowska M, Katska L, Rynska B, Kania G, Smorag Z, Pienkowski M. *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* 2002;58:1615-1621.
31. Kitianant Y, Saikhun J, Pavasuthipaisit K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. *Theriogenology* 2003;59:1775-1786.
32. Herrick JR, Swanson WF. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. *Theriogenology* 2003;59:1503-1513.
33. Katska-Ksiazkiewicz L, Rynska B, Kania G, Smorag Z, Gajda B, Pienkowski. Timing of nuclear maturation of non-stored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2003;59:1567-1574.
34. Gelwicks CE, Pope CE, Turner JL, Keller GL, Dresser BL. An evaluation of meiotic stages and polyspermy in uncleaved oocytes following *in vitro* fertilization in domestic cats. *Theriogenology* 1990;33:228.
35. Byers AP, Donoghue AM, Roth TL, Wildt DE. Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is independent of *in vitro* fertilization potential in the domestic cat. *J Exp Zool* 1994;270:339-404.
36. Gjorret JO, Crichton EG, Armstrong DL, Loskutoff NM, Hyttel P. Oocyte maturation, fertilization and early embryonic development *in vitro* in the Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Theriogenology* 2000;53:334.
37. Pope CE, McRae M.A, Plair BL, Keller GL, Dresser BL. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:69-82.
38. Freistedt P, Stojkovic P, Wolf E, Stojkovic M. Energy status of nonmatured and *in vitro*-matured domestic cat oocytes and of different stages of *in vitro*-produced embryos: Enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol Reprod* 2001;65:793-798.
39. Luvoni GC, Colombo G. Effect of L-cisteine on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. In: Enne G, Greppi GF, y Lauria A. editors. *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy*. Paris: Elsevier, 1995:403-404.
40. Johnston LA, O'Brien SJ, Wildt DE. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Res* 1989;24:343-356.
41. Johnston L.A, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Influence of culture medium and protein supplementation on *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the domestic cat. *Theriogenology* 1993;40:829-839.
42. Luvoni GC, Oliva O. Effect of medium-199 and fetal calf serum on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:203-207.
43. Wood TC, Byers AP, Jennette BE, Wildt DE. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs. *J Reprod Fertil* 1995;104:315-323.
44. Goodrowe KL, Hay M, King WA. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 1991;45:466-470.
45. Gomez MC, Pope CE, Harris R, Davis A, Mikota S, Dresser BL. Births kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2000;12:423-433.
46. Lengwinat T, Blottner S. *In vitro* fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994;35:291-301.
47. Schramm RD, Bavister BD. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:1061-1066.
48. Kanda M, Miyazaki T, Kanda M, Nakao H, Tsutsui T. 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. *Jpn J Vet Med Sci* 1998;60:423-431.
49. Niwa K, Ohara K, Hosoi Y, Iritani A. Early events of *in vitro* fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1985;74:657-660.
50. Pope CE, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL, Dresser BL. *In vitro* fertilization in the domestic cat (*Felis catus*): comparison between freshly collected and cooled semen. *Theriogenology* 1989;31:241.
51. Pope CE, McRae M.A, Plair BL, Dresser BL. Blastocyst development *in vitro* following maturation, fertilization and culture of domestic cat oocytes. *Biol Reprod* 1994;50:179.
52. Wolfe BA, Wildt DE. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. *J Reprod Fertil* 1996;106:135-141.
53. Pope CE, Johnston CA, McRae MA, Keller GL. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 1998;53:221-236.
54. Pushett DA, Lacham-Kaplan O, Gunn IM, Trounson AO. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and *in vitro* matured oocytes in domestic cats: a model for endangered species. *Theriogenology* 2000;53:400.
55. Pope CE, Johnston CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL. *In vitro* and *in vivo* development of domestic cat oocytes following intracytoplasmic sperm injection or subzonal insemination. *Theriogenology* 1995;43:302.
56. Takaya A. A study on superovulation and embryo development in the domestic cat. *Jpn J Vet Res* 1989;37:132.
57. Roth TL, Swanson WF, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. *Biol Reprod* 1994;51:441-451.
58. Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Culture medium and protein supplementation influence *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat. *J Exp Zool* 1991;257:350-359.
59. Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Influence of temperature and gas atmosphere on *in vitro* fertilization and embryo development in domestic cats. *J Reprod Fertil* 1991;92:377-382.
60. Roth TL, Donoghue AM, Byers AP, Wildt DE, Munson L. Influence of oviductal cell monolayer coculture and the presence of corpora hemorrhagica at the time of oocyte aspiration of gamete interaction *in vitro* in the domestic cat. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:523-529.
61. Versteegen JP, Onclin K, Silva LDM, Donnay I, Mettens P, Ectors F. Superovulation and embryo *in vitro* culture following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:209-218.



62. Hoffert KA, Anderson GB, Wildt DE. Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. *Mol Reprod Dev* 1997;48:208-215.
63. Swanson WF, Roth TL, Wildt DE. *In vivo* embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1994;51:452-464.
64. Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Influence of culture medium and protein supplementation on *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the domestic cat. *Theriogenology* 1991;40:829-839.
65. Spindler RE, Wildt DE. Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. *Biol Reprod* 2002;66:167-173.
66. Wilmut I, Schnieke AE, Whir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
67. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415:859.
68. Hwang W, Kim K, Kim G, Jin Y, Kim Y, Chung H, Yoon T, Han C. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*Panthera tigris altaica*). *Theriogenology* 2001;55:271.
69. Chen DY, Wen DC, Zhang YP, Sun QY, Han ZM, Liu ZH *et al*. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;67:637-642.
70. Pope CE, Gómez MC, Mikota SK, Dresser, BL. Development of *in vitro*-produced African wildcat (*Felis sylvestris*) embryos after cryopreservation and transfer into domestic cat recipients. *Biol Reprod* 2000;62:321.
71. Kraemer DC, Flow BL, Schriver MD, Kinney GM, Pennycook JW. Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979;11:51-62.
72. Gruffydd-Jones TJ, David JSE. Embryo collection and transfer in cats. *Proceedings of 2nd International Congress Embryo Transfer in Mammals; September 11 and 12, 1981. Annecy, Francia. Seager, S. W. J. (Editor), Foundation Marcel Merieux, Lyon (Editora), 1982;93.*
73. Tsutsui T, Sato M, Kuroawa N, Hattori I, Matsunaga H, Murao I, *et al*. Embryo transfer in the cat during the non-breeding season. *Jap J Vet Sci* 1989;51:871-877.
74. Kanda M, Oikawa H, Kanda M, Nakao H, Tsutsui T. Early embryonic development *in vitro* and embryo transfer in the cat. *J Vet Med Sci* 1995;57:641-646.
75. Mattos MRF, Silva TFP, Pereira BS, Uchoa DC, Cardoso RCS, Silva AR. *et al*. Embryo transfer in the cat: first success in Latin America. *Memorias de II Congresso Internacional de Medicina Felina [on CD-ROM]; 2001 junho 14-17; Rio de Janeiro. Brasil. 2001. Available from: URL: <http://www.ncvonline.com.br>.*
76. Aguiar L, Madeira VLH, Silva Junior FX, Silva FMO, Monteiro CLB, Silva LDM, *et al*. Transferência de embriões em gata doméstica (*Felis catus*). *Rev Bras Reprod Anim Supl* 2002;5:152-154.
77. Orosz SE, Morris PJ, Doody MC, Niemeyer GP, Cortelyou, LEJ, Eaton NL, *et al*. Stimulation of folliculogenesis in domestic cats with human FSH and LH. *Theriogenology* 1992;37:993-1004.
78. Swanson WF, Penfold LM, Wildt DE. Developmental capacity of IVF-derived domestic cat embryos following transfer to naturally-estrous, GnRH-treated recipients. *Theriogenology* 1998;49:267.
79. Barnes FL. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 2000;53:644-658.
80. Roth TL, Wolfe BA, Long JA, Howard JG, Wildt DE. Effects of equine chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. *Biol Reprod* 1997;57:65-71.
81. Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology* 2000;54:1117-1131.
82. Luvoni GC, Pellizzari P. Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* 2000;53:1529-1540.
83. Jewgenow K, Wood TC, Wildt DE. DNA degradation in mural granulosa cells of non- and slightly atretic follicles of fresh and cold stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;48:350-355.
84. Wood TC, Montali RJ, Wildt DE. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;46:190-200
85. Luvoni GC, Pellizzari P, Battocchio M. Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:93-98.
86. Dresser BL, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *J Exp Zool* 1988;246:180-186.
87. Swanson WF, McRae MA, Wildt, DE, Rall WF. Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF-derived domestic cat embryos after embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:174.
88. Swanson, WF, MacRae MA, Callahan P, Morais RN, Gomez, MLF, Moraes W, *et al*. *In vitro* fertilization, embryo cryopreservation and laparoscopic embryo transfer of the endangered ocelot (*Leopardus pardalis*). In: *Symposium of reproduction and integrated conservation science*, London, Zoological Society of London, UK, 2000. Sin página.