



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Caracterización morfométrica y evaluación de la calidad de COC's
de acuerdo con el ciclo estral en la especie *Felis catus***

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

AUTORAS:

María Belén Espinosa Quinteros

CI: 1722518253

Correo electrónico: belen.espinosa1921@gmail.com

Yessica Gabriela Crespo Álvarez

CI: 0105638191

Correo electrónico: yessica.crespoa2223@hotmail.com

DIRECTOR:

José Luis Pesántez Pacheco, PhD., Mtro.

CI: 0104911193

Cuenca-Ecuador

13 de enero de 2022



RESUMEN

Actualmente existe un elevado interés de biotecnología para reproducción asistida en la gata doméstica, debido a que la información obtenida puede transferirse a felinos silvestres. El objetivo de la presente investigación fue describir los cambios morfológicos de la citología vaginal y uterina que ocurren durante las diferentes etapas del ciclo estral y la asociación de estos cambios con las características de los ovarios, el estado de desarrollo de los folículos y la calidad del ovocito. Para este estudio se utilizaron 20 gatas, a las cuales se realizó una citología vaginal prequirúrgica y otra postquirúrgica a nivel uterino. De los ovarios obtenidos se obtuvo su morfometría de acuerdo a las diferentes etapas del ciclo: anestro, proestro y estro, donde no hubo diferencias estadísticas ($p > 0,05$) siendo el valor medio por ovario de 0,44 cm de ancho, 1,00 cm de largo y 0,14 g de peso. El número de folículos ováricos $> 2 \text{ mm}$ de diámetro fue menor ($p > 0,05$) en anestro ($18,00 \pm 5,29$) que en proestro ($31,44 \pm 11,28$) y estro ($25,28 \pm 8,03$). La valoración de la cantidad de complejos cúmulo ovocito (COC's) no difirió estadísticamente, fue $21,50 \pm 10,08$ en anestro, $35,56 \pm 11,23$ en proestro y $33,00 \pm 11,70$ en estro ($p > 0,05$), sin embargo, al valorar COC's mediante la tinción azul brillante de cresilo se determinó que un mayor número de COC'S ($p < 0,05$) resultó ser BCB positivo en etapa de proestro $18,67 \pm 5,24$ vs $9,75 \pm 4,64$ anestro y $18,00 \pm 5,32$ estro.

Finalmente, las variables morfométricas del ovocito no tuvieron diferencias estadísticas entre etapas del ciclo ($p > 0,05$). En conclusión, las características morfométricas de los ovarios, la cantidad de folículos y características de los ovocitos son estadísticamente similares indistintamente de la etapa del ciclo estral. Asimismo, la prueba de BCB probó ser una metodología útil para categorizar ovocitos de gatas.

Palabras clave: COC's. Gatas. Ciclo estral. Citología vaginal. Citología uterina. Caracterización morfométrica. Azul brillante de cresilo.



ABSTRACT

Currently, there is a high interest in biotechnology for assisted reproduction in the domestic cat, because the information obtained can be transferred to wild felids. The objective of the present investigation was to describe the morphological changes in vaginal and uterine cytology that occur during the different stages of the estrous cycle and the association of these changes with the characteristics of the ovaries, the state of development of the follicles and the quality of the oocyte. For this study, 20 female cats were used, which underwent a pre-surgical vaginal cytology and a post-surgical cytology at the uterine level. The morphometry of the ovaries obtained was obtained according to the different stages of the cycle: anestrus, proestrus and estrus, where there were no statistical differences ($p > 0.05$), the mean value per ovary being 0.44 cm wide, 1.00 cm long and 0.14 g in weight. The number of ovarian follicles > 2 mm in diameter was lower ($p > 0.05$) in anestrus (18.00 ± 5.29) than in proestrus (31.44 ± 11.28) and estrus (25.28 ± 8.03). The evaluation of the amount of oocyte cumulus complexes (COC's) did not differ statistically, it was 21.50 ± 10.08 in anestrus, 35.56 ± 11.23 in proestrus and 33.00 ± 11.70 in estrus ($p > 0.05$), however, when COC's were assessed by cresyl brilliant blue staining, it was determined that a greater number of COC'S ($p < 0.05$) resulted to be BCB positive in proestrus stage 18.67 ± 5.24 vs. 9.75 ± 4.64 anestrus and 18.00 ± 5.32 estrus.

Finally, the oocyte morphometric variables had no statistical differences between cycle stages ($p > 0.05$). In conclusion, the morphometric characteristics of the ovaries, the number of follicles and oocyte characteristics are statistically similar regardless of the stage of the estrous cycle. Likewise, the BCB test proved to be a useful methodology to categorize oocytes from female cats.

Key words: COC's. Cats. Estrous cycle. Vaginal cytology. Uterine cytology. Morphometric characterization. Cresyl Brilliant Blue.



ÍNDICE

1. INTRODUCCION	19
2. OBJETIVOS	19
2.1.1. General	21
2.1.2. Específicos	21
3. REVISIÓN DE LITERATURA	22
3.1. Anatomía reproductiva felina	22
3.1.1. Órganos internos	22
3.1.2. Órganos externos	24
3.2. Fisiología reproductiva felina	25
3.2.1. Ovogénesis	25
3.2.2. Fisiología del ciclo estral	26
3.2.2.1. Fase folicular	27
3.2.2.2. Fase luteal	30
3.2.3. Fases del ciclo estral	31
3.2.3.1 Proestro	31
3.2.3.2 Estro	32
3.2.3.3 Interestro	32
3.2.3.4 Diestro	32
3.2.3.5 Anestro	32
3.3 Citología vaginal en la detección del ciclo estral	34
3.2.4. Proestro	34
3.2.5. Estro	34
3.2.6. Interestro	35
3.2.7. Diestro	35
3.2.8. Anestro	35
3.4 Citología uterina (endometrial)	36
3.5 Definición y características morfológicas del ovocito	38



3.5.1	Evaluación de la calidad de ovocitos	39
2.5.1.1.	Evaluación morfológica.	39
2.5.1.2.	Evaluación morfométrica.	39
2.5.1.3.	Prueba azul brillante de cresilo (BCB)	40
2.5.1.4.	Ultraestructura de los ovocitos y expresión de genes	41
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1.	Materiales	43
4.1.1.	Materiales físicos	43
4.1.2.	Materiales biológicos	43
4.1.3.	Materiales químicos	43
4.1.4.	Materiales de laboratorio	43
4.2.	Métodos	44
4.2.1.	Área de estudio	44
4.2.2.	Animales del estudio	44
4.2.4.	Diseño experimental	45
4.3.	Obtención de muestras citológicas	46
4.3.1.	Vaginal	46
4.3.2.	Uterina	46
4.4.	Obtención y traslado de ovarios	47
4.5.	Valoración de la morfología ovárica	47
4.6.	Obtención y procesamiento de COC´s	47
4.7.	Clasificación de COC´s	48
4.8.	Caracterización morfométrica de los COC´s	48
4.9.	Tinción vital azul brillante de cresilo	49
4.10.	Análisis estadístico	49
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1.	Hallazgos citológicos de la mucosa vaginal y uterina.	51



5.2. Características morfométricas de los ovarios en diferentes etapas del ciclo estral.	52
5.2.1. Población folicular y características morfológicas de los COC´s	53
5.3. Valoración de COC'S	54
5.3.1. Morfología	54
5.3.2. Tinción de azul brillante de cresilo (BCB)	55
5.3.3. Características morfométricas de los ovocitos en diferentes etapas del ciclo estral.	56
4.3.3.1. Diámetro total del ovocito	56
4.3.3.2. Volumen	57
4.3.3.3. Espacio perivitelino (EPV)	58
4.3.3.4. Espesor de zona pelúcida (ZP)	59
6. CONCLUSIONES	61
7. BIBLIOGRAFÍA	62
8. ANEXOS	70



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tracto reproductor de la hembra. Tomado de Konig y Liebich (2011) (20).	25
Figura 2. Representación esquemática del ovario en diferentes etapas funcionales del ciclo. Tomado de Grau y Walter (1967) (30).	31
Figura 3. Fases del ciclo estral en la hembra felina. Adaptado de Bristol y Woodruff (2006) (29), Jewgenow y Paris (2006) (30) , Malandian et al. (2011) (28).	33
Figura 4. Esquema general del ciclo estral en la hembra felina. Adaptado de Royal Canin, Comunidad gateros (2013) (41).	33
Figura 5. Tipo de células epiteliales a conocer en la citología vaginal A. Células basales pequeñas y basofílicas, B. Células parabasales, C. Célula parabasal: basofílica y tres células intermedias. D. Célula superficial o cornificada. Tomado de Delfino et al. (2018) (8)	36
Figura 6. Citología endometrial del útero perra. (A) Células epiteliales endometriales normales (CEEN). (B) Células epiteliales endometriales están agrandadas (CEED) Citología degenerativa (aumento 1000). Tomado de Groppetti et al. (2010) (37).	37
Figura 7. Citología endometrial del útero perra. (G) Anestro temprano (CEED). (H) Anestro medio (CEEN y CEED (flecha)). (I) Anestro tardío. Grupo grande de células epiteliales endometriales que mantienen una disposición glandular con luz central abierta (flecha). Tomado de Groppetti et al. (2010) (37).	37
Figura 8. Estructura del ovocito. Tomado de Belmonte (2020) (42)	39
Figura 9. Ubicación Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y Laboratorio de Biotecnología. Obtenido de Google Maps (2013).	44
Figura 10. Principales tipos celulares presentes en la citología vaginal de gatas en diferentes etapas del ciclo estral. 1: célula parabasal, 2: célula intermedia, 3: célula superficial, 4: célula anucleada.	52
Figura 11. Morfometría ovárica considerando ancho y largo en cada una de las fases del ciclo estral.	53
Figura 12. Población folicular ovárica de acuerdo con el tamaño del folículo y su relación con las fases de ciclo estral.	54



Figura 13. Valores medios de COC´s resultantes a la tinción vital de azul brillante de cresilo en las diferentes fases del ciclo estral. Diferentes letras significan diferencias estadísticas (a, b) para $p < 0,05$. _____ 56

Figura 14. Valores medios del diámetro y volumen del ovocito en las diferentes fases del ciclo estral. _____ 57

Figura 15. Valores medios del espacio perivitelino en las diferentes fases del ciclo estral. _____ 59

Figura 16. Valores medios del espesor de la zona pelúcida en las diferentes fases del ciclo estral. _____ 60



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de órganos reproductores de la hembra. _____	22
Tabla 2. Clasificación de COC´s de la especie <i>Felis catus</i> . Adaptado de Wood y Wild (1997) (11). _____	48
Tabla 3. Valores medios de COC´s encontrados en las diferentes fases del ciclo estral. _____	55



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Evaluación clínica de las gatas del estudio. _____	70
Anexo 2. Cirugía y cuidado post quirúrgico. _____	70
Anexo 3. Procedimiento de citología. _____	71
Anexo 4. Citología vaginal y uterina _____	71
Anexo 5. Tipos de células encontradas en citología vaginal. _____	71
Anexo 6. Citología vaginal en las diferentes fases del ciclo estral (aumento 40x) (tinción de Diff Quick) _____	72
Anexo 7. Células endometriales normales (a=aumento 100x, b=aumento 40x) _____	72
Anexo 8. Células endometriales degenerativas (a=aumento 100x, b=aumento 40x) _____	72
Anexo 9. Morfometría ovárica _____	73
Anexo 10. Medición de folículos ováricos _____	73
Anexo 11. Colecta y clasificación de COC´s _____	74
Anexo 12. Tipo de COC´s en gatas domésticas _____	74
Anexo 13. Tinción azul brillante de cresilo (BCB). _____	75
Anexo 14. Morfometría ovocitaria. _____	75
Anexo 15. Ficha de registro de datos. _____	76
Anexo 16. Estadísticos descriptivos de características morfométricas de COC´s _____	77



ABREVIATURAS

BCB: azul brillante de cresilo

CEN: células endometriales normales

CED: células endometriales degenerativas

DO: diámetro del ovocito

EPV: espacio perivitelino

FSH: hormona foliculoestimulante

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

G6PDH: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

LH: hormona luteinizante

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PMN: polimorfonucleares

EZP: Espesor de la zona pelúcida

ZP: zona pelúcida



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

María Belén Espinosa Quinteros en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización morfométrica y evaluación de la calidad de COC's de acuerdo con el ciclo estral en la especie *Felis catus*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de enero de 2022

María Belén Espinosa Quinteros
C.I.: 1722518253



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yessica Gabriela Crespo Álvarez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización morfométrica y evaluación de la calidad de COC's de acuerdo con el ciclo estral en la especie *Felis catus*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 13 de enero de 2022

Yessica Gabriela Crespo Álvarez
C.I.: 0105638191



Cláusula de Propiedad Intelectual

María Belén Espinosa Quinteros, autora del trabajo de titulación "Caracterización morfométrica y evaluación de la calidad de COC's de acuerdo con el ciclo estral en la especie *Felis catus*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de enero de 2022

María Belén Espinosa Quinteros
C.I.: 1722518253



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yessica Gabriela Crespo Álvarez, autora del trabajo de titulación "Caracterización morfométrica y evaluación de la calidad de COC's de acuerdo con el ciclo estral en la especie *Felis catus*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 13 de enero de 2022

Yessica Gabriela Crespo Álvarez
C.I.: 0105638191



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre, por su apoyo incondicional constante, y sus enseñanzas llenas de amor, ya que con ellas aprendí a valorar cada pequeño detalle, en cada etapa de mi vida. Sin ella no habría sido posible cumplir uno de mis más grandes sueños.

A, mis tíos Marisol, Marco, María y Patricio por siempre darme una mano durante toda mi carrera, sin sus palabras y apoyo incondicional hubiera sido difícil culminar con éxito mi instrucción universitaria.

A mis compañeros y amigos por cada momento compartido a lo largo de la carrera universitaria, gracias por llenarme de gratos y grandes recuerdos.

A todos los profesores que he tenido en cada ciclo de mi formación veterinaria, gracias por sembrar cada semilla de conocimiento en mí.

A mi compañera de tesis y amiga Yessica Crespo por enseñarme el verdadero significado del trabajo en grupo.

Belén Espinosa

Sin duda alguna, mi vida ha estado rodeada por personas increíbles, las cuales han sido partícipes de este proyecto de tesis.

Agradezco a mi madre y a mi hija, por el amor, comprensión, paciencia y la motivación entregada día a día en todo este tiempo de vida universitaria. Con la misma gratitud a mi pareja, Daniel Segovia, por su ayuda que ha sido fundamental en la realización de este proyecto, por su paciencia y el tiempo compartido y las charlas motivacionales cuando los ánimos decaían.

Gracias a mis maestros y amigos, quienes han sido un gran apoyo a lo largo de la carrera, en especial a mi compañera de tesis Belén Espinosa, quien más que una amiga ha sido una hermana con la cual hemos formado un gran equipo de trabajo caracterizada por un apoyo mutuo.

Yessica Crespo



AGRADECIMIENTOS

Queremos hacer agradecimiento a nuestro tutor, el Dr. José Luis Pesantez por guiarnos en las diferentes etapas de desarrollo de nuestra tesis.

Al Dr. Luis Ayala por brindarnos sus conocimientos, apoyo incondicional, y consejos permitiéndonos un crecimiento tanto profesional como personal.

A los miembros del laboratorio de biotecnología y reproducción animal de la universidad de Cuenca. Quienes nos proporcionaron todos los recursos y ayuda durante el desarrollo de nuestra investigación. En especial al Dr. Xavier Samaniego.

Al Dr. Jonathan Alvarado por estar al pendiente de nuestro trabajo de campo y enseñarnos cada proceso con paciencia y dedicación.

A los miembros de la Clínica Veterinaria de la Universidad de Cuenca, que nos proporcionaron todas las facilidades, instrucción y ayuda con nuestros pacientes felinos. En especial al Dr. Boris Brito, Dr. Guillermo Taboada.

Belén Espinosa y Yessica Crespo



DEDICATORIA

A Dios, por ser mi fuerza de impulso, mi gran motor, y mi brújula día a día, sé que, gracias a él, los recursos y las personas indicadas estuvieron en mi camino, para poder concluir con éxito mi carrera.

A, mi madre Flor, mi hermana Andrea y mi sobrino Alejandro, por ser mi apoyo y la fuente más grande de inspiración y felicidad en mi vida, que me impulsan siempre a dar lo mejor de mí.

A mis abuelitos, mis tíos y primos, por siempre estar a mi lado de todo corazón, aunque físicamente estén lejos, su gran cariño y aprecio lo he sentido en cada paso que doy.

A todos mis amigos que han estado siempre al pendiente de mí dándome una palabra de aliento cuando las cosas se ponían difíciles, gracias Isabel, Damián, Miguel, Stoney, Xavier y Christian por su amistad sincera y acompañarme cuando más lo he necesitado.

Belén

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mi madre Fanny, una mujer fuerte quien desde pequeña me ha impulsado a conseguir mis más grandes metas. Ella con amor, dedicación y esfuerzo me convirtió en la persona que soy hoy en día.

A mi hija Allison, su amor ha sido el detonante de cambios y de felicidad en mi vida, el esfuerzo y las ganas de ser mejor y de buscar lo extraordinario para ella. A pesar de ser tan pequeña me ha enseñado a valorar cada aspecto de la vida y lo que ello representa. Fuiste, eres y serás la motivación más grande y el motor que guie mi vida.

Yessica



1. INTRODUCCION

La biotecnología reproductiva es una ciencia que a través de los años ha ido avanzando en varias especies, como la bovina (1), porcina (2), ovina (3), caprina (4) y en menor proporción la canina (5); sin embargo, en la felina y específicamente en la gata doméstica la información científica existente a nuestro entender es escasa (6); por lo tanto, es necesario conocer más a fondo las particularidades anatomo-fisiológicas del aparato reproductor y ciclo estral de esta especie.

Considerando que la gata doméstica tiene un ciclo reproductivo estacional sensible a mayor horas luz (14 horas) en países de cuatro estaciones; sin embargo, en lugares alrededor de la línea ecuatorial las horas luz son constantes en el año, que junto al efecto in door la presencia y duración del ciclo estral podría verse alterado (7).

Conocer y entender estos principios fisiológicos es necesario para la implementación de biotecnologías reproductivas como la producción de embriones *in vitro* (12). De allí la necesidad de caracterizar la citología vaginal y uterina, así como la morfología y morfometría del ovocito de la gata pre y postmaduración pretendiendo comprender los cambios morfofisiológicos que ocurren durante las diferentes fases del ciclo estral (8).

El método comúnmente usado para reconocimiento de las diferentes fases estrales es la citología debido a su accesibilidad, entre las cuales tenemos la citología vaginal la cual se basa en diferenciar células cornificadas y no cornificadas(9), y la citología uterina la cual se basa en el reconocimiento de células endometriales normales o degenerativas (10), se conoce que en la actualidad la citología uterina de la gata doméstica ha sido poco estudiada (11).

En cuanto a los COC's su estudio debe partir desde la morfología y morfometría para saber cómo el ciclo estral influye en estas características. Varios estudios han utilizado la tinción vital de azul brillante de cresilo para mejorar la selección de los COC's (12); así, estudios realizados en ovarios de otras especies como la vaca (13),



cerda (14) y yegua (15), determinaron de manera indirecta el grado de desarrollo del ovocito, lo que mejoró los resultados en la producción de embriones *in vitro* (16).

Finalmente, partir del estudio básico reproductivo del ciclo de la gata, sus particularidades a nivel de su tracto reproductivo y morfología y morfometría de sus gametas (ovocitos), constituiría una herramienta clave para realizar estudios a futuro en especies de felinos silvestres, que, debido al aumento de las actividades antropogénicas, varias especies de felinos silvestres están al borde de la extinción (14). Según el libro rojo, en Ecuador existen 6 especies de felinos en peligro de extinción; como el tigrillo chico (*Leopardos tigrinus*), gato andino (*Oncifelis colocolo*), jaguar (*Panthera onca*), puma (*Puma concolor*), tigrillo (*Leopardus pardalis*), tigrillo de cola larga (*Leopardus wiedii*) (15).



2. OBJETIVOS

2.1.1. General

Describir los cambios morfológicos de la citología vaginal, cervical y uterina durante diferentes etapas del ciclo estral y su asociación con las características de los ovarios, el estado de desarrollo de los folículos y la calidad del ovocito.

2.1.2. Específicos

- Evaluar los cambios morfológicos de la citología vaginal, cervical y uterina en diferentes etapas del ciclo estral de hembras felinas.
- Describir la morfología y las características de los ovarios de hembras felinas.
- Clasificar COC´s a través de sus características morfométricas y la selección de estos a través de un método no invasivo.

2.1.3. Pregunta de investigación

¿Cuáles son los cambios observables en la citología vaginal, cervical y uterina, así como, en las características morfométricas de los ovarios y el desarrollo de los folículos y junto con la idoneidad de los ovocitos durante las diferentes etapas del ciclo estral de la hembra felina?

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Anatomía reproductiva felina

Los órganos genitales femeninos se dividen en segmentos, y se los puede clasificar de acuerdo con su localización como órganos internos y externos. Los órganos internos son los ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina, que están relacionados con la producción, transporte y almacenamiento de gametos femeninos, estos se encuentran sostenidos por el ligamento ancho formado por el mesovario que sostiene al ovario, el mesosalpinx que sostiene al oviducto y el mesometrio que sostiene al útero. En cuanto a los órganos externos se encuentran formados por vestíbulo, vulva y clítoris (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de órganos reproductores de la hembra. Adaptado de Negrete, J (2007) (24).

Órganos internos	Órganos externos
Ovarios (producción)	Vestíbulo
Oviductos (sistema de conductos) (Transporte y almacenamiento)	Vulva
Útero (sistema de conductos) (Transporte y almacenamiento)	Clítoris
Vagina	

3.1.1. Órganos internos

- **Ovarios:** se encuentran en la cavidad abdominal, caudalmente a los riñones (Figura 1), son ovoides y de aproximadamente 1 cm de longitud y 0,5 cm de ancho. El ovario derecho se sitúa entre la pared del flanco derecho y el duodeno. El izquierdo se relaciona con el bazo (17). Los ovarios están formados por dos zonas que son la corteza y la médula, las cuales se describen a continuación.



- 1) **Corteza:** es una zona ancha periférica que contiene folículos y cuerpos lúteos (Figura 2), cubierta por un epitelio de superficie de tipo cuboidal bajo. El estroma cortical está compuesto por tejido conjuntivo laxo (18). La túnica albugínea es una gruesa capa de tejido conjuntivo, situada inmediatamente por debajo del epitelio de superficie e interrumpida por el crecimiento de los folículos ováricos y los cuerpos lúteos, siendo apenas visible durante los incrementos en la actividad ovárica.
- 2) **Médula:** área interior en la que están contenidos nervios, un gran grupo de vasos sanguíneos y linfáticos (Figura 2) (19).
 - **Oviductos:** son estructuras tubulares blandas, cuya longitud promedio se encuentra entre 4-5 cm. En el segmento inicial cranealmente se sitúa el ovario y el medio de fijación de esta estructura es el mesosalpinx (20). El oviducto se caracteriza por poseer tres segmentos con diferentes funciones que son el infundíbulo, ampolla e istmo, los cuales se describen a continuación.
- 1) **Infundíbulo:** recoge los ovocitos que son expulsados del ovario a través de la ovulación. Se halla rodeado por la bolsa ovárica. Presenta unas proyecciones digitiformes denominadas fimbrias (19). En el momento de la ovulación, los vasos sanguíneos de las fimbrias están repletos, y las fimbrias turgentes se mueven por encima de la superficie del ovario como resultado de las contracciones rítmicas de las células musculares lisas. Al mismo tiempo, los cilios de las células epiteliales infundibulares transportan el ovocito hacia la ampolla.
- 2) **Ampolla:** lugar donde se da la fecundación. En este lugar la principal fuerza que empuja el ovocito hacia el istmo es la actividad ciliar, pero en algunas especies también interviene la contractibilidad muscular (21).
- 3) **Istmo:** la fuerza principal que empuja el cigoto hacia el útero es la contractibilidad muscular, con cierta actividad ciliar en algunas especies. En la fase folicular, las contracciones antiperistálticas tienden a mover los contenidos luminales hacia la ampolla, mientras que en la fase lútea las contracciones



segmentares mueven gradualmente el cigoto hacia el útero. El cigoto necesita de 4-5 días para atravesar el istmo (20).

- **Útero:** es corto, de forma tubular bicorne, con cuernos extremadamente largos. Está situado en una posición dorsal al intestino delgado y consta de tres partes que son cuernos, cuerpo y cuello uterino, los cuales se describen a continuación (8):

1) **Cuernos:** rectos y con un diámetro de 3-4 mm y una longitud de 12-15 cm. Ambos cuernos divergen, formando una especie de V, y se dirige craneal y dorsalmente para situarse detrás de los ovarios (Figura 1), se ubica casi en su totalidad en la cavidad abdominal.

2) **Cuerpo:** es corto midiendo alrededor de 2 cm de longitud y se encuentra en la cavidad abdominal, ventral al recto y dorsal a la vejiga urinaria.

3) **Cuello:** es corto y posee una capa muscular gruesa. Caudalmente, el cuello se proyecta en el interior de la vagina, formando ventralmente una proyección que deja un fondo de saco en la pared vaginal (21). La mucosa uterina forma pliegues longitudinales espirales. El medio de fijación es el mesometrio, que es peritoneo que se continúa cranealmente con el mesosalpix (Figura 1) y con el mesoovario.

- **Vagina:** es estrecha cranealmente y no se distingue el fórnix. Posee una capa muscular gruesa formada por fibras circulares, en cuanto a la mucosa esta forma pliegues longitudinales (18). Se extiende entre el cuello uterino y el vestíbulo, entre estas estructuras en la zona del piso, se encuentra una hendidura, a través de la cual la uretra se conecta con el piso vestibular (Figura 1).

3.1.2. Órganos externos

- **Vestíbulo:** conecta la vagina y la entrada de la uretra con la abertura genital externa (Figura 1). En esta zona se encuentran las glándulas vestibulares mayores que en la gata son pequeñas (ausente en la perra), y se ubican en la parte lateral del vestíbulo (17).

- **Vulva:** la vulva está formada a cada lado por un labio, que se encuentran con el otro en las comisuras o ángulos vulvares dorsal y ventral. Forma parte de los genitales externos y cuyos labios terminan en la prominencia ventral (20).
- **Clítoris:** se encuentra en el ángulo o prominencia ventral de la vulva. Esta estructura es análoga al pene, está compuesta por dos pilares que se originan en el arco isquiático el *Corpus clitoridis* y el *Glans clitoridis*.

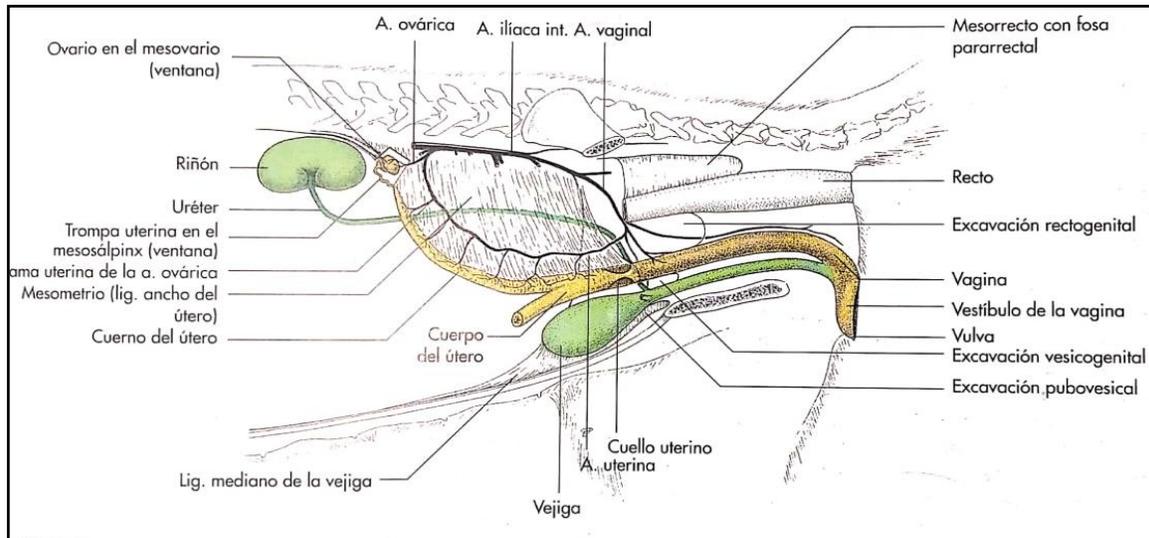


Figura 1. Tracto reproductor de la hembra. Tomado de König y Liebich (2011) (18).

3.2. Fisiología reproductiva felina

3.2.1. Ovogénesis

El número de gametos que posee la hembra doméstica está fijado desde el momento del nacimiento y serán los únicos capaces de ser fecundados. La ovogénesis o formación de los ovocitos comienza durante la vida embrionaria (19,22)

La gametogénesis se da durante la vida intrauterina, en donde la célula se llegará a ser un gameto femenino de características con plena capacidad para ser fecundados. Durante la gametogénesis es necesario un proceso de reducción cromosómica y un proceso propio de crecimiento del ovocito, al incorporar



sustancias nutritivas necesarias para mantener los estadios iniciales del desarrollo embrionario (17).

El proceso de reducción cromosómica se le denomina meiosis y es imprescindible para que el ovocito se ha fecundado, las oogonias entran en meiosis en la vida intrauterina y se detendrá en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación, completándose únicamente al momento de la fecundación. El proceso meiótico consta de dos divisiones denominadas meiosis I y meiosis II, divididas cada una a su vez en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase (20).

3.2.2. Fisiología del ciclo estral

La gata doméstica al igual que otros mamíferos domésticos como la yegua, la cabra y la oveja son paléstricas estacionales, es decir ciclan repetidamente durante una estación reproductiva a menos que sea interrumpida por factores fisiológicos como la gestación o patológicos como la pseudopreñez, enfermedad y estados de estrés (7).

Los ciclos estrales de las gatas se extiende de 14 a 19 días, en aquellas que han sido sometidas a 14 horas luz diarias, y al ser expuestas a estas horas por tiempo indefinido, la gata podrá ciclar todo el año, por lo contrario, en gatas que han sido expuestas a menor o igual a 8 horas luz diarias, la actividad ovárica cesa, y consecuentemente la hembra entra en anestro estacional (23).

Las hembras empiezan a ciclar a partir de los 5 a 10 meses de edad, esto está determinado por múltiples factores, como la presencia del macho, tipo de pelo (23), tiempo de exposición a la luz (≥ 14 horas) y el peso de la hembra (1,5-2 Kg), siendo estas dos últimas las más relevantes en felinos (8).

La estacionalidad reproductiva de los felinos está íntimamente relacionada al fotoperiodo, y por lo tanto, con la concentración plasmática de melatonina, hormona secretada por la glándula pineal (24). La secreción de melatonina sigue un ritmo circadiano, es liberada en periodo de oscuridad, momento en que es sintetizada, por lo contrario, en periodos de luz, su síntesis y secreción es inhibida.



Cuando existen noches largas, hay mayores horas de oscuridad y por ende se produce mayor cantidad de melatonina, lo que produce un bloqueo en los pulsos de GnRH, y cuando existen noches cortas que generalmente se da durante el verano, la duración de la secreción de melatonina también es corta, y como consecuencia existe menor concentración sérica de melatonina y una producción de pulsos de GnRH.

La liberación pulsátil de GnRH provoca la liberación pulsátil de gonadotrofinas hipofisarias, especialmente de la hormona luteinizante (LH), la que produce en la hembra el comienzo del periodo reproductivo (23). Por otro lado, la ovulación de la gata ocurre por un reflejo neuroendocrino iniciado por una estimulación mecánica de los receptores sensoriales de la piel en la región perianal, en la vulva y el cérvix durante el coito, o por una estimulación similar al mismo.

Esta estimulación causa la secreción de GnRH, la cual determina la liberación pulsátil de LH y FSH que desencadena la ovulación. La duración y magnitud de la liberación de LH están relacionadas con la cantidad de estimulación recibida, y es necesario que la gata sea servida o estimulada mecánicamente varias veces durante el día para alcanzar la ovulación (7).

La ovulación se da 24-64 horas después de la estimulación, al romperse los folículos preovulatorios presentes en los ovarios. La descarga óptima de LH se observa cuando se produce un máximo de apareamientos durante un período de 2 a 4 horas (25). Un estímulo coital adicional más allá de este período de tiempo puede no incrementar de manera significativa la descarga de LH. Los valores de esta hormona van desde 10 ng/ml antes del apareamiento a más de 100 ng/ml después de la estimulación máxima (23).

3.2.2.1. Fase folicular

Fase folicular llamada también fase estrogénica debida a la importante cantidad de estrógenos secretados. Es una fase muy variable debido a que se acorta o alarga debido a las variaciones que puede haber en la misma. La fase folicular empieza con un reclutamiento de un grupo de folículos, de estos se selecciona uno, al cual lo denominaremos folículo dominante, el cual va madurando y aumentando de



tamaño, hasta el día de la ovulación, momento en el que el folículo se rompe y libera al ovocito. Después de la ovulación el ovocito es liberado en los oviductos y dirigida hacia el útero (17).

▪ **Foliculogénesis**

La foliculogénesis es un proceso altamente selectivo y empieza en la vida fetal. En su proceso va desde reclutamiento del folículo primordial al *pool* de folículos en crecimiento y finaliza con la ovulación, o bien con la desaparición del folículo en atresia. Los folículos primordiales al sufrir una serie de complejos fenómenos de proliferación y diferenciación se transforman en folículos preantrales, en cada ciclo cada uno de ellos va a completar su maduración (selección, crecimiento y dominancia del folículo de graff), el resto acabará sufriendo el proceso de atresia folicular (22).

La maduración folicular se da en dos fases una preantral, donde el folículo sufre procesos de crecimiento y diferenciación, esta fase es independiente de gonadotrofinas, es decir está sometida a un proceso de regulación autocrino/paracrino por factores de crecimiento locales y la fase antral que es dependiente de gonadotrofinas fundamentalmente de la hormona foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), en esta fase se produce un enorme crecimiento folicular (7). Los folículos a su vez pueden ser clasificados como primordiales, primarios, secundarios y de graff.

- 1. Folículos primordiales:** son los únicos folículos presentes en la hembra antes de la pubertad. Contiene un ovocito primario detenido en la metafase de la primera división meiótica, se encuentra rodeado de una sola capa de células aplanadas, llamadas células foliculares (células de la granulosa) (26).
- 2. Folículos primarios:** contiene un ovocito primario rodeado por varias capas de células foliculares y a medida que el ovocito va creciendo (Figura 2), las células aplanadas se convierten inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas (25). Entre el ovocito y las células granulosas circundantes se originan espacios en donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida y está formada por glicoproteínas que produce el ovocito. La



adquisición de zona pelúcida es la característica de un folículo primario y a medida que los folículos aumentan de tamaño van desplazándose gradualmente al interior de la corteza (17).

3. **Folículos secundarios:** en el caso de los folículos secundarios las células foliculares forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de la granulosa, las cuales tienen la capacidad de sintetizar tres tipos de esteroides ováricos (27) en cantidades limitadas que son: progestágenos, andrógenos y estrógenos. En esta fase además se completa la maduración de la zona pelúcida (Figura 2), posee glicoproteínas, mucopolisacáridos, ácido siálico y hialurónico, que poseen propiedades funcionales durante la fecundación.
4. **Folículos terciarios:** al desarrollarse el folículo secundario las células de la granulosa empiezan a producir líquido folicular en respuesta a las gonadotrofinas, líquido que se almacena paulatinamente en el espacio intercelular, formando fisuras entre ellas, las cuales se van uniendo hasta construir una cavidad (antro folicular) (Figura 2). Con la aparición de la cavidad antral, el folículo se convierte en terciario (26).

En el folículo terciario las células de la teca se dividen en dos capas, la teca interna la cual es vascularizada y glandular y la teca externa formada de tejido conectivo y células de músculo liso. Al desprenderse el ovocito una o más capas de las células del cumulus permanecen unidas, formando la corona radiata, envoltura celular laxa que persiste después de la ovulación (8). Después de haber formado bastante cantidad de líquido en su interior sigue aumentando en tamaño, y se va acercando a la superficie del ovario donde, en varias especies puede ser palpado y descubierto como una masa redonda a manera de un quiste (28) (Figura 2).

En animales politocos como la gata con más de un descendiente en cada gestación, se presenta la ruptura de varios folículos al mismo tiempo o con poca diferencia, a veces de uno o de ambos ovarios. Se desconoce la causa inmediata que provoca la madurez de determinado folículo (21).



5. Folículos atrésicos: no todos los folículos primordiales que comienzan a desarrollarse llegan a madurar. El resto de los folículos no ovulados se degeneran progresivamente, proceso conocido como atresia folicular (29) (Figura 2). Existen dos tipos de atresia: atresia quística, es cuando un proceso de degeneración del folículo mantiene por un cierto tiempo el antro folicular antes de desaparecer y la atresia obliterativa en el cual desaparece rápidamente el antro folicular (16).

3.2.2.2. Fase luteal

Después de la ovulación empieza la fase lútea o del cuerpo amarillo (Figura 2), y el tiempo de vida del cuerpo lúteo depende de si la hembra ha quedado gestante en este caso se extiende alrededor de 66-70 días. En el caso de que se haya producido la ovulación, pero no fecundación, el tiempo de este puede ser de 40 días, conocido también como pseudogestación (22).

Las células del cuerpo hemorrágico, que corresponden a las células de la granulosa y a las de la teca interna, comienzan una transformación, conocida como luteinización, que consiste en el aumento de volumen y número de las células, las cuales además sufren cambios bioquímicos y morfológicos. El proceso de luteinización da como resultado el desarrollo de células con capacidad de producir progesterona, ya que las anteriores (granulosa y teca interna) también tenían capacidad esteroidogénica (células lúteas) (7).

Se pueden distinguir dos tipos de células lúteas (8): las células lúteas grandes, estas se originan a partir de las células de la granulosa y son poligonales con núcleos esféricos prominentes y vesiculares que aunque producen oxitocina, producen principalmente progesterona, el 70% de la progesterona luteal sin estímulo gonadotrópico (LH). Las células luteales pequeñas producen el 30% restante, únicamente bajo estímulo de LH producen oxitocina (26).

Cuando no ha existido gestación o pseudogestación se da la regresión del cuerpo lúteo o llamada también luteólisis, ocurriendo proliferación del tejido conjuntivo, denominándose cuerpo blanco (Figura 2), que será reabsorbida paulatinamente (8).

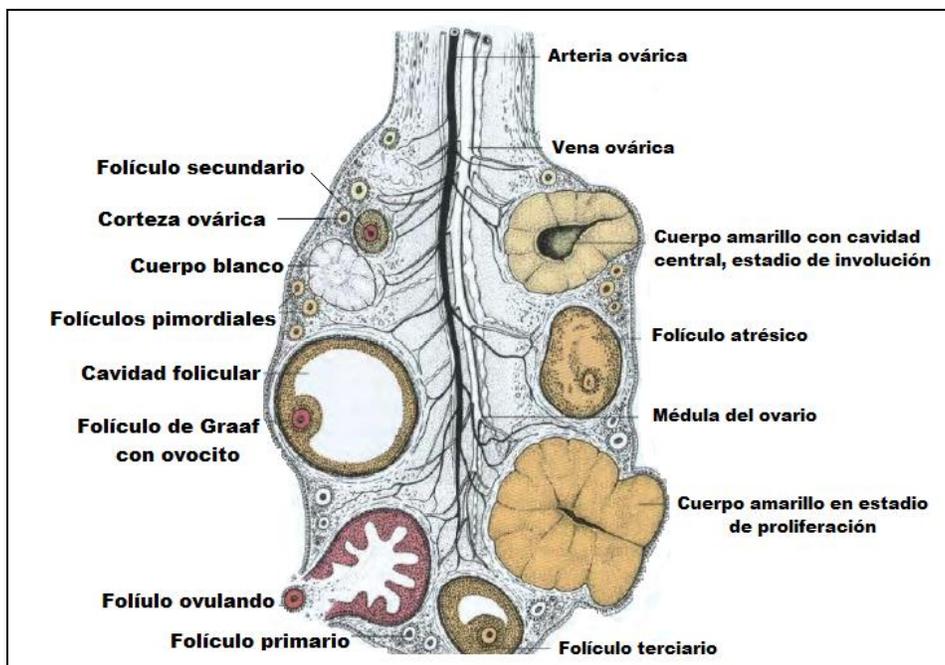


Figura 2. Representación esquemática del ovario en diferentes etapas funcionales del ciclo. Tomado de Grau y Walter (1967) (27).

3.2.3. Fases del ciclo estral

El ciclo estral felino se divide en cuatro periodos, proestro, estro, interestro y anestro, cada uno de ellos se caracteriza por tener ciertas particularidades, se producen cambios tanto a nivel de órganos reproductores externos como internos, y también se aprecian cambios a nivel comportamental (30).

3.2.3.1 Proestro

Es un periodo del ciclo estral cuya duración es breve de apenas 24 horas, y puede pasar inadvertida o durar de 1-2 días. Es el momento de actividad folicular (síntesis y secreción de estrógenos), cambios en la citología vaginal y preparación para el apareamiento y preñez. En este periodo los folículos ováricos desarrollan desde un diámetro aproximado de 0,5 mm a 1,5 mm (31), se determina que al final de esta fase existen alrededor de 3-7 folículos dominantes.

Los estrógenos llegan a concentraciones superiores a 20 pg/ ml (26). El aumento de las concentraciones séricas de estrógeno se relaciona con el comportamiento afectuoso de la hembra, y características conductuales como fricciones, pisoteo con



los miembros posteriores, vocalizaciones y menos hostilidad hacia el macho, periodo en que la hembra atrae al macho, pero no permite la monta (7).

3.2.3.2 Estro

Es el momento en que la hembra acepta el servicio, y la síntesis y concentración sérica de estrógenos llega a los niveles más altos, que va de 40-80 pg/ml. La duración promedio de este periodo es de 6-10 días (32). Debido a las altas concentraciones de estrógeno plasmático, la gata aumenta las vocalizaciones, presenta lordosis, mantiene la cola hacia un lado aceptando la cópula. Este aumento de estrógeno no solo produce cambio del comportamiento, sino que también actúa sobre el epitelio vaginal produciendo la cornificación de este (8).

3.2.3.3 Interestro

Se da debido a la ausencia de apareamiento u ovulación espontánea, es definida como la etapa que le sigue a un estro y precede al estro siguiente. La duración de este periodo varía entre 8-10 días promedio. Los niveles de estrógenos a nivel sérico tanto en interestro como en anestro son inferiores a los 15 pg/ml (7).

3.2.3.4 Diestro

Se da cuando ha existido la ovulación ya sea por cópula o por estimulación, pero no ha habido fertilización de los ovocitos. Los folículos se luteinizan y se forman cuerpos lúteos que secretan progesterona. La fase luteal es más corta que la gestación, y se denomina pseudogestación (Figura 4).

En este periodo los niveles séricos de la progesterona llegan a ser mayores de 20 pg/ml (30). La vida media de los cuerpos lúteos es de 25-35 días y a la final de esta fase un periodo de interestro, procede al siguiente estro siempre y cuando las gatas estén en etapa reproductiva. En consecuencia, la duración de la pseudogestación es de 40 días (Figura 4). En esta fase la citología vaginal presenta las mismas características que en el interestro (7).

3.2.3.5 Anestro

Es el periodo caracterizado por la ausencia de los ciclos estrales y puede durar entre 90-150 días (variable). Esta fase ocurre cuando disminuyen las horas luz con el

consiguiente aumento de la melatonina y prolactina son sincrónicas, se elevan durante los periodos de oscuridad y disminuyen durante los periodos de gran intensidad lumínica. Por lo tanto, el anestro felino se caracteriza por niveles elevados de prolactina y melatonina, y niveles basales de estrógenos y progesterona (23).

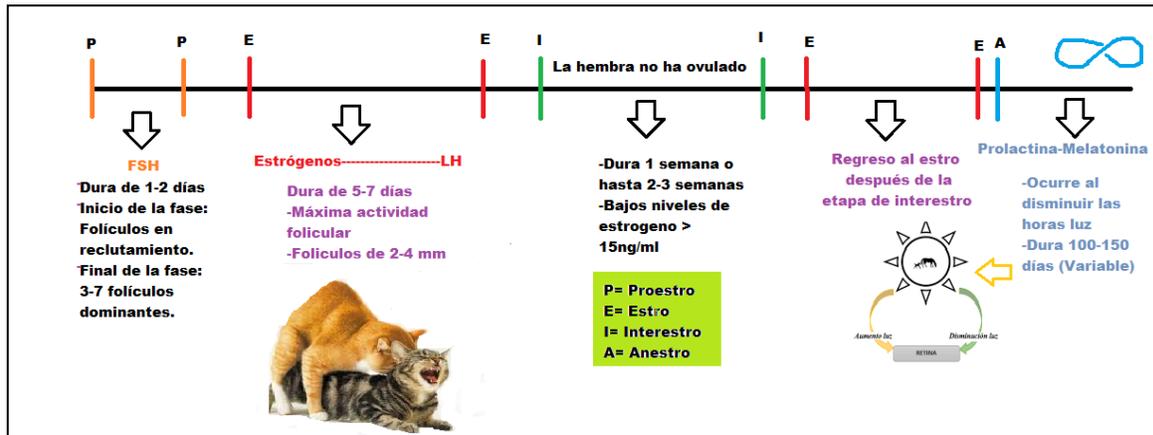


Figura 3. Fases del ciclo estral en la hembra felina. Adaptado de Bristol y Woodruff (2006) (26), Jewgenow y Paris (2006) (27), Malandian et al. (2011) (25).

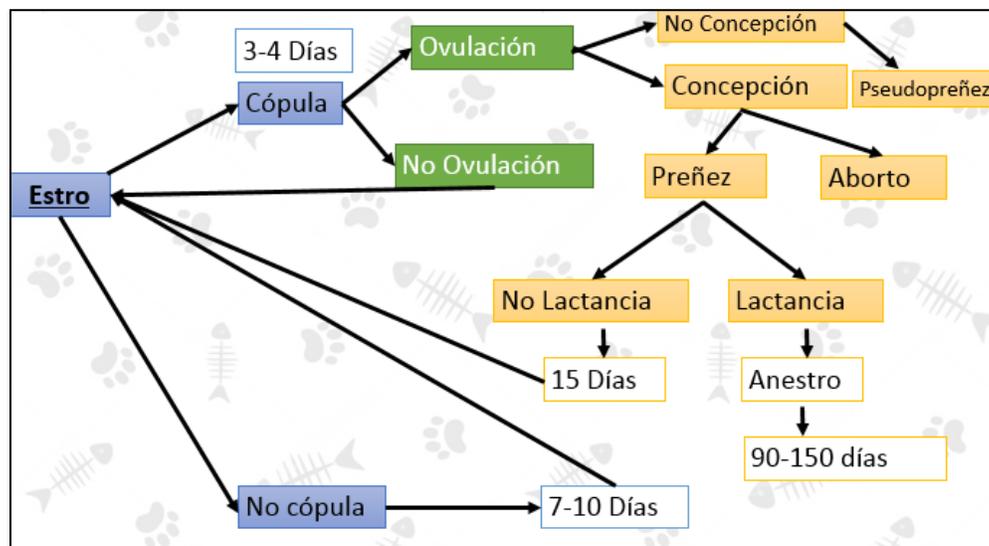


Figura 4. Esquema general del ciclo estral en la hembra felina. Adaptado de Royal Canin, Comunidad gateros (2013) (41).



3.3 Citología vaginal en la detección del ciclo estral

La citología es una herramienta muy importante en teriogenología, en el caso de las hembras especialmente caninos y felinos se puede usar para determinar en qué etapa del ciclo reproductivo se encuentran, realizándose comúnmente citologías vaginales que consisten en introducir un hisopo humedecido en la parte dorsal de la hendidura vulvar, colocando la muestra en un portaobjetos y luego de teñirlo se observa mediante microscopía, donde se visualiza cambio de celularidad (33).

Se considera la vagina se encuentra formada por células epiteliales cuboides que al ser saludables estas se clasifican como no cornificadas y estas a su vez en células parabasales e intermedias (20). Bajo la influencia del estrógeno estas células son estimuladas para dividirse. A medida que se dividen y se engrosa el recubrimiento vaginal, las células más cercanas al lumen se tornan no viables, y pierden la apariencia característica de un monocapa celular saludable. Las células deformes y en grupos se clasifican como cornificadas. Los tipos específicos de las células son las superficiales y las escamosas anucleadas (21).

3.2.4. Proestro

La población celular cambia de completamente no cornificada, a principios de este ciclo a completamente cornificadas a finales de él. Se da la presencia de glóbulos rojos en esta etapa. Hay células polimorfonucleares (PMN) a comienzos del proestro, pero son menos evidentes a medida que el epitelio se engrosa a finales de esta fase (30).

3.2.5. Estro

Durante esta fase, el epitelio está en su máximo espesor, con una capa prominente de células queratinizadas sobre la superficie luminal. El estro se define citológicamente al 100% por células cornificadas, y más del 50% de ella son células escamosas anucleadas (Figura 5). No existe la presencia de células polimorfonucleares (PMN), y puede haber glóbulos rojos y bacterias comúnmente evidentes (34). En consecuencia, la citología vaginal de la fase folicular (proestro y estro), presentará células superficiales nucleadas y anucleadas. Las células



superficiales son grandes, de bordes irregulares, núcleo oval y picnótico o sin núcleo (Figura 5) (35).

3.2.6. Interestro

Las células intermedias son más pequeñas que las superficiales, con contornos celulares regulares y núcleo redondo u oval, el cual puede estar picnótico. Mediante citología vaginal puede observarse una media de células intermedias, células superficiales en menor proporción (Figura 5) y ocasionalmente pueden visualizarse neutrófilos (8).

3.2.7. Diestro

Al inicio de esta fase se pierden abruptamente las células cornificadas. La citología es no cornificada y puede haber muchos polimorfonucleares (PMN), en los primeros dos días del diestro. En un estudio realizado por Sánchez et al. (2013) (11) determinaron que en la citología vaginal existe un predominio de células parabasales ($35,5 \pm 21,8$) e intermedias ($37,9 \pm 15,3$) sobre las superficiales ($26,6 \pm 16,4$) (Figura 5), sugiriendo que en el diestro las hembras presentan un mayor índice de células parabasales e intermedias.

3.2.8. Anestro

En esta etapa la citología vaginal presenta contenido mucoso, predominio de células parabasales y una escasa cantidad de células intermedias y leucocitos. Las células parabasales se caracterizan por ser redondas, con bordes celulares regulares y poseer una relación núcleo citoplasma disminuida (Figura 5). Este periodo se caracteriza por la presencia de pocas células, todas no cornificadas, y en ocasiones pueden verse algunas PMN saludables (30).

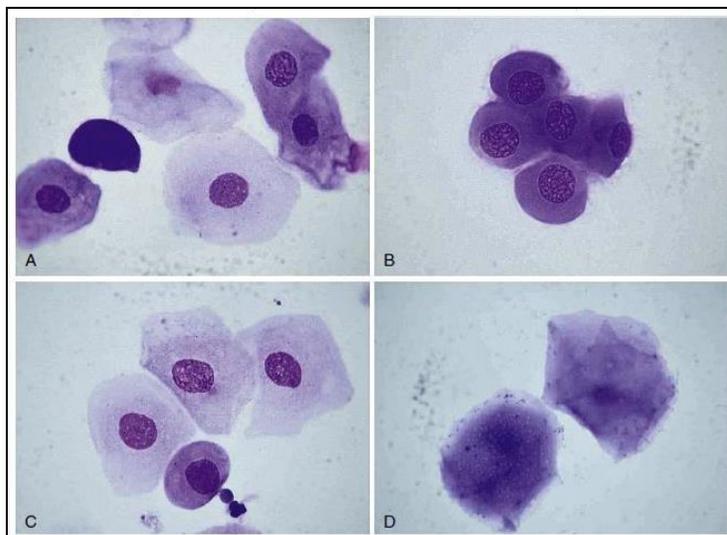


Figura 5. Tipo de células epiteliales a conocer en la citología vaginal A. Células basales pequeñas y basofílicas, B. Células parabasales, C. Célula parabasal: basofílica y tres células intermedias. D. Célula superficial o cornificada. Tomado de Delfino et al. (2018) (36)

3.4 Citología uterina (endometrial)

En la citología endometrial es muy importante determinar qué tipo de células se pueden encontrar, y las que comúnmente se encuentran son células endometriales normales (CEEN) (Figura 6) y células endometriales degenerativas (CEED) (Figura 6 y 7), también se puede encontrar eritrocitos, linfocitos, eosinófilos, macrófagos, células plasmáticas, células vaginales, cervicales, bacterias y material amorfo, además de mucus y detritus celulares (37).

Las CEEN (Figura 7) a su vez se subdividen en epitelio luminal y epitelio glandular pero muchas veces no puede ser adecuadamente visualizado debido a sus semejanzas morfológicas (11).

Las CEEN (Figura 6) se caracterizan por presentar dos ejes, uno mayor y otro menor observándose células ovaladas, con un núcleo central o hacia un polo de la célula, levemente ovalado o redondeado. Además, es frecuente observarlas en monocapas, agrupadas, y con formas acinares. Las células aisladas presentan

citoplasma, núcleo y nucléolo bien diferenciado, con una relación núcleo- citoplasma similar y un patrón de cromatina levemente granular.

Las CEED (11) presentan forma irregular, citoplasma con pequeñas vacuolas con deformaciones y núcleos picnóticos, con pérdida de su forma o sin presencia de núcleo (Figura 7).

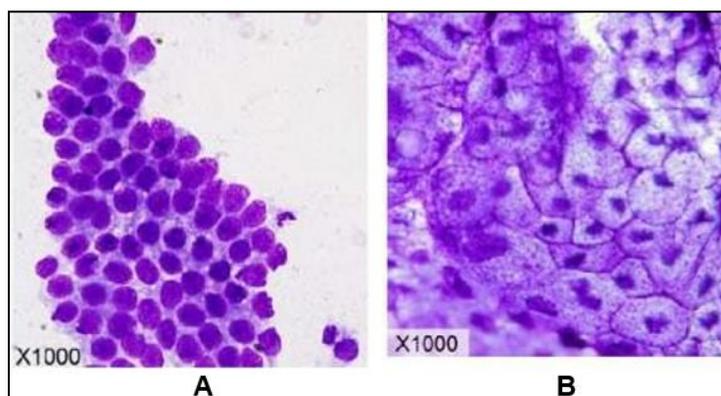


Figura 6. Citología endometrial del útero perra. (A) Células epiteliales endometriales normales (CEEN). (B) Células epiteliales endometriales están agrandadas (CEED) Citología degenerativa (aumento 1000). Tomado de Groppetti et al. (2010) (37).

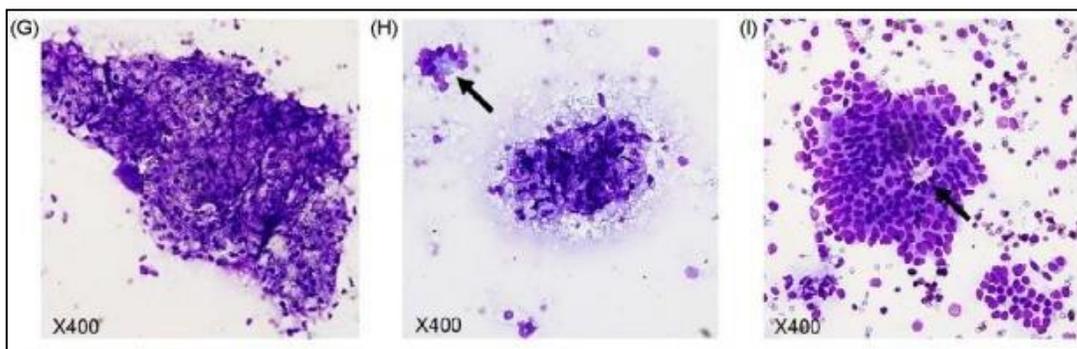


Figura 7. Citología endometrial del útero perra. (G) Anestro temprano (CEED). (H) Anestro medio (CEEN y CEED (flecha)). (I) Anestro tardío. Grupo grande de células epiteliales endometriales que mantienen una disposición glandular con luz central abierta (flecha). Tomado de Groppetti et al. (2010) (37).



3.5 Definición y características morfológicas del ovocito

Los ovocitos son células germinales femeninas y su formación se da por un evento temprano en el desarrollo embrionario que se produce en el endodermo del saco vitelino a partir de células germinales primordiales que emigran hasta la cresta gonadal antes de diferenciarse en ovocitos. Durante el desarrollo fetal las células germinales del ovario sufren un proceso de diferenciación. Inicialmente se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica.

Sufriendo toda la población de ovocitos este proceso en la vida fetal. Al nacimiento el ovocito presenta la primera detención de diplotene en profase I (38) y esta se mantiene hasta la ovulación y es importante para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación, de modo que sea capaz de mantener el proceso de la embriogénesis (39).

Después de la pubertad la hembra empieza a ciclar y las características morfológicas de los ovocitos irán acorde al estadio folicular en el que se encuentren. Se conoce que existen mejores características morfológicas para proseguir con la maduración y fecundación en ovocitos obtenidos de folículos mayores a 2 mm de diámetro (31). Las características morfológicas que generalmente se evalúan en un ovocito son:

- Corpúsculo polar
- Espacio perivitelino
- Zona pelúcida
- Citoplasma

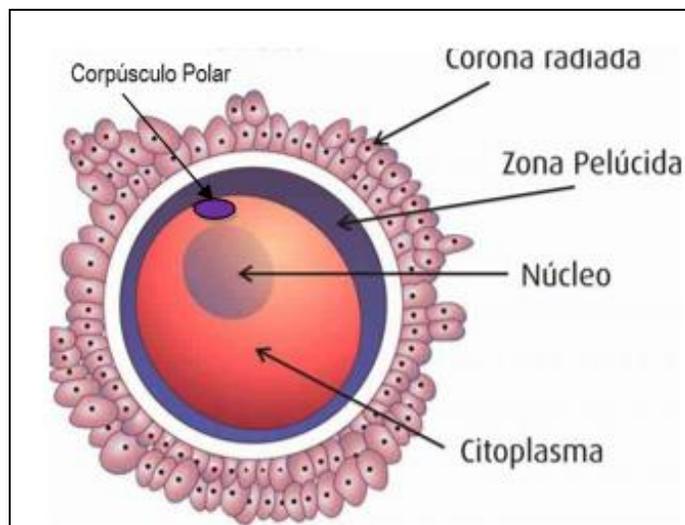


Figura 8. Estructura del ovocito. Tomado de Belmonte (2020) (42)

3.5.1 Evaluación de la calidad de ovocitos

2.5.1.1. Evaluación morfológica.

El criterio de clasificación de los COC´s se fundamenta en los aspectos morfológicos de las células del cumulus oophorus, así como la homogeneidad del citoplasma del ovocito y la integridad de la zona pelúcida. Existen criterios que se han obtenido previamente para la especie *Felis catus* (29), y se clasifica en 4 categorías: categoría I, con un citoplasma oscuro homogéneo, redondo, con 5 o más capas compactas de células de la granulosa; categoría II, con un citoplasma oscuro uniforme, rodeada por menos de 5 capas de células de la granulosa; Categoría III con pérdida de la homogeneidad del citoplasma, las capas de células de la granulosa son menos compactas; y categoría IV, con citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado, células de la granulosa se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

2.5.1.2. Evaluación morfométrica.

Otra forma de clasificar a los ovocitos de acuerdo con su calidad se fundamenta en la evaluación de la morfometría, basándose en las medidas de diámetro total del volumen del ovocito (sin considerar zona pelúcida), espacio perivitelino y espesor de la zona pelúcida.



- **Diámetro del ovocito:** el diámetro de los ovocitos es un factor muy importante para la clasificación, debido a que se encarga de condicionar la capacidad de maduración del ovocito, por ende, la tasa de maduración nuclear aumenta junto con el diámetro (40).
- **Volumen del ovocito:** este parámetro es utilizado con frecuencia para evaluar la efectividad en la criopreservación debido a que los cambios en el volumen no deben sobrepasar $\pm 30\%$ (41). El volumen del ovocito es expresado en micras cúbicas y el aumento del mismo va en sincronía al crecimiento de los folículos, aumentando este a partir del folículo primario (39).
- **Espacio perivitelino (EPV):** es el área que se encuentra situada entre la zona pelúcida y citoplasma del ovocito, se asemeja a una matriz extracelular formado durante la ovogénesis y su tamaño varía considerablemente durante el desarrollo del ovocito. El EPV tiene un papel importante antes, durante y después de la fecundación, muchos autores hallan una correlación entre su tamaño con la tasa de fertilización, siendo afectada notablemente cuando el espacio perivitelino es mayor (17).
- **Espesor de la zona pelúcida:** la zona pelúcida (ZP) es una matriz extracelular translúcida, compuesta por una matriz de glicoproteínas que rodea al ovocito y al embrión preimplantado de los mamíferos. El grosor de la ZP de los ovocitos varía entre especies e incluso en ovocitos del mismo animal (42). La diferencia en grosor implica que la cantidad proteica varía de una especie a otra. Así, el contenido proteico oscila entre 1 y 30 ng (43). Tiene un papel importante durante la fertilización hasta la implantación del embrión. Se encarga de mediar el reconocimiento inicial de espermatozoides-óvulo y después de la fertilización es sometida a modificación estructural y bloqueo de la poliespermia (44).

2.5.1.3. Prueba azul brillante de cresilo (BCB)

La prueba azul brillante de cresilo (BCB por sus siglas en inglés), es un procedimiento no invasivo que refleja la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato-



deshidrogenasa (G6PDH) en el ovocito (12). Se conoce que la G6PDH, una enzima componente de la vía pentosa fosfato que participa la síntesis de nucleótidos y NADPH. Esta enzima es capaz de degradar el BCB. Esta enzima es más activa en los ovocitos en la fase de crecimiento, por lo tanto, los ovocitos en crecimiento expuestos al BCB serán incoloros mientras que los que ya culminaron su crecimiento el citoplasma se observa de color azul (BCB+).

Hasta ahora el uso de BCB ha sido efectivo en diferentes especies de mamíferos, incluyendo, humanos (45), vacas (16), cabras (4). Se ha demostrado que la tinción BCB puede contribuir como una prueba complementaria a la evaluación visual de las características morfológicas como el grosor y la compacidad de células del cúmulus y la homogeneidad del citoplasma oscuro para la selección de ovocitos y la obtención de mayor porcentaje de embriones (16).

2.5.1.4. Ultraestructura de los ovocitos y expresión de genes

La ultraestructura permitirá predecir la competencia de desarrollo de los ovocitos y facilitar el desarrollo de los medios de maduración y cultivo apropiados (16). Según Paz (2004) (6), el análisis ultra estructural de ovocitos en *Leopardus pardalis* y *Leopardus tigrinus* se realizó mediante el uso del estereomicroscopio, y luego donde luego de ser clasificados morfológicamente como grupos I, II, y III, los ovocitos se sometieron a un análisis histológico con cortes semifinos y ultrafinos que mediante microscopia electrónica se clasificaron a los ovocitos en tres grupos:

- **Ovocitos grupo I:** en cortes semifinos fueron caracterizados por presentar citoplasma homogéneo y zona pelúcida compacta rodeada por células de cumulus. En cortes ultra-finos fueron caracterizados por presentar núcleo irregular contenido de heterocromatina dispersa y envoltura nuclear formando grandes ondas. Mitocondrias, gránulos corticales y vesículas con material lipoproteico, reunidas y distribuidas por todo el citoplasma y también alrededor del núcleo. Gotas de lípidos de varios tamaños fueron encontrados en esta etapa. En microscopia electrónica de barrido apenas un ovocito fue fotografiado presentándose parcialmente desnudo (46).



- **Ovocitos grupo II:** en corte semifinos fueron caracterizados por no presentar citoplasma homogéneo con zona pelúcida y células de cumulus envolviendo apenas parcialmente a la célula. En cortes ultrafinos fueron caracterizados por presentar núcleo periférico con elevaciones en la envoltura nuclear. Pequeñas áreas de heterocromatina podrían ser vistas próximas a la envoltura nuclear. Numerosas proyecciones de células de cumulus que penetran en la zona pelúcida podrían ser observadas. En esta etapa había grande concentración de gotas lipídicas, gránulos corticales y vesículas dispersas por todo el citoplasma.
- **Ovocitos grupo III:** en cortes semifinos fueron caracterizados por presentar formas anormales con ausencia de células de cumulus y zona pelúcida. En cortes ultrafinos fueron caracterizados por presentar núcleo central sin ondas en la envoltura nuclear, además de gotas de lípidos y gránulos corticales distribuidos por todo el citoplasma (6).



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Materiales físicos

- Guantes de inspección
- Filipina
- Papel secante
- Mandil
- Jeringas 5 ml
- Jeringas 20 ml
- Caja poliestireno
- Equipo de disección

4.1.2. Materiales biológicos

- Ovarios de gata
- COC's

4.1.3. Materiales químicos

- Tinción iff quick
- Lactato de ringer
- Azul Brillante de Cresilo (C.I.51010) PanReac-AppliChem

4.1.4. Materiales de laboratorio

- Puntas de pipetas automáticas
- Pipetas automáticas
- Pinzas
- Guantes de nitrilo
- Caja petri cuadrada cuadrada
- Baño maría
- Estéreo microscopio
- Cámara de alta definición (Excelis AU-600-HDS) (S/N 1506417-S) Elaborado en China
- Software image J (última versión 1.52p -2019)

4.2. Métodos

4.2.1. Área de estudio

El presente estudio se realizó en la ciudad de Cuenca provincia del Azuay, Ecuador. Hubo dos procedimientos a realizar, uno consistió en la ejecución de esterilizaciones de gatas las cuales se llevaron a cabo en la Clínica Veterinaria y el procesamiento de ovarios y recolección de COC's que se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, ambas instalaciones pertenecen a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. En ambos lugares predomina el clima templado con precipitaciones durante todo el año, y una temperatura promedio de 14 °C. De acuerdo a la ubicación la latitud de la Clínica Veterinaria es de -2.9174142 y altitud 2,560 m.s.n.m y latitud -3.0801834 y altitud 2700 m.s.n.m. para el laboratorio de biotecnología de la reproducción.



Figura 9. Ubicación Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca y Laboratorio de Biotecnología. Obtenido de Google Maps (2013).

4.2.2. Animales del estudio

Para el estudio se utilizaron 20 gatas mestiza (*Felis catus*), la edad media fue de $1,57 \pm 0,53$ años, un peso medio de $2,47 \pm 0,48$ kg, y una condición corporal (CC)



de $2,5 \pm 0,36$, en la que 1 es delgada y 5 es obesa (47). Previamente cada gata fue sometida a una exploración física para verificar que se encontraban sanas.

4.2.3. Unidad experimental

Las unidades experimentales en este estudio fueron los ovarios recolectados de 20 gatas siendo evaluados morfométricamente por su largo, ancho y peso, de estos ovarios se obtuvieron los COC´S, los cuales fueron clasificados según su morfología en tipo I,II,III,IV quienes posteriormente fueron evaluados de acuerdo a su morfometría, por otro lado, las citologías del tracto reproductor (vagina y útero) se basaron en la forma, tamaño y número de células, permitiéndonos establecer la fase del ciclo estral en la que se encontraban las gatas.

4.2.4. Diseño experimental

El estudio fue observacional descriptivo basado en diferentes momentos de valoración una vez obtenida la unidad muestral.

1. Las hembras seleccionadas, previo a el proceso quirúrgico fueron sometidas a hisopado del epitelio vaginal para la obtención de una muestra que sirvió para la realización de un frotis y posterior valoración de la morfología celular de esta región.
2. Proceso quirúrgico (OVH), para la remoción de todo el tracto reproductivo que incluyó ovarios, cuernos, cuerpo y cuello uterino.
3. Hisopado del epitelio del útero (cérvix, cuerpo) y realización del frotis para la valoración de la morfología celular.
4. Separación y obtención de ovarios, que fueron almacenados en una solución isotónica a una temperatura de 35°C y transportados hacia el laboratorio de biotecnología animal.
5. En el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la Facultad de Ciencias Agropecuarias se procedió al procesamiento de los ovarios. Este procedimiento incluyó: la observación y valoración de los folículos bajo un estereomicroscopio y la posterior obtención de COC´s.



4.3. Obtención de muestras citológicas

4.3.1. Vaginal

Para la citología vaginal se usaron hisopos estériles los cuales se humedecieron en solución fisiológica, para posteriormente introducirlos en la vagina en un ángulo de 45° hasta tocar el punto dorsal de la hendidura vulvar. En este lugar se realizaron giros en contra de las manecillas del reloj, y finalmente, se procedió a retirar el hisopo suavemente. A continuación, en un portaobjetos estéril se realizó un barrido con el hisopo en tres ocasiones consecutivas, se dejó secar al aire libre, para luego introducir el portaobjetos en la tinción de Diff Quick (11) (durante 45 segundos). Se procedió a lavar cuidadosamente con agua corriente y se realizó inmediatamente la observación en un microscopio (lente de 20x y 40x) (37) e interpretación, según el tipo de células que predomina en la zona (células cornificadas o no cornificadas), y cuya proporción cambió de acuerdo a la fase del ciclo estral en la que se encontraban las hembras (8).

4.3.2. Uterina

Una vez terminada la intervención quirúrgica, se recuperó todo el tracto reproductivo y posteriormente se identificó cada región, y se procedió a pinzar el tracto reproductivo a nivel de los cuernos y del cuerpo del útero. De manera simultánea se realizó el procedimiento descrito por Sánchez y Stamatiu (2017) (11) para realizar la citología de todo el útero, que consistió en realizar una incisión longitudinal de 3cm, en cada sección del tracto reproductivo, luego se introdujo un hisopo estéril humedecido diferente para cada sección, y con una suave presión y ligeros movimientos de rotación sobre la mucosa uterina se procedió a tomar la muestra.

El procedimiento para preparar la placa y teñir la misma, fue el que se describió para la muestra vaginal, en el acápite anterior (citología vaginal). En cuanto a la interpretación nos basamos en el tipo de celularidad que existe en esta zona, y que se caracteriza por la presencia de células endometriales normales (CEEN) o células endometriales en degeneración (CEED) (11), la misma que cambió de acuerdo con la fase del ciclo estral en la que se encontraban las hembras.



4.4. Obtención y traslado de ovarios

Previamente antes de la obtención de los ovarios se procedió a colocar una solución fisiológica isotónica a 35°C (12) en tubos Eppendorff que estaban identificados con el código del animal en ovario derecho e izquierdo. Finalmente, los tubos fueron colocados en un vaso estéril de toma de muestras de orina e introducidos en un termo y llevados en un lapso no mayor a 4 horas al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias para su procesamiento.

4.5. Valoración de la morfología ovárica

Para realizar la valoración morfológica se realizó el procedimiento descrito por Dumas et al. (2019) (16), que consistió en retirar los tejidos adyacentes de los ovarios y luego lavarlos en una solución fisiológica isotónica atemperada a 35°C por tres veces consecutivas, y colocarlos en una placa térmica a 35°C.

Luego cada ovario fue secado para posteriormente pesarlos en la balanza digital, para obtener el peso en gr. Asimismo para la medición de los ovarios se utilizó un calibrador para medir el largo y ancho del ovario en mm. Luego cada ovario fue llevado al estereoscopio para valorar y realizar el conteo de folículos siguiendo la metodología descrita por Sánchez y Silva (2003) (48), clasificando a los folículos como >2mm y <2mm.

4.6. Obtención y procesamiento de COC's

La obtención de los complejos cumulus ovocitos (COC's) se realizó mediante la técnica de slicing siguiendo el procedimiento descrito por Hernández, Nava y Vílchez (2009) (49), con variaciones adaptadas para este estudio. Los ovarios (OD; OI) de cada gata fueron puestos en una caja petri, donde se colocó 2 ml de solución de lactato de ringer suplementado con polivinil alcohol, y luego se realizaron cortes longitudinales y transversales, en cada lado del ovario. Posteriormente, se colocaron 5 ml de solución de lactato de Ringer suplementado para lavar los ovarios, para finalmente llevarlos a un estereoscopio y observarlos bajo un lente de aumento de 4,5x.

4.7. Clasificación de COC's

El criterio de clasificación de los COC's se fundamentó en los aspectos morfológicos de las células del cumulus oophorus, así como la homogeneidad del citoplasma del ovocito y la integridad de la zona pelúcida, según criterios obtenidos previamente para la especie *Felis catus* por Wood y Wild (1997) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de COC's de la especie *Felis catus*. Adaptado de Wood y Wild (1997) (29).

Categoría	Descripción
Categoría I	Citoplasma oscuro uniforme, redondo, con 5 o más capas compactas de células de la granulosa.
Categoría II	Citoplasma oscuro uniforme, rodeada por menos de 5 capas de células de la granulosa
Categoría III	Pérdida de la uniformidad del citoplasma, las capas de células de la granulosa son menos compactas
Categoría IV	Citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado, células de la granulosa se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad.

4.8. Caracterización morfométrica de los COC's

La caracterización morfométrica de los COC's consistió en determinar 5 medidas morfométricas según la metodología sugerida por Ueno y Niimura (2008) (50). Para realizar la medición de estos parámetros se utilizó una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) (S/N 1506417-S) elaborado en China acoplada a un estereoscopio y observados con un aumento de 4,5x y en base a un software (ImageJ) (última versión 1.52p -2019). Los parámetros para evaluar fueron:

- **Diámetro del ovocito:** medida en línea recta de dos puntos de la circunferencia del ovocito sin considerar la zona pelúcida y expresada en micras (μm).



- **Volumen del ovocito:** determinado mediante la fórmula $4/3 (\pi)$ (radio del ovocito)³ y expresado en micras cúbicas (μm^3).
- **Espacio perivitelino:** determinado mediante la fórmula: (diámetro del ovocito-diámetro del citoplasma) / 2 expresada en micras (μm).
- **Espesor de la zona pelúcida:** grosor o anchura de la zona pelúcida expresada en micras (μm).

4.9. Tinción vital azul brillante de cresilo

Se siguió el procedimiento descrito por Dumas et al. (2019) (16), con modificaciones para la especie *Felis catus*, primeramente, los COC's fueron lavados 3 veces en una solución tampón de fosfato salino de Dulbecco (mDPBS, por sus siglas en inglés). Previamente se preparó en un tubo Eppendorf la concentración estándar 34 μM del azul brillante de cresilo (BCB, por sus siglas en inglés).

Se diluyeron 34 μl de la solución stock del BCB en 1000 μl de medio mDPBS. La tinción BCB preparada se homogenizó en el vortex y se colocaron cuatro gotas de 50 μl en una caja Petri. En cada gota se colocaron los COC's de acuerdo con su clasificación. Posteriormente, la caja Petri fue llevada a la cámara de CO_2 humidificada a 38,5°C durante 90 minutos.

Al finalizar este tiempo, se sacó la caja Petri de la cámara de CO_2 y los COC's fueron lavados en tres ocasiones en gotas de medio mDPBS para posteriormente ser evaluados, en un estereoscopio con un lente de 4,5x. Los ovocitos con citoplasma no teñido fueron considerados como BCB negativos (BCB-), y los teñidos como BCB positivos (BCB+).

4.10. Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en Microsoft Excel, software con el cual se realizó una estadística descriptiva de las variables, usando tablas dinámicas para morfometría de ovarios (ancho, largo y peso), morfología (tipo I, II, III, IV) y morfometría de COC's (diámetro total del ovocito, diámetro del citoplasma, espacio perivitelino, espesor de la zona pelúcida) y valoración de tinción BCB. En cuanto al análisis estadístico inferencial se utilizó el programa estadístico SPSS® versión 22 (IBM Corp., Armonk,



NY, EE. UU). Los datos fueron expresados en valores medios \pm EEM (error estándar de la media), para las figuras y media \pm DE (desviación estándar) para tablas. Para cada variable (se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov).

Para evaluar la asociación entre las etapas del ciclo estral (anestro, proestro y estro) con las diferentes variables ováricas se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), el cual permitió establecer diferencias estadísticamente significativas entre grupos evaluados. De manera adicional se realizó prueba post hoc de Tukey al 5% donde se especificaron las diferencias entre estos grupos. El nivel de significancia considerado para este estudio fue de valor de $p < 0,05$.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Hallazgos citológicos de la mucosa vaginal y uterina.

Los tipos principales de células epiteliales observadas en los frotis vaginales fueron células parabasales, intermedias, superficiales y anucleadas. Se pudo comprobar que 6 gatas se encontraban en anestro, 9 en proestro y 8 en estro.

Los principales tipos celulares que predominaron en la etapa de anestro fueron: 68% de células parabasales, 25% de células intermedias, 5% de células superficiales y 1 % de células anucleadas (Figura10), resultado que concuerda con los obtenidos por Mills, Valli y Lumsden (1979) (51), quienes determinaron que las gatas que estaban en anestro presentan un mayor número de células parabasales e intermedias.

En la etapa de proestro se halló un 63% de células intermedias, 23% de células superficiales y 14% de células parabasales (Figura 10) datos que coincidieron con los reportados por Martínez (2008) (10), que encontró células epiteliales con similares morfologías ubicando a las hembras en la fase de proestro.

En la etapa de estro se encontró un 56 % de células superficiales, 42% de células anucleadas y 2% de células intermedias (Figura 10), datos que coincidieron con Heimendahl y England (2013) (52), quienes describieron que durante el estro más del 50% de células que se observan corresponden a células epiteliales queratinizadas (superficiales y anucleadas).

Al analizar las muestras de los frotis citológicos de la mucosa uterina se observó células endometriales normales (Anexo 7) y células endometriales degenerativas (Anexo 8), este mismo patrón celular se observó en todas las muestras analizadas de la mucosa cervical, por lo que solo se describirán los tipos de células encontradas en la citología uterina.

En el caso de anestro las células que se pudieron observar son las células endometriales degenerativas (Anexo 7), mientras que el proestro y estro el patrón que se encontraba era compatible con el de células endometriales normales (Anexo 8), patrón celular que fue igual en todo el tracto uterino desde los cuernos hasta el

cérvix, lo que concuerda con los estudios reportados por Spencer et al. (2012) (53), quienes no encontraron variación del tipo celular endometrial en ninguna etapa del ciclo estral, lo que se podría deberse a que el endometrio siempre presenta una estructura uniforme de sus células.

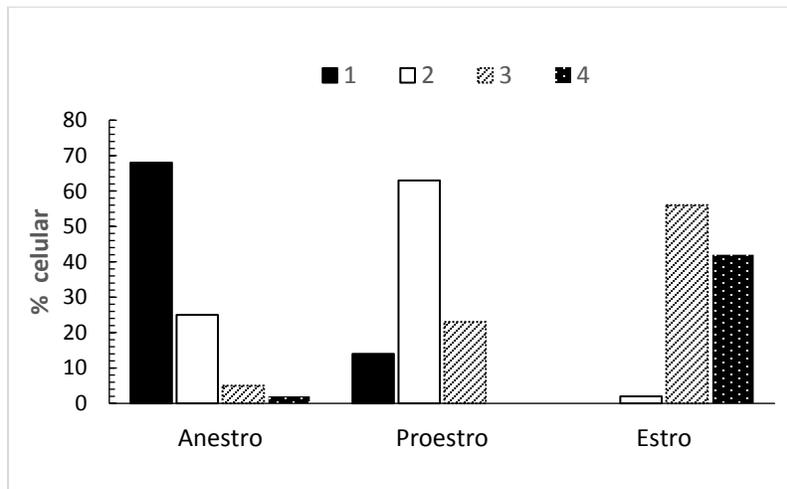


Figura 10. Principales tipos celulares presentes en la citología vaginal de gatas en diferentes etapas del ciclo estral. 1: célula parabasal, 2: célula intermedia, 3: célula superficial, 4: célula anucleada.

5.2. Características morfométricas de los ovarios en diferentes etapas del ciclo estral.

Los resultados obtenidos en este estudio determinaron que el ancho, largo y peso del ovario no varía en relación a la etapa del ciclo estral (anestro, proestro y estro, $p > 0.05$, para todas) (Figura 11). Esto puede deberse a que el largo ancho y peso por lo general no varían, tanto en gatas multíparas como nulíparas (54), sin embargo, existen otros factores como pseudopreñez, preñez o patologías ováricas que pueden alterar notoriamente estos parámetros(55), no obstante, estas gatas no formaron parte de nuestro estudio, es por esta razón que la morfometría ovárica de las gatas se mantuvo constante.

Estudios realizados en gatas por Castelo (2015) (54) y Vercellini et al. (2008) (56) concluyeron que el ancho y largo de ambos ovarios no cambia con la edad y el número de partos de las gatas, al igual que el peso que indica que el peso medio

de los ovarios es de $0,22 \pm 0,03$ g en gatas multíparas y $0,14 \pm 0,02$ g en gatas nulíparas en todas las etapas del ciclo estral.

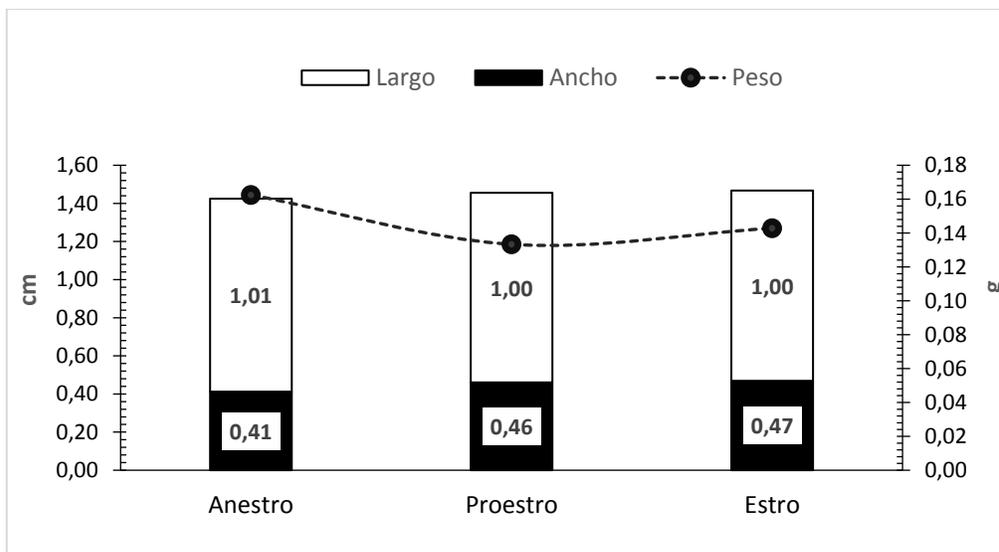


Figura 11. Morfometría ovárica considerando ancho, largo y peso en cada una de las fases del ciclo estral.

5.2.1. Población folicular y características morfológicas de los COC's

La población folicular mayor a 2 mm obtenida en este estudio no varió estadísticamente según la etapa del ciclo estral hallándose $0,25 \pm 0,5$ folículos en anestro, $1,89 \pm 3,58$ en proestro, y $3,00 \pm 1,15$ en estro (Figura 12), estos resultados son similares a los reportados por Sánchez y Silva (2003) (48), quienes indicaron que el número de folículos mayores o iguales a 2 mm es de $1,1 \pm 2,2$.

Sin embargo, se encontró que la etapa del ciclo estral proestro tuvo un efecto sobre el total de folículos menores a 2 mm obtenidos de los ovarios ($p < 0,05$) frente a las otras etapas anestro y estro (Figura 12), lo que sugiere que durante la etapa del proestro existe mayor reclutamiento de folículos de este tamaño.

De igual manera la media de folículos obtenidos en cada fase del ciclo estral fue de $18,00 \pm 5,29$ para el anestro, $31,44 \pm 11,28$ para el proestro y $25,29 \pm 8$ para el estro (Figura 12). Resultados similares a los encontrados en este estudio son los

realizados por Cardoso (2017) (9) que encontro un promedio de 18 folículos en el anestro, 26 folículos en el proestro y 16 folículos en el estro. Por lo tanto, se puede decir que los resultados obtenidos determinan que la diferencia entre fases como anestro vs proestro y estro es debido a la existencia de una sincronía de eventos endócrinos donde intervienen hormonas que permiten que el reclutamiento y crecimiento folicular lleguen a su punto más alto(57).

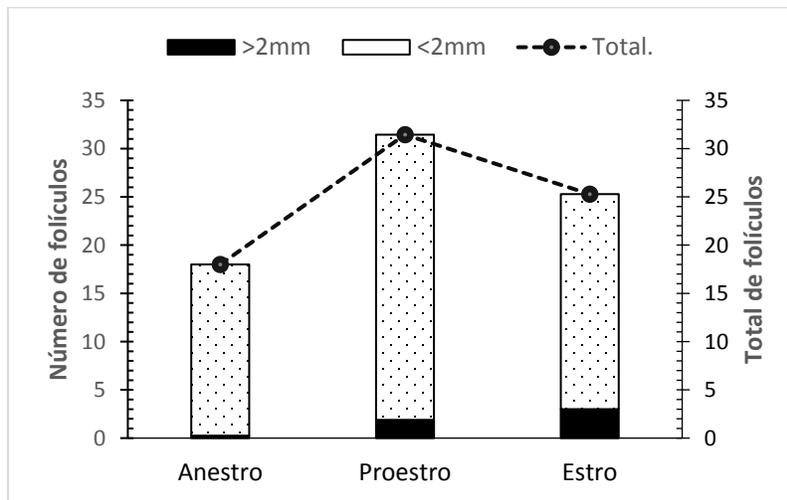


Figura 12. Población folicular ovárica de acuerdo con el tamaño del folículo y su relación con las fases de ciclo estral.

5.3. Valoración de COC'S

5.3.1. Morfología

Con relación a la morfología de los COC's clasificada en 4 tipos, se determinó que no existe diferencia estadística significativa entre los tipos morfológicos y la etapa del ciclo estral ($p > 0,05$) (58–60); sin embargo, se pudo observar que en fases de proestro y estro existió un mayor número de COC's recuperados ($P > 0,05$), particularmente en el periodo peri ovulatorio (proestro $35,56 \pm 11,23$ y estro $33,00 \pm 11,70$) vs. anestro $21,50 \pm 10,08$ (Tabla3), aunque no existen estudios que relacionen las fases del ciclo estral con la evaluación morfológica de ovocitos en la gata doméstica, se pudo encontrar estudios similares en perras donde determinaron que la mayor cantidad de ovocitos fueron recuperados en las fases de proestro y estro (61).

Tabla 3. Valores medios de COC´s encontrados en las diferentes fases del ciclo estral.

CICLO ESTRAL	TIPO I	TIPO II	TIPO III	TIPO IV	Total
Anestro	3	12	3	4	22
Proestro	4	15	11	5	36
Estro	7	14	10	2	33

5.3.2. Tinción de azul brillante de cresilo (BCB)

Al valorar las características de los COC´s mediante la tinción de BCB, se determinó que existió un mayor número de BCB positivos en fases de proestro y estro ($p < 0,05$) (Figura 13). Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que esto se da debido a que la proporción de COC´s encontrados en fase de proestro y estro fue mayor que en anestro (Tabla 3), por ende, al analizar los resultados obtenidos no hubo una variación evidente en COC´s positivos como COC´s negativos en cada una de las fases.

Pero a pesar de esto en fases de proestro y estro hubo una diferencia mayor mínima en BCB positivos sobre BCB negativos y en anestro ocurrió lo contrario predominando los COC´s negativos sobre los COC´s positivos ($P > 0,05$), esto sugiere que durante proestro y estro una mayor proporción de ovocitos culminan crecimiento y alcanzan mayor competencia, por lo cual la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa disminuye, haciendo que BCB no sea degradado y el citoplasma tome una coloración azulada (62,63).

No obstante, se puede decir que la tinción BCB sería un método efectivo para teñir COC´s, pero debido al número elevado de COC´s negativos que obtuvimos en nuestro estudio, sería interesante realizar investigaciones más exhaustivas donde se estime llegar a maduración y fecundación invitro y así contemplar la verdadera viabilidad de los ovocitos respectivos en cada fase del ciclo estral.

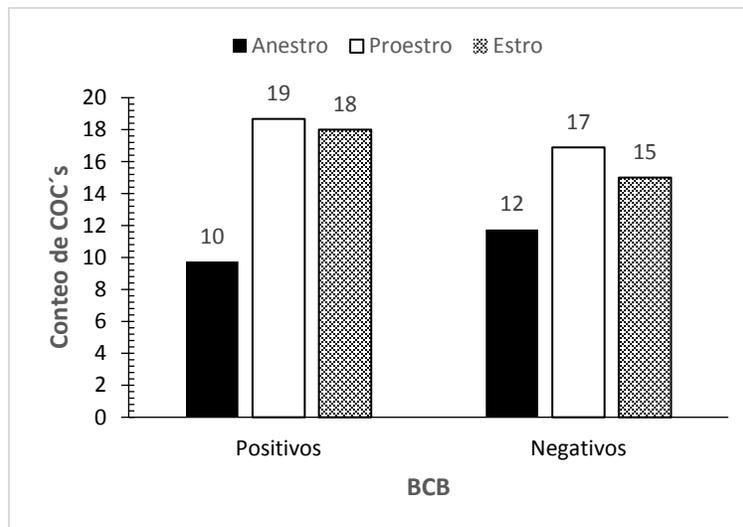


Figura 13. Valores medios de COC's resultantes a la tinción vital de azul brillante de cresilo en las diferentes fases del ciclo estral. Diferentes letras significan diferencias estadísticas (a, b) para $p < 0,05$.

5.3.3. Características morfométricas de los ovocitos en diferentes etapas del ciclo estral.

4.3.3.1. Diámetro del ovocito

El diámetro total de los ovocitos clasificados de acuerdo a su tipo (I, II, III y IV) no fue afectado por la etapa del ciclo estral ($p > 0,05$), así como el diámetro total del ovocito indistintamente de su clasificación ($104,86 \pm 12,88 \mu\text{m}$ anestro; $107,32 \pm 12,80 \mu\text{m}$ en proestro y $106,64 \pm 21,35 \mu\text{m}$ en estro ($p > 0,05$) (Figura 14) (Anexo 16).

Estos resultados concuerdan con los resultados reportados por Reyhaud et al. (2009) (64), quienes obtuvieron un diámetro del ovocito de $97,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$ en folículos preantrales y $108,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$ en folículos antrales tempranos, indistintamente de la etapa del ciclo estral de las gatas. Los resultados obtenidos pueden deberse al estado del desarrollo folicular, donde predominaron los folículos preovulatorios en los cuales los factores de crecimiento u otras vías de señalización paracrinas pueden influir en la calidad de los ovocitos (45).

4.3.3.2. Volumen

Al igual que el diámetro, el volumen de los ovocitos clasificados de acuerdo al tipo (I, II, III, IV) no se vio afectado por la etapa del ciclo estral ($p > 0,05$), así como el volumen total del ovocito indistintamente de su clasificación ($645480,42 \pm 220754,68 \mu\text{m}^3$ anestro; $680608,51 \pm 247980,41 \mu\text{m}^3$ proestro, y $745384,99 \mu\text{m}^3 \pm 324323,59$ estro; $p > 0,05$, (Figura 14) (Anexo 16).

El volumen es un parámetro que sigue un patrón equivalente al diámetro del ovocito. En la actualidad este parámetro no ha tenido importancia en cuanto a gatas en las diferentes fases del ciclo estral, sin embargo se ha realizado investigaciones en otras especies como en bovinos, donde se determinó que el volumen ovocitario era de $1.072.322,5 \mu\text{m}^3$ en ovocitos provenientes de ovarios con cuerpo lúteo (fase luteínica) y un volumen de $1.011.583,0 \mu\text{m}^3$ en ovocitos provenientes de ovarios sin cuerpo lúteo (fase folicular) (16).

Además, la presencia del cuerpo lúteo implica mayor flujo sanguíneo al ovario que lo contiene, y posibilidad de que más nutrientes, factores de crecientes y otras sustancias beneficiosas se distribuyan en el ovario y sus estructuras funcionales. Adicionalmente, el cuerpo lúteo produce muchas sustancias que a través de la comunicación local (intra-ovárica) pueden alcanzar los folículos y ovocitos contenidos en ellos y ejercer una influencia beneficiosa.

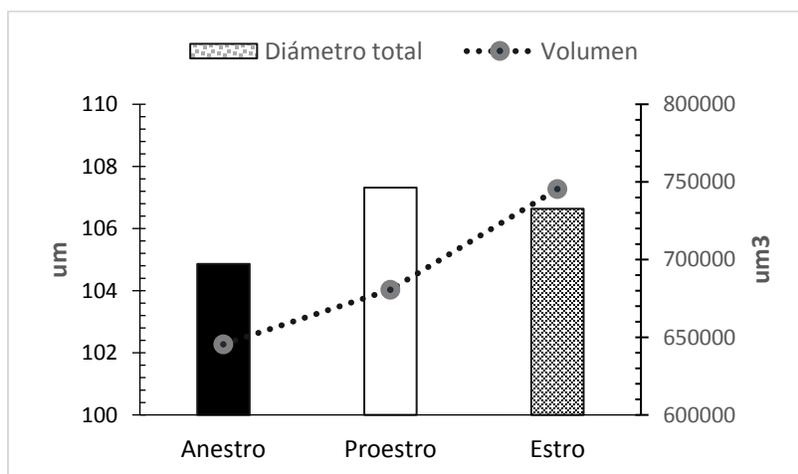


Figura 14. Valores medios del diámetro y volumen del ovocito en las diferentes fases del ciclo estral.



4.3.3.3. Espacio perivitelino (EPV)

Asimismo, el EPV fue otras de las variables no influenciada por la etapa del ciclo estral ni por la categoría (I, II, III y IV) del ovocito ($p < 0,05$) (Figura 15). Dando como resultado que la media del EPV fue de $4,60 \pm 0,84$, $3,98 \pm 0,72$ y $4,79 \pm 1,78 \mu\text{m}$, para el anestro, proestro y estro respectivamente (Figura 15) (Anexo 16).

No existen reportes anteriores a este estudio en los que se hay medido el EPV en gatas domésticas en las diferentes fases del ciclo estral, sin embargo, algunos estudios llevados a cabo en roedores a determinado una media de $0,28 \pm 0,07 \mu\text{m}$ para ratas y de $0,12 \pm 0,07 \mu\text{m}$ para conejas, todos estos valores son obtenidos de ovocitos colectados de folículos antrales antes de la maduración *in vitro* (65). Asimismo, se ha observado que el EPV en ovocitos de ratas incrementa su tamaño exponencialmente después de ser sometido a un cultivo con hormona hCG, lo que sugeriría un efecto mediado a través de esta hormona que actuaría en los receptores de LH (50).

La anchura del espacio perivitelino está directamente relacionada con el tamaño del primer corpúsculo polar, con la presencia de gránulos, con el tamaño del ovocitos y con la anchura de la zona pelúcida (66). Okada y Chung (1993), citados por Yoshida y Niimura, 2011) (65), informaron que las secreciones del oviducto están involucradas en el agrandamiento del EPV en ovocitos ovulados. Otros de los factores ligados a la ampliación del EPV es la reducción del diámetro del citoplasma de los ovocitos y un aumento del diámetro interno de la zona pelúcida.

Un estudio realizado en bovinos determinó que el tamaño del EPV del grupo control (sin BCB) fue de $7,3 \mu\text{m}$, en aquellos que fueron BCB+ de $6,4 \mu\text{m}$ y en BCB- de $5,8 \mu\text{m}$ (16).

Otros estudios realizados en humanos por Suppinyopong et al. (2009) (67) han determinado que el incremento del EPV reduce la tasa de fecundación o puede disminuir el potencial de implantación de los embriones obtenidos en contraposición a otros estudios realizados por Herrero et al. (2011) (68) donde no se hallaron diferencias significativas entre la tasa de fecundación e implantación. Mientras que Yu et al. (2007) (69) asociaron un mayor tamaño de espacio perivitelino a una mejor

calidad embrionaria. Los estudios hasta el momento son contradictorios en cuanto a determinar tasas de fertilidad e implantación asociadas al tamaño del espacio perivitelino. Con respecto a estos criterios antes expuestos sería pertinente considerar que un mayor EPV en gatas domesticas puede ser un componente importante para la viabilidad del ovocito.

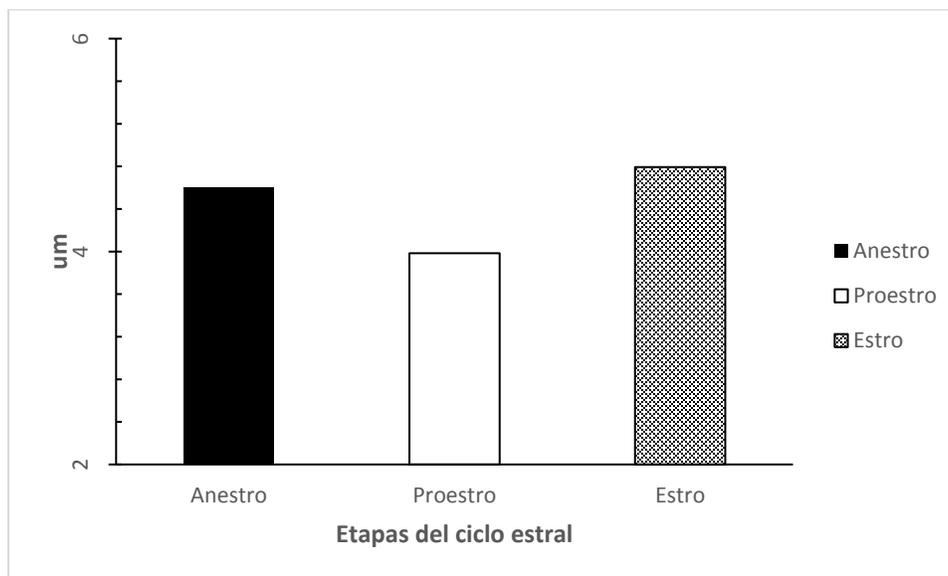


Figura 15. Valores medios del espacio perivitelino en las diferentes fases del ciclo estral.

4.3.3.4. Espesor de zona pelúcida (ZP)

En nuestro estudio no se encontró diferencia estadística significativa debido a la etapa del ciclo o la categoría de los ovocitos en relación al espesor de la zona pelúcida ($p > 0,05$). Los resultados obtenidos fueron $19,08 \pm 2,93 \mu\text{m}$ en anestro, $16,91 \pm 2,52 \mu\text{m}$ en proestro y $17,72 \pm 4,86 \mu\text{m}$ en estro (Figura 16) (Anexo 16).

Este hallazgo podría deberse a que la mayoría de ovocitos en fase de anestro aún son inmaduros. Dentro de los cambios que se producen en la etapa de maduración de los ovocitos está el aumento de las uniones de comunicación “gap junction” entre las células del cúmulo ooforo y el ovocito. Esta comunicación es importante para regular los factores responsables de la maduración citoplasmática, además se produce la expansión de las células del cúmulo debido a que se encuentran en una matriz de ácido hialurónico y proteínas que durante la maduración se hidratan

aumentando los espacios entre las células (5). El espesor de la zona pelúcida tiene una influencia sobre la penetración del espermatozoide, los ovocitos se fertilizan mejor *in vitro* cuando el grosor de la zona pelúcida es inferior a $18,6 \mu\text{m}$ en ovocitos de mamíferos (70).

Se han realizado estudios en gatas sin considerar las etapas del ciclo estral, donde al realizar la medición de la ZP obtuvieron un ancho de la zona pelúcida de $14 \pm 4 \mu\text{m}$ en folículos terciarios (61). En otro estudio se obtuvieron ovarios de gatas con una edad media de $1,17 \pm 0,09$ años, donde encontraron que la zona pelúcida tenía un espesor de $3,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$ en ovocitos de folículos preantrales y $3,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ en folículos antrales tempranos (64).

Al comparar nuestra investigación con la de Barber (61), se pudo establecer que la medición de ZP es similar, no obstante, al comparar nuestro estudio con el de Reynaud se evidencia que la ZP, es más pequeña los mismos autores del estudio determinan que esto era debido a que usaron un medio de cultivo que incluyó parafina lo que puede deshidratar al ovocito hasta en un 15% (64).

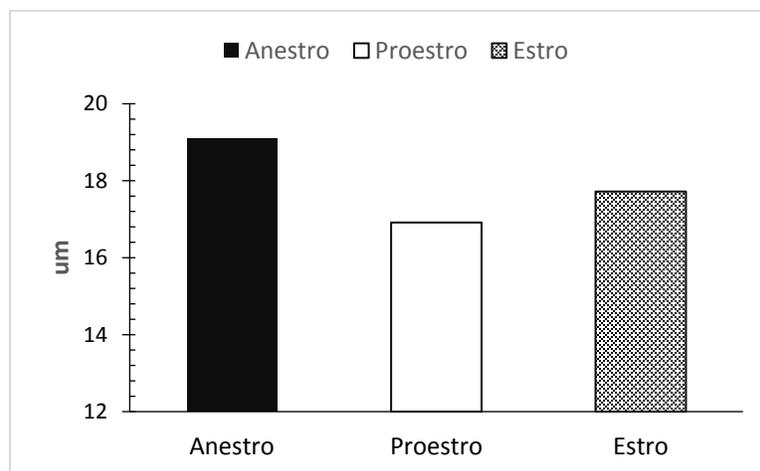


Figura 16. Valores medios del espesor de la zona pelúcida en las diferentes fases del ciclo estral.



6. CONCLUSIONES

- La citología vaginal y uterina en gatas domésticas son un indicador confiable para determinar la etapa del ciclo estral. Las células vaginales y uterinas (endometriales) presentan diferentes tamaños y formas durante las diferentes etapas del ciclo estral.
- Las dimensiones y peso de los ovarios no tuvieron una variación de acuerdo con la fase del ciclo estral de la gata doméstica, sin embargo, la población folicular fue mayor en las etapas de proestro y estro.
- La población de folículos menores a 2 mm se vio afectada por la etapa del ciclo estral. Durante el proestro se obtiene una mayor cantidad de folículos, sin embargo, la cantidad de COC's de tipo I, II, III y IV es independiente de la etapa del ciclo estral.
- La tinción vital de azul brillante de Cresilo es un método seguro para teñir COC's sin embargo debido a la gran cantidad de COC's negativos obtenidos en cada fase del ciclo estral, sería muy útil realizar estudios más exhaustivos que contemplen la verdadera viabilidad de los COC's.
- Las características morfométricas como diámetro, volumen, espacio perivitelino y zona pelúcida del ovocito no mostraron cambios significativos en las diferentes etapas del ciclo estral de la gata doméstica.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandez A, Diaz T, Muñoz G. Producción in vitro de embriones bovinos. *Inst Reprod Anim.* 2007;46(5):159–62.
2. Fernández F, Hernández J, Romero J. Viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos in vitro. *Rev Salud Anim.* 2013;35(1):52–8.
3. Fernández F, Hernández J, Pichardo A. Maduración in vitro de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH+ LH y FSHen medio de cultivo. *Rev Salud Anim.* 2007;29(2):105–110.
4. Urdaneta A, Jimenez E. Efecto del test de BCB y maduración en presencia de diferentes concentraciones de cisteamina sobre el desarrollo embrionario de ovocitos de cabras prepúberes. 2003;264–6.
5. Hetz J. Estudio ultraestructural de la zona pelúcida de ovocitos caninos inmaduros y madurados in vitro. 2008.
6. Paz R. Biotecnologias da reprodução utilizadas como ferramentas auxiliares no manejo e conservação de duas espécies de felinos selvagens: *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus*. 2004;148.
7. Giménez F, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Sota RL de la, Stornelli MA. Fisiología reproductiva y control de los ciclos estrales en la gata doméstica. *Analecta Vet.* 2006;26, n(1):38–43.
8. Negrete J. Ciclo estral de la gata. Universidad autónoma agraria Antonio Narro; 2007.
9. Cardoso CFR. Desenvolvimento folicular ao longo do ciclo éstrico na cadela e gata. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias; 2017.
10. Martinez E. Atlas de Citología Clínica del perro y del gato [Internet]. Servet;



2007. 3, 171–172, 187–192 p. Available from:
<http://app.documentavet.com/read.php?cod=7&pag=0>

11. Sánchez A, Stamatiu S. Endometrial cytology in the female cat (*Felis catus*) during diestrus. *Rev Investig Vet del Peru*. 2017;28(4):869–75.
12. Jewgenow K, Fernandez L, Jänsch S, Viertel D, Zahmel J. Brilliant cresyl blue staining allows the selection for developmentally competent immature feline oocytes. *Theriogenology*. 2018;126:320–5.
13. Ortega M del C. Comparación de dos métodos de recolección (Slicing y Aspiración Folicular) de ovocitos bovinos obtenidos post mortem para la producción de embriones in vitro. Universidad de Loja; 2016.
14. Rodríguez M de L, Puche S, Vale O, Camacho J. Hallazgos patológicos del tracto reproductivo en cerdas de descarte en Venezuela. *Rev la Fac Ciencias Vet*. 2008;49(1):9–15.
15. Sadurní C. Avances en tecnologías reproductivas en equinos. In: revision bibliograficas. 2020. p. 1–64.
16. Duma M. “Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero.” Universidad de Cuenca; 2019.
17. Herrera A. “Anovulatorios En Perras .” Vol. 1, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. Universidad Autónomas Agraria Antonio Narro Unidad Laguna; 2015.
18. König E, Liebich H. Anatomía de los Animales domésticos König. Vol. 2: Organos, Sistema Circulatorio y Sistema Nervioso. Segunda. Bragulla B, Budras B, Cervený B, editors. Anatomía de los animales domésticos. Buenos Aires; 2011. 416 p.
19. Casa F, Clavijo H. Evaluación de las características de los ovocitos antes y



- después de la criopreservación, según la edad de los bovinos de matadero. Vol. 1, Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad. Universidad Técnica de Cotopaxi; 2018.
20. Escobedo W. Diagnóstico Del Estro Por Medio De Citología Vaginal En Perras. Vetzoo.Umich.Mx. Universidad San Carlos de Guatemala; 2008.
 21. Islas E. Manual de prácticas de reproducción animal asistida. [México]: Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2007.
 22. Moro L. Clonación E Icsi Interespecífica En Felinos Y Reprogramación Nuclear. Universidad de Buenos Aires; 2015.
 23. Stornelli MA. Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. Physiological aspects of feline reproduction. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horiz. 2007;31(1):71–6.
 24. Leyva H. La glándula pineal, la melatonina, el fotoperiodo y la sexualidad animal. Univ Cent Occident Lisandro Alvarado, UCLA. 2014;4(5).
 25. Malandain E, Rault D, Froment E, Baudon S, Desquilbet L, Begon D, et al. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. Theriogenology. 2011;76(7):1337–46.
 26. Bristol S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology. 2006;66(1):5–13.
 27. Jewgenow K, Paris MCJ. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. Theriogenology. 2006;66(1):93–100.
 28. Casa F, Clavijo H. Evaluación de criopreservación de ovocitos en hembras caninas en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria. Vol. 1, Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad. Universidad de Cotopaxi; 2015.



29. 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(2):355–60.
30. Nogueira CS, Ferreira MH, Silva W., Silva LK., Batista H., Araújo LJ., et al. Determinação da fase do ciclo estral através da anamnese e citologia vaginal associada à dosagens hormonais. *Brazilian J Anim Environ Res.* 2019;2:1037–45.
31. Sánchez A, Silva M. Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración. *Valdivia.* 2003;1:15–24.
32. Casagrande Campoverde EJ. Universidad católica de santiago de guayaquil. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil; 2014.
33. Root M. Reproducción clínica de caninos y felinos. Primera. Hiemstra M, Root K, editors. Buenos Aires; 2012. 240 p.
34. Dumon C. Frotis vaginales e inseminación artificial en la perra. *Clínica Vet pequeños Anim Rev Of AVEPA, Asoc Vet Española Espec en Pequeños Anim.* 1989;9(3):119–31.
35. Narváez F. Identificación de hembras domésticas en estro mediante la observación de cristalización de la saliva como método diagnóstico complementario comparado con citología vaginal. Vol. 151, Universidad Técnica de Ambato. Universidad Técnica de Ambato; 2015.
36. Delfino M, Souza P de, Brum D., Leivas F. Biotécnicas da Reprodução uso de Citologia vaginal esfoliativa para determinação de período fértil em cadelas. 10º salão Int ensino, Pesqui e extensão -SIEPE. 2018;4–10.
37. Groppetti D, Pecile A, Arrighi S, Di Giancamillo A, Cremonesi F. Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial nuclei: A useful



- tool for reproductive diagnosis in the bitch. *Theriogenology*. 2010;73(7):927–41.
38. Gómez C. Implicación de la entrada de ca^{2+} regulada por depósitos intracelulares en la señalización mediada por ca^{2+} en ovocitos de ratón. Universidad de Extremadura; 2010.
 39. Martínez B. Estudio de la FIV en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la PIV de embriones. Universidad Complutense de Madrid; 2002.
 40. Mocha Zhispon A, Quezada Contreras A. Evaluacion de la calidad y maduración de ovocitos bovinos en matadero con tres presiones de vacío. *Univ Cuenca*. 2017;1–81.
 41. Zárate O. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. T. Universidad Veracruzana; 2006.
 42. Argudo D, Tenemaza M, Merchán S, Balvoa J, Méndez M, Soria M, et al. Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*. 2020;155:232–9.
 43. Irene S. Análisis molecular, proteómico y filogenético de la zona polar de ovocitos de gata y coneja. Vol. 281, universidad de Murcia. 2015.
 44. Familiari G, Heyn R, Relucenti M, Sathananthan H. Structural changes of the zona pellucida during fertilization and embryo development. *Front Biosci*. 2008;13(17):6730–51.
 45. Sedó C, Lavolpe M, Boudri H, Barrios E, Longobucco V, Noblía F, et al. Utilidad de la localización de la vesícula germinal para la adecuada maduración nuclear y citoplasmática luego de maduración in vitro. *Reproduction*. 2015;30:4–13.



46. Babicsak V, Zardo K, Belotta A, Mamprim M. Aspectos ultraestructurales de los complejos cumulusocitos de los mamíferos domésticos. *Veterinária e Zootec.* 2013;(January):171–82.
47. Baldwin K, Bartges J, Buffington T, Freeman L, Grabow M, Legred J, et al. Guías para la Evaluación Nutricional de perros y gatos de la Asociación Americana Hospitalaria de Animales (AAHA). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2010;46(4):285–97.
48. Sanchez AE, Silva ME. Biology of pregnancy in the domestic cat (*Felis catus*). *Arch Med Vet.* 2002;34(2):147–56.
49. Hernández A, Nava H, Vílchez V. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro. *Prod Agropecu Sanid Anim.* 2010;3(1):41–4.
50. Ueno S, Niimura S. Size of Perivitelline Space and Incidence of Polyspermy in Mouse Oocytes Matured In Vivo and In Vitro. *J Mamm Ova Res.* 2008;25(1):44–9.
51. Mills JN, Valli VE, Lumsden JH. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J.* 1979;20(4):95–101.
52. Heimendahl A Von. Determinazione della fase del ciclo estrale. 2010. 44–50 p.
53. Spencer TE, Dunlap KA, Filant J. Comparative developmental biology of the uterus: Insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;354(1–2):34–53.
54. Castelo A. Estudio histoanatomico y diferenciación morfométrica del aparato reproductor en gatas nulíparas y múltiparas en un proceso de esterilización felina en consulta veterinaria. Universidad de Santa Maria; 2015.
55. Ortega D. ovarios poliquísticos y su relación con el desarrollo de piometra en



- hembras caninas diagnosticadas en la clínica de animales de compañía y clínica de pequeños animales. 2014.
56. Vercellini R, Gobello C, D'Francisco F, Olgúin S, Arizmendi A, Rodríguez R, et al. Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow in prepubertal and pubertal cats. *Reprod Domest Anim.* 2018;53(September):74–8.
 57. Guáqueta H. Estrous cycle basic physiology and strategies for improving estrus detection ciclo estral fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Rev la Fac Med Vet y Zootec.* 2009;56(3):163–83.
 58. Veraguas D. Reprogramación de células somáticas de güiña (*Leopardus guigna*) mediante transferencia nuclear heteroespecífica utilizando ovocitos maduros de gata doméstica (*Felis silvestris catus*). Universidad de Concepción; 2018.
 59. Larocca C, Fila D, Filipiak Y, Pérez W. Características Morfológicas de Ovarios y Ovocitos de Nutrias (*Myocastor coypus*) en Condiciones de Criadero. *Int J Morphol.* 2011 Jun;29(2):424–6.
 60. Kochan J, Nowak A, Młodawska W, Prochowska S, Partyka A, Skotnicki J, et al. Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats. *Animals.* 2021;11(1):1–11.
 61. Barber M, Lee S, Steffens W. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. Elsevier. 2001;(01).
 62. Rodríguez-González E, López-Béjar M, Velilla E, Paramio MT. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology.* 2002;57(5):1397–409.
 63. Piras A, Ariu F, Pau S, Zedda M, Paramio M, Bogliolo L. Selección de oocitos



de gato domésticos utilizando el Brilliant creasyl blue (BCB) para mejorar el desarrollo embrionario in vitro. 2017;6:329–31.

64. Reynaud K, Gicquel C, Thoumire S, Chebrout M, Ficheux C, Bestandji M, et al. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. *Reprod Domest Anim.* 2009;44(2):174–9.
65. Yoshida N, Niimura S. Size of the perivitelline space and incidence of polyspermy in rabbit and hamster oocytes. *Reprod Med Biol.* 2011;10(1):31–41.
66. Moro CD. Calidad Ovocitaria En Segundo Ciclo Vs Primer Ciclo . ¿ Influye El Intervalo De Tiempo Entre Los. 2014;
67. Suppinyopong S, Choavaratana R, Karavakul C. Correlation of Oocyte Morphology with Fertilization Rate and Embryo Quality after Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Med Assoc Thai.* 2000;83:627–32.
68. Herrero M. Impacto de las anomalías del espacio perivitelino de los ovocitos en el desarrollo embrionario y la tasa de implantación. *ASEBIR.* 2011;16:35–7.
69. Yu EJ, Ahn H, Lee JM, Jee BC, Kim SH. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. *Clin Exp Reprod Med.* 2015;42(4):156–62.
70. Lasiene K, Vitkus A, Valanciute A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina (Kaunas).* 2009;45(7):509–15.

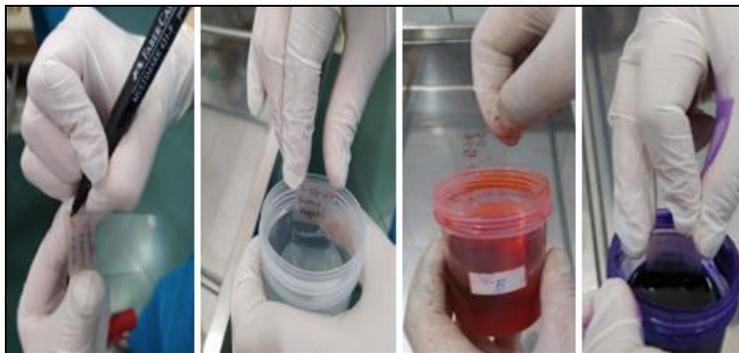
8. ANEXOS



Anexo 1. Evaluación clínica de las gatas del estudio.



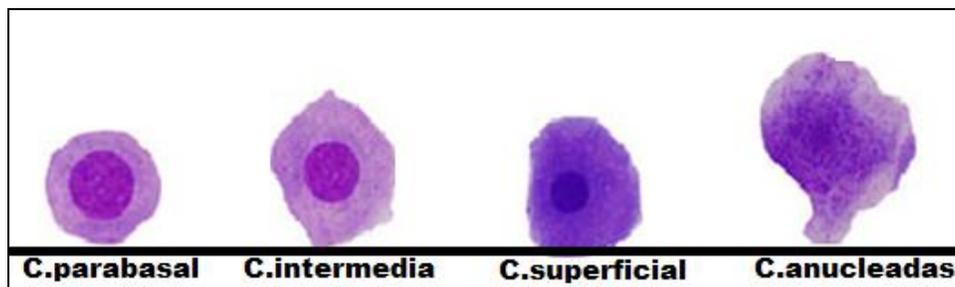
Anexo 2. Cirugía y cuidado post quirúrgico.



Anexo 3. Procedimiento de citología.

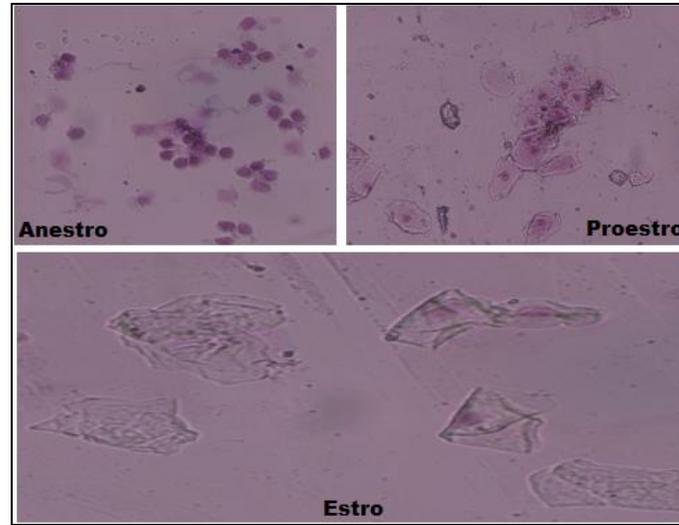


Anexo 4. Citología vaginal y uterina

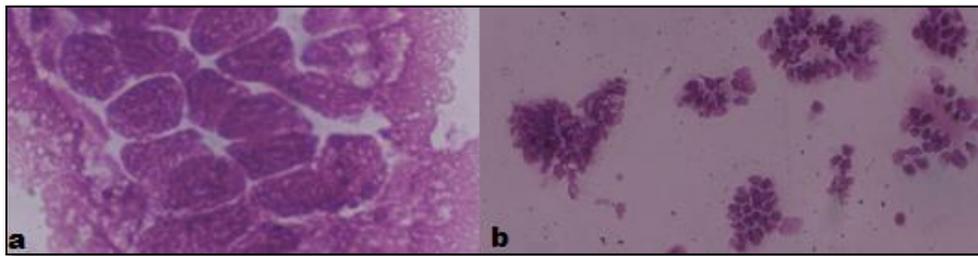


Anexo 5. Tipos de células encontradas en citología vaginal.

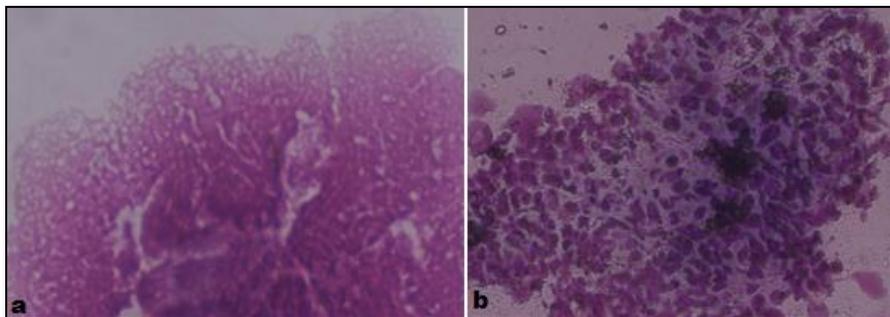
Tinción de Diff Quick (aumento 100 X)



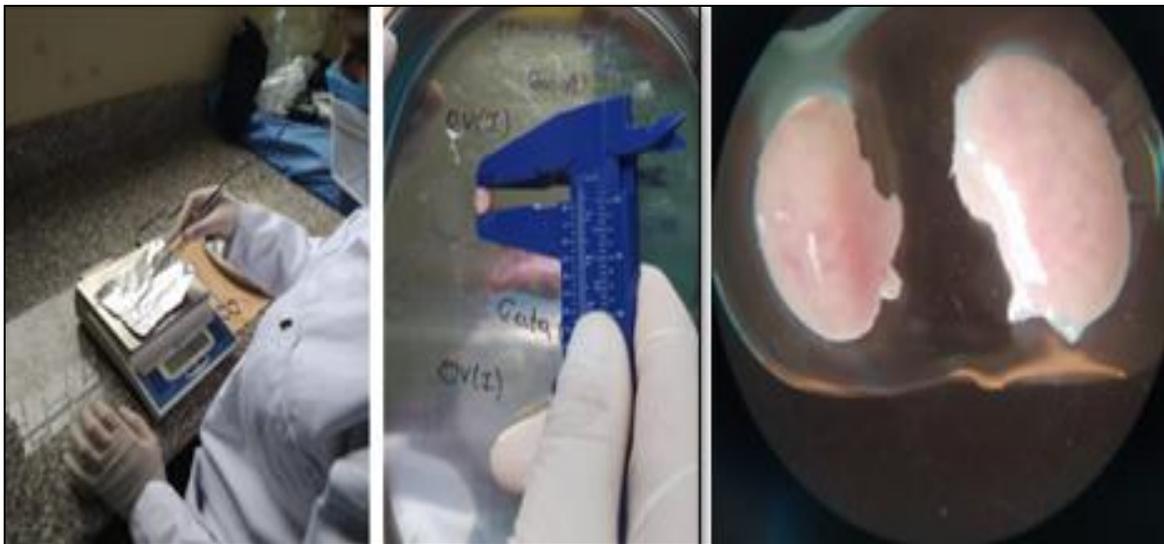
Anexo 6. Citología vaginal en las diferentes fases del ciclo estral (aumento 40x)
(tinción de Diff Quick)



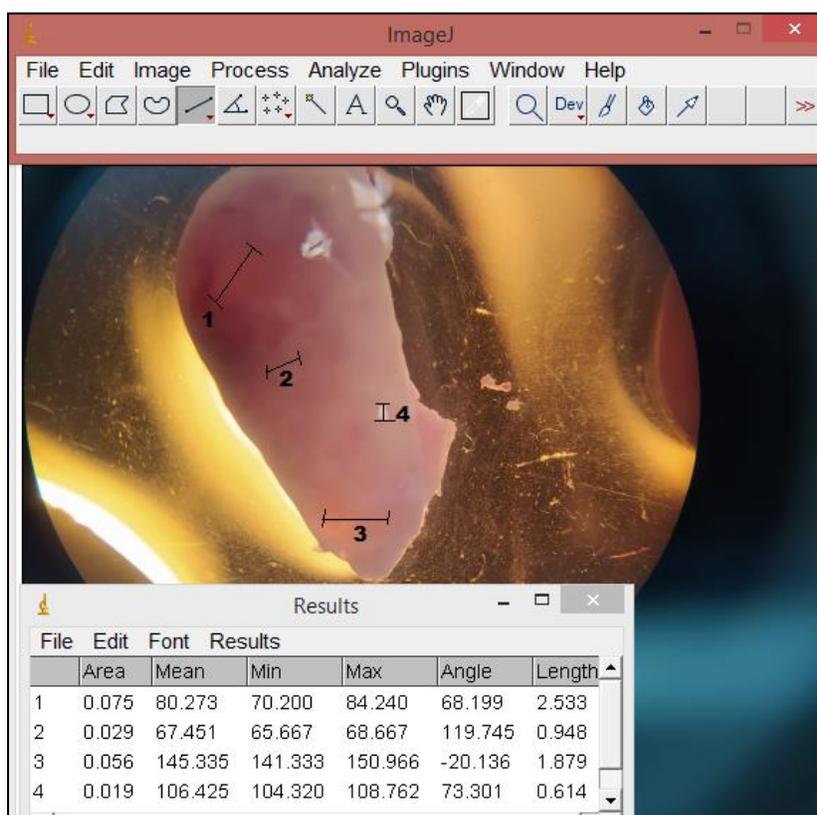
Anexo 7. Células endometriales normales (a=aumento 100x, b=aumento 40x)
(tinción de Diff Quick)



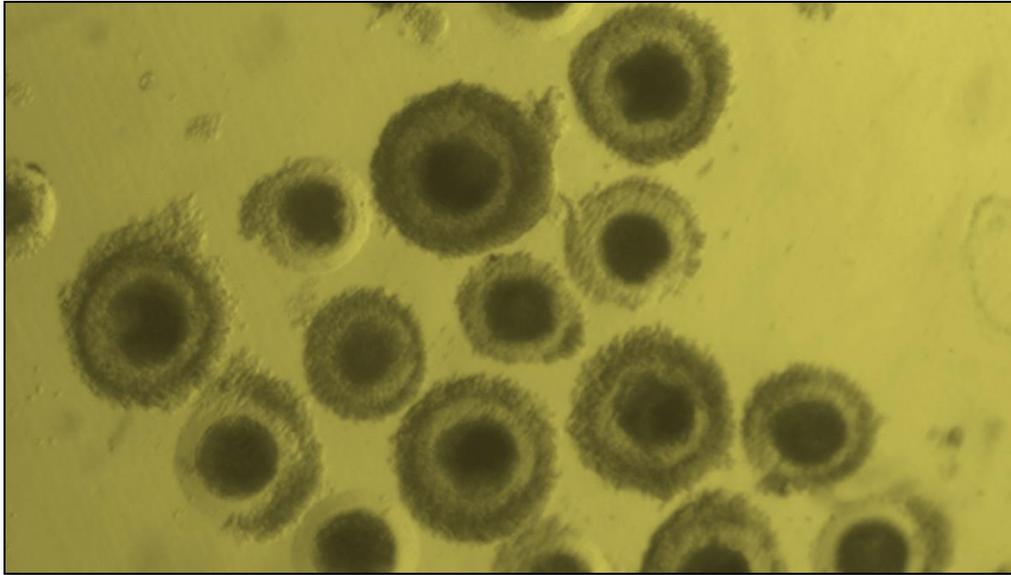
Anexo 8. Células endometriales degenerativas (a=aumento 100x, b=aumento 40x)
(tinción de Diff Quick)



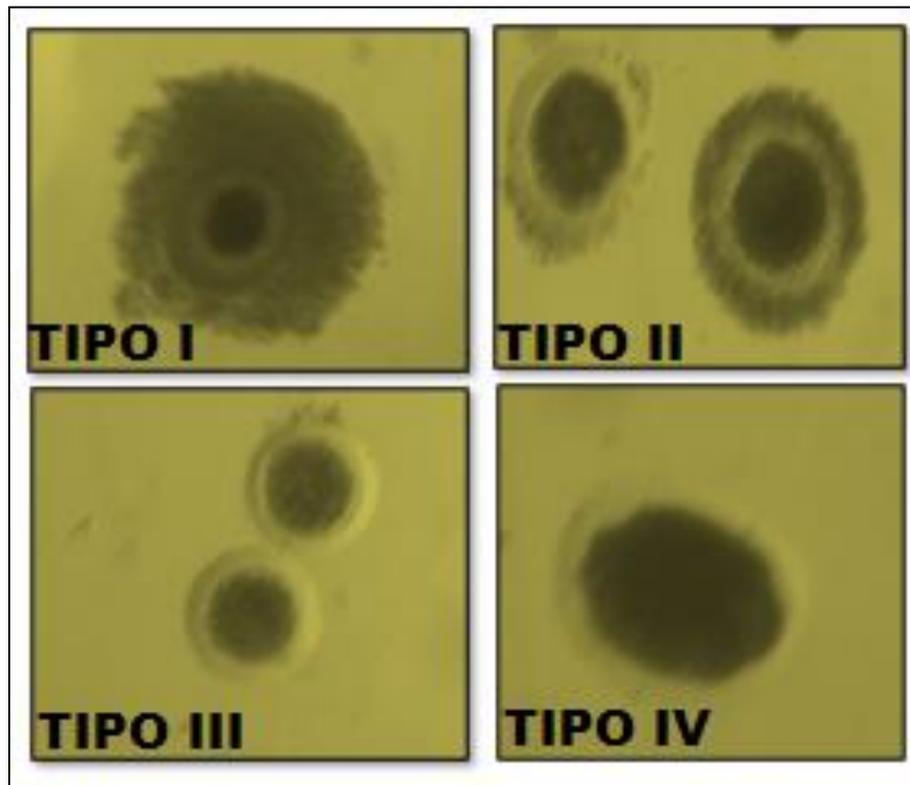
Anexo 9. Morfometría ovárica



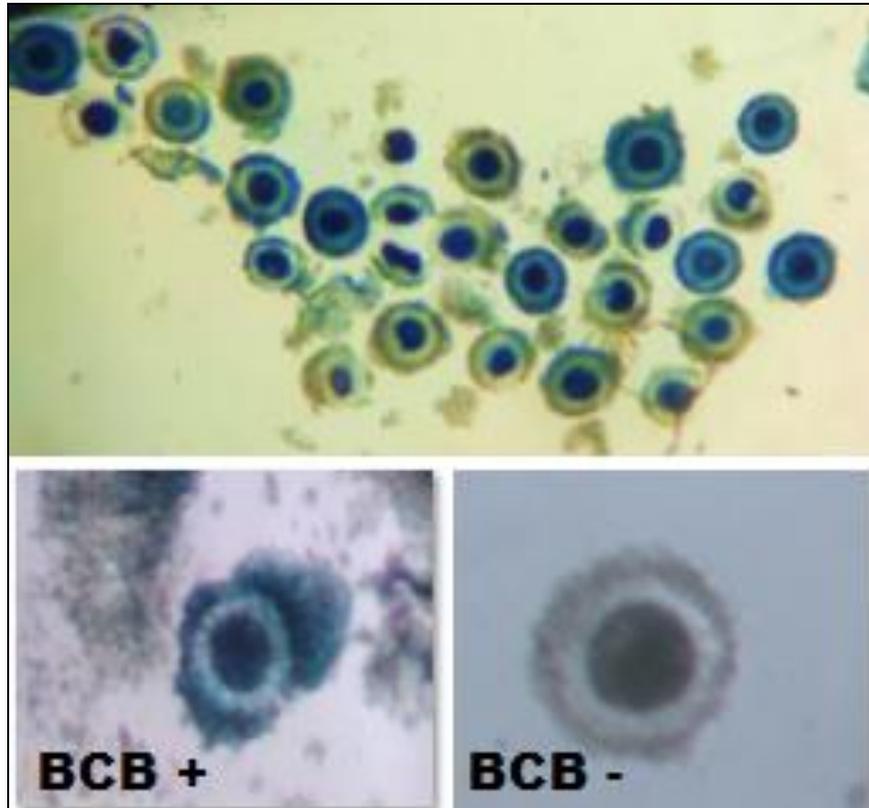
Anexo 10. Medición de folículos ováricos



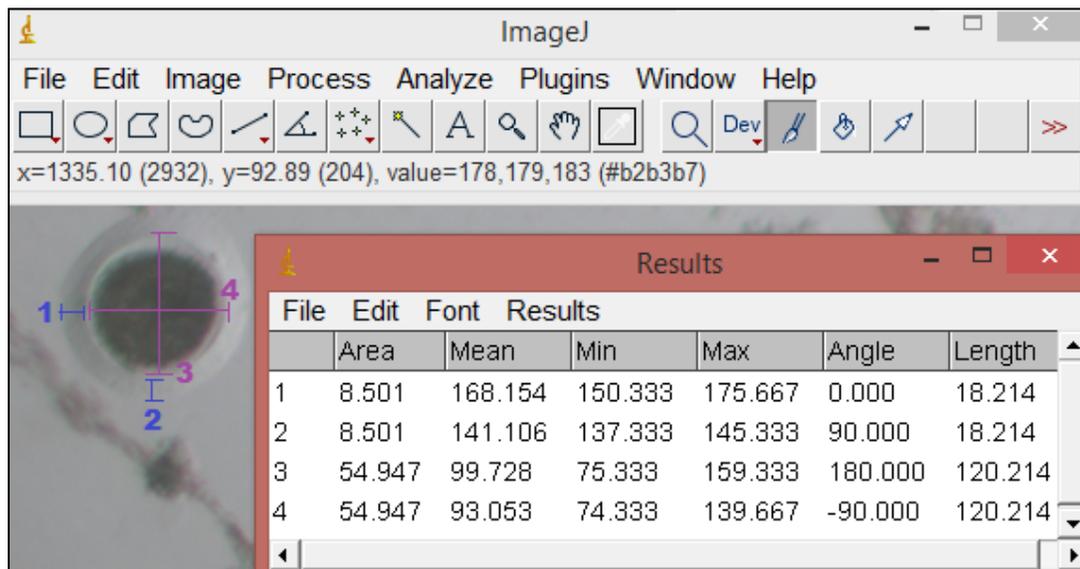
Anexo 11.Colecta y clasificación de COC's



Anexo 12. Tipo de COC's en gatas domésticas



Anexo 13. Tinción azul brillante de cresilo (BCB).



Anexo 14. Morfometría ovocitaria.



PROTOCOLO DE CIRUGÍA								
CIRUGÍA:	OVH:	<input type="checkbox"/>	ORH:	<input type="checkbox"/>	PACIENTE # <input type="text"/>	PESO:	<input type="text"/>	KG
HORA INICIO CIRUGIA:			HORA FIN DE CIRUGÍA:					
DATOS DEL PROPIETARIO / A:								
NOMBRE: <input type="text"/>			UBICACIÓN: <input type="text"/>					
CÉDULA DE IDENTIDAD # <input type="text"/>			TELÉFONO: <input type="text"/>					
DATOS DEL PACIENTE:								
NOMBRE: <input type="text"/>		CANINO: <input type="checkbox"/>		FELINO: <input type="checkbox"/>				
RAZA: <input type="text"/>								
EDAD: <input type="text"/>		MACHO: <input type="checkbox"/>		HEMBA: <input type="checkbox"/>				
CONDICIÓN CORPORAL:								
AMISTOSO: <input type="checkbox"/>		AGRESIVO: <input type="checkbox"/>		NERVIOSO: <input type="checkbox"/>				
CONSIDERACIONES IMPORTANTES:								
AYUNO ADECUADO:		SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		TIEMPO: <input type="text"/>		
HA PADECIDO ALGUNA ENFERMEDAD RECIENTEMENTE:				SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		
HACE CUANTO TIEMPO: <input type="text"/>								
HA TENIDO ALGUN TIPO DE ACCIDENTE?				SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		
TIPO / HACE CUANTO TIEMPO? <input type="text"/>						/ <input type="text"/>		
HA TENIDO CRIAS?				SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		HACE CUANTO? <input type="text"/>
ESTA EN CELO?		SI <input type="checkbox"/>		NO <input type="checkbox"/>		ULTIMO CELO? <input type="text"/>		
EXAMEN CLÍNICO:								
EM:	<input type="text"/>	FC:	<input type="text"/>	FR:	<input type="text"/>			
M:	<input type="text"/>	TLLC:	<input type="text"/>	CP:	<input type="text"/>			
TR:	<input type="text"/>	PULSO:	<input type="text"/>	P. ABD:	<input type="text"/>			
OBSERVACIONES:						<input type="text"/>		
						<input type="text"/>		

Anexo 15. Ficha de registro de datos.



Características Morfométricas	Ciclo	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DO_TOTAL	Proestro	9,00	107,32	12,81	4,27	97,47	117,16	89,22	128,72
	Anestro	4,00	104,86	12,88	6,44	84,36	125,36	87,99	114,98
	Estro	7,00	106,64	21,36	8,07	86,89	126,39	66,50	129,81
	Total	20,00	106,59	15,50	3,47	99,33	113,84	66,50	129,81
VOL_TOTAL	Proestro	9,00	680608,51	247980,42	82660,14	489993,89	871223,13	376477,09	1145434,93
	Anestro	4,00	645480,42	220754,68	110377,34	294210,46	996750,39	378579,84	856395,36
	Estro	7,00	745384,99	324323,60	122582,80	445435,69	1045334,29	273279,85	1184479,33
	Total	20,00	696254,66	261441,23	58460,04	573896,40	818612,92	273279,85	1184479,33
EPV_TOTAL	Proestro	9,00	3,98	0,73	0,24	3,42	4,55	2,87	5,04
	Anestro	4,00	4,60	0,84	0,42	3,27	5,94	3,66	5,39
	Estro	7,00	4,79	1,79	0,67	3,14	6,44	2,19	7,80
	Total	20,00	4,39	1,22	0,27	3,82	4,96	2,19	7,80
EZP_TOTAL	Proestro	9,00	16,91	2,52	0,84	14,97	18,85	13,39	21,97
	Anestro	4,00	19,08	2,93	1,47	14,42	23,75	15,66	22,31
	Estro	7,00	17,72	4,86	1,84	13,22	22,22	12,32	23,17
	Total	20,00	17,63	3,49	0,78	15,99	19,26	12,32	23,17

Anexo 16. Estadísticos descriptivos de características morfométricas de COC's