

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DEL COBRE DURANTE LA MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS:  
IMPACTO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL**

*Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de*

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**AUTOR: MV, Bacterióloga, Diana Esther Rosa**

**DIRECTOR: Lic. Biol, DCBiol, Cecilia C. Furnus**

**CODIRECTOR: MV, DCVet, Guillermo A. Mattioli**

**LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, IGEVET (UNLP-  
CONICET) y Laboratorio de Nutrición Mineral, FCV, UNLP.**

**MIEMBROS DEL JURADO**

**MV, MSc, PhD, DECAR, Gabriel Bo. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)**

**MV, MSc, PhD, DECAR, Rodolfo Luzbel de la Sota, Cátedra de Reproducción, FCV-UNLP**

**MV, DCVet, Alejandro Palacios, Cátedra de Bioestadística, FCV-UNLP**

**La Plata, 24 de abril de 2015**

**Dedico este trabajo a Agus, Lulo, Lalo y Santy, hijos queridos  
y principales frutos de mi vida...**

## **Agradecimientos**

- ✓ A la Dra. Ceciclia Furnus, mi directora, por el ejemplo maravilloso de mantener su trabajo incansable y sin renunciar a sus valores humanos.
- ✓ Al Dr. Guillermo Mattioli, mi codirector, por todo lo compartido.
- ✓ A los Drs. Alejandro Relling, Luis Fazzio y Sebastián Picco por su apoyo y amistad.
- ✓ A mis amigos Belén, Mateo, Patricio, Juan, Matías, y a todos los compañeros que me reconfortaron con su amistad y apoyo incondicional.

## **Publicaciones parciales del presente trabajo de tesis**

- ✓ Rosa DE, Fazzio LE, Mattioli GA, Picco SJ, Furnus C. "Consecuencias reproductivas de la hipocuprosis bovina: un avance hacia su diagnóstico y prevención en rodeos de Argentina". Premio Mención otorgado por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria por el trabajo Año 2014.
- ✓ Rosa DE, Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Sirini MA, Mattioli GA, Furnus C. "Copper during in vitro maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells." XV Jornadas anuales de la Sociedad Argentina de Biología. 1-3 de Diciembre del 2014 Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

## Índice de contenidos

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Capítulo I - Introducción</b>	<b>3</b>
<b>1) Fisiología Reproductiva de bovinos - Hembra bovina</b>	<b>3</b>
<b>2) Estrés oxidativo y su relación con minerales de importancia fisiológica</b>	<b>26</b>
2-a. Los procesos oxidativos como generadores de daño	26
2-b. Los procesos oxidativos como mecanismo fisiológicos	36
<b>3) Metabolismo y deficiencia de cobre en bovinos</b>	<b>39</b>
3-a) Metabolismo del cobre	39
3-b) Carencia de Cobre	45
<b>4) Importancia del Cu sobre la fisiología reproductiva y sus consecuencias en estados de carencia</b>	<b>53</b>
<b>5) Técnica de producción de embriones bovinos in vitro</b>	<b>57</b>
5-a) Maduración <i>in vitro</i>	57
5-b) Fecundación <i>in vitro</i>	58
5-c) Cultivo de embriones in vitro	60
5-d) Coloración fluorescente para núcleos (HOESCHT 33342)	61
<b>6) Objetivo de la Tesis</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo II</b>	<b>63</b>
<b>Determinación de la Concentración de Cu en Plasma, Licor Folicular y en el medio de maduración completo</b>	<b>63</b>
II-a) Introducción	63

II-b) Materiales y métodos _____	64
II-c) Diseño experimental _____	65
II-d) Resultados _____	65
II-e) Discusión y Conclusiones del Capítulo _____	65
<b>Capítulo III _____</b>	<b>67</b>
<b>Efecto de distintas concentraciones de Cu sobre la maduración de los ovocitos bovinos _____</b>	<b>67</b>
III-a) Introducción _____	67
III-b) Materiales y métodos _____	69
III-c) Diseño experimental _____	74
III-d) Resultados _____	75
III-e) Discusión y Conclusiones del capítulo _____	79
<b>Capítulo IV _____</b>	<b>84</b>
<b>Efecto de distintas concentraciones de Cu durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto _____</b>	<b>84</b>
IV-a) Introducción _____	84
IV-b) Materiales y métodos _____	86
IV-c) Diseño experimental _____	87
IV-d) Resultados _____	88
IV-e) Discusión y Conclusiones del Capítulo _____	90
<b>Capítulo V _____</b>	<b>92</b>
<b>Rol de las células del cúmulus como puente metabólico entre el medio externo y el ovocito, con diferentes niveles en el aporte de Cu durante la MIV. _____</b>	<b>92</b>
V-a) Introducción _____	92
V-b) Materiales y métodos _____	93

V-c) Diseño experimental	94
V-d) Resultados	95
V-e) Discusión y Conclusiones del Capítulo	97
<b>Capítulo VI</b>	<b>100</b>
VI-a) Discusión General	100
VI-b) Conclusiones finales	103
Bibliografía	105
Anexos	151

## Lista de abreviaturas

**CC:** células del cúmulus

**CGP:** células germinales primordiales

**CIV:** cultivo *in vitro*

**COC:** complejo ovocito-cúmulus

**DO + CC:** ovocito desnudo cocultivado con células del cúmulus

**DO:** ovocito desnudo

**FIV:** fertilización *in vitro*

**FPM:** Factor promotor de la maduración

**FSH:** hormona folículo estimulante

**Gap:** unión estrecha

**GSH:** glutatión

**IDD:** Índice de daño

**LH:** hormona luteinizante

**LK:** ligando kit

**LF:** licor folicular

**MII:** metafase II

**MIV:** maduración *in vitro*

**ml:** mililitros

**Cu:** cobre

**Cu,Zn-SOD:** cobre, zinc- superóxido dismutasa

**ng:** nanogramos

**nmol:** nanomol

**PBS:** solución buffer de fosfato

**PIV:** producción *in vitro* de embriones

**pmol:** picomol

**PS:** fosfatidilserina

**PTZ:** proyecciones citoplasmáticas transzonales

**PVP:** polivinilpirrolidona

**ROS:** especies reactivas del oxígeno

**SFB:** suero fetal bovino

**SOD:** superóxido dismutasa

**VG:** vesícula germinal



## Lista de Tablas

	<b>Página</b>
Tabla 1. Clasificación de los folículos preantrales	7
Tabla 2. Metaloenzimas Cu-dependientes y su rol fisiológico	46
Tabla 3. División de cupremias en rangos y su asociación con el estatus del animal y sus posibles consecuencias.	52
Tabla 4. Contenido intracelular de GSH-GSSG en ovocitos bovinos y CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre	76
Tabla 5. Grado de daño del ADN en CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre.	78
Tabla 6. Efecto del Cu durante la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos sobre el desarrollo embrionario posterior.	89
Tabla 7. Efecto del Cu durante la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos sobre el porcentaje de eclosión	89
Tabla 8. Promedio de células por blastocisto al día 8 de cultivo desarrollados a partir de ovocitos madurados con distintas concentraciones de cobre.	90

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1. Esquema del desarrollo folicular	6
Figura 2. Folículos pequeños en ovarios de bovino	11
Figura 3. Esquema de formación del líquido antral	12
Figura 4. Ondas de crecimiento folicular durante un ciclo estral en bovinos	14
Figura 5. Complejos ovocitos <i>cúmulus</i> .	15
Figura 6. Representación esquemática de los períodos preparatorios de la ovulación (fase estrogénica), periovulatorios (pico de LH) y posovulatorios (fase luteal).	21
Figura 7. Esquema de la sucesión de eventos que conducen a la ovulación	22
Figura 8. Mecanismo de luteólisis por PGF2 $\alpha$ .	24
Figura 9. Variaciones en la duración del ciclo estral bovino	25
Figura 10. Generación de O <sub>2</sub> durante la fosforilación oxidativa	28
Figura 11. Interacción entre los metabolismos de glucosa y purinas, y su relación con la generación de especies reactivas de oxígeno.	29
Figura 12. Reacción de Haber Weiss con generación del poderoso ión hidroxilo y con mediación de metales de transición.	30
Figura 13. Representación esquemática de los principales orígenes de las ERO en ovocitos y embriones	31
Figura 14. Representación esquemática de los antioxidantes azufrados y sus mecanismos de acción	34
Figura 15. Representación esquemática de los antioxidantes enzimáticos y sus mecanismos de acción	35
Figura 16. Metabolismo celular del cobre en el enterocito y el hepatocito	42
Figura 17. Etapas sucesivas de la deficiencia de Cu en el animal	47
Figura 18. Acromotriquia generalizada de un ternero cruza Aberdeen Angus-Hereford con hipocuprosis	48

Figura 19. Anteojera en un ternero <i>Aberdeen Angus</i> con hipocuprosis	48
Figura 20. Imagen microscópica a 400X de un mismo campo, bajo contraste de fase o bajo fluorescencia	71
Figura 21. Clasificación de las células según la longitud del cometa	73
Figura 22. Determinación del valor de <i>Olive Tail Moment</i> (OTM)	73
Figura 23. Efecto de distintas concentraciones de cobre durante la MIV sobre la tasa de apoptosis de las células del cúmulus	77
Figura 24. Valor de <i>Olive Tail Moment</i> en CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre	78
Figura 25. Porcentaje de ADN en la cabeza en CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre	79
Figura 26. Efecto de la presencia o ausencia del cúmulus oophorus sobre el desarrollo posterior hasta el estadio de blastocisto de ovocitos bovinos madurados in vitro con y sin cobre	96

## **EFFECTO DEL COBRE DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS: IMPACTO SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL**

**Palabras claves:** cobre, maduración in vitro, ovocito bovino, embrión.

### **Resumen**

El presente trabajo de tesis consistió en evaluar el efecto de la adición de Cu durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos y sus consecuencias en el desarrollo embrionario preimplantacional. Para tal fin, se establecieron los siguientes objetivos: 1) evaluar la asociación entre las concentraciones de Cu en licor folicular y en plasma; 2) estudiar el efecto del Cu sobre la MIV; 3) evaluar el efecto del Cu durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo embrionario y 4) determinar el efecto del Cu en la MIV con ovocitos desnudos, con células del cúmulus en cocultivo o de COC completos. Para ello se utilizó como modelo experimental la Producción *in vitro* (PIV) de embriones bovino. La PIV se realizó con ovocitos obtenidos de ovarios bovinos de frigorífico. Los resultados mostraron que: 1) la concentración de Cu en el licor folicular está determinado por el estatus de Cu en el plasma; 2) el agregado de Cu al medio de MIV incrementó la concentración intracelular de GSH-GSSG en el ovocito y las CC, 3) disminuyó la tasa de apoptosis y el daño en el ADN en dichas células. Además, 4) el agregado de Cu incrementó la tasa de blastocistos y mejoró la calidad de los embriones; y 5) la tasa de blastocistos aumentó independientemente de la presencia de CC durante la MIV. En consecuencia, este estudio sugiere que el Cu actuaría como un factor importante durante la maduración del ovocito bovino favoreciendo el desarrollo embrionario temprano. Además, las evidencias obtenidas sugieren la posible existencia de transportadores de Cu en el complejo ovocito-cúmulus de bovino.

## EFFECT OF COPPER DURING BOVINE OOCYTES MATURATION ON PREIMPLANTATION EMBRYO DEVELOPMENT

**Key words:** copper, *in vitro* maturation, bovine oocyte, embryo.

### Abstract

This study evaluated the effect of adding copper (Cu) during bovine *in vitro* maturation (IVM) on preimplantational embryo development. For this purpose, we established the following objectives: 1) Study the relationship between Cu concentrations in follicular fluids and plasma; 2) Study the effect of different Cu concentrations on IVM of bovine oocytes; 3) Study the effect of different Cu concentrations during IVM on subsequent embryo development to the blastocyst stage; and 5) Study the role of cumulus cells (CC) as metabolic bridge between the external medium and the oocyte. For this end, bovine *in vitro* embryo production (IVP) was used as experimental model, including IVM, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture of embryos. The IVP was performed using bovine oocytes obtained from slaughterhouse. The results showed that: 1) Copper concentrations in follicular fluid depend on Cu plasma concentrations, 2) The addition of Cu to IVM medium increased intracellular GSH-GSSG content in oocytes and CC; 3) The rates of apoptosis and DNA damage, in both oocytes and CC, were reduced when Cu was added to IVM medium; 4) The addition of Cu in IVM medium improved the blastocyst rate and embryo quality; and 5) The percentage of blastocysts was enhanced regardless of the presence of CC during IVM. Consequently, this study indicates that Cu acts as an important factor during bovine oocyte maturation promoting early embryo development. Besides, these results suggest that Cu transporters might exist in bovine cumulus-oocyte complex.

## Capítulo I - Introducción

### 1) Fisiología Reproductiva de bovinos - Hembra bovina

#### 1-a) Ovogénesis y desarrollo folicular

La ovogénesis es el proceso por el cual se forman las gametas femeninas, encargadas de aportar el complemento haploide de cromosomas que junto con el del espermatozoide darán origen a un nuevo individuo. En los mamíferos, la ovogénesis comienza relativamente temprano, durante el desarrollo del feto, y termina meses o años más tarde en el momento de la madurez sexual del adulto (Aerts and Bols, 2010a; 2010b). La ovogénesis se inicia con la formación de las células germinales primordiales, que sufren una serie de transformaciones celulares hasta llegar al estado de ovogonia, y de ovogonia hasta ovocito, ambas etapas en el feto, para finalmente evolucionar hasta la formación del ovocito maduro (Fair, 2010).

#### Células germinales primordiales (CGP)

Los óvulos se forman a partir de un pequeño número de células germinales primordiales (CGP) de origen extragonadal (Aerts and Bols, 2010a). La aparición de las CGP durante el desarrollo embrionario se produce antes de la formación de somitos e indica el comienzo de la ovogénesis (Fortune y col., 2010). Las CGP se encuentran en el saco vitelino,

y en bovinos migran hacia las crestas genitales entre los 30 y 64 días, atraídas por factores quimiotácticos (Oktem y Oktay, 2008).

Aún no se conoce completamente el mecanismo por el cual estas células inician la migración, ni las sustancias quimiotácticas que intervienen en el movimiento direccional hacia la cresta genital. La expresión de un receptor clave en las CGP y/o la expresión de sustancias quimiotácticas secretadas por la cresta genital podrían ser los responsables de iniciar este evento (Edson y col., 2009). Farini y sus colaboradores (2007), en un ensayo de migración *in vitro*, han postulado como una de las principales sustancias quimiotácticas al ligando KIT (LK). Las CGP expresan el receptor c-KIT, mientras que las células somáticas que recubren el sitio de migración expresan el correspondiente LK. Se cree que esta señal LK/c-KIT entre las células de la ruta migratoria y las CGP promueven la supervivencia de estas últimas, su motilidad y su proliferación. El factor derivado del estroma (SDF1), expresado por las células del intestino posterior y de la cresta gonadal, es otro factor con acción quimiotáctica. Mientras que las células somáticas expresan SDF1, las CGP expresan su receptor, el CXCR-4 (Ara y col., 2003; Molyneaux y col., 2003). Existen además evidencias *in vitro* que sugieren que el esbozo de las gónadas secreta una proteína difusible del tipo TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1) que es capaz de atraer a estas células en su ruta hacia las gónadas (Godin y Wyle, 1991). Anderson y colaboradores en 1999, postularon la existencia de otra sustancia quimiotáctica denominada integrina  $\beta$ 1 (receptor de la fibronectina presente en la matriz extracelular), al observar que las CGP que no expresaban esta integrina mostraban fallas en la migración y posterior colonización gonadal.

Durante la migración, las CGP se multiplican por división mitótica llegando en bovinos a un número que supera los 2 millones de células. Este número disminuye por apoptosis a algo más de 100.000 células antes del nacimiento (Aerts and Bols, 2010a).

### **Etapas de la Ovogénesis**

#### a) Proliferación

Luego de alcanzar la superficie del epitelio de las gónadas, las células primordiales migran hacia la corteza del ovario donde, junto con las células epiteliales, dan origen a los cordones sexuales corticales (van den Hurk and Zhao, 2005). Para la colonización de las gónadas por parte de las CGP, así como para la formación de los cordones sexuales, es de suma importancia la expresión de moléculas de adhesión (De Felici y col., 2005). En el ovario, las divisiones mitóticas de las CGP resultan en la formación de grupos de ovogonias, que se encuentran conectadas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos intercelulares (Pepling y Spradling, 1998). Cuando la formación de estos grupos se completa, el ovario queda formado por unas pocas células germinales individuales y numerosos sincitios de células germinales primordiales llamados “células germinales en nido” (*Nest Germ Cells*). Antes del nacimiento, estos grupos celulares comienzan a separarse para formar los folículos individuales. Esta separación resulta crítica ya que muchas células mueren y solo algunas llegan a formar folículos primordiales (Tingen y col., 2009). La folistatina es un molécula relacionada a la superfamilia del TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor de tipo Beta*) y es en parte, la responsable de la separación de estos sincitios mientras que, el estradiol, la progesterona y la genisteína serían los inhibidores de la separación de estos grupos celulares



(Chen y col., 2007; Kimura y col., 2011). El número total de ovogonias que tiene cada individuo ya está fijado antes de la madurez sexual y en algunos casos antes del nacimiento (Yang y Fortune, 2008). Actualmente se cree que el número de divisiones mitóticas que sufre una ovogonia antes de entrar en la fase de crecimiento es fijo para cada especie (Fair, 2003).

### b) Formación del folículo primordial

Las ovogonias se diferencian a ovocitos primarios (ovocitos sin crecimiento), que se caracterizan por permanecer detenidos por un período prolongado en la profase de la primera división meiótica (P-I) (Aert and Bolt, 2010-a). Estos ovocitos, rodeados por una única capa de células epiteliales aplanadas denominadas células foliculares, forman los folículos primordiales que están ubicados superficialmente en la corteza del ovario, constituyendo la reserva de folículos que permanecerá durante toda la vida reproductiva del individuo. En la hembra bovina los folículos primordiales completos están presentes alrededor de los 90 días de gestación (Yang y Fortune, 2008).

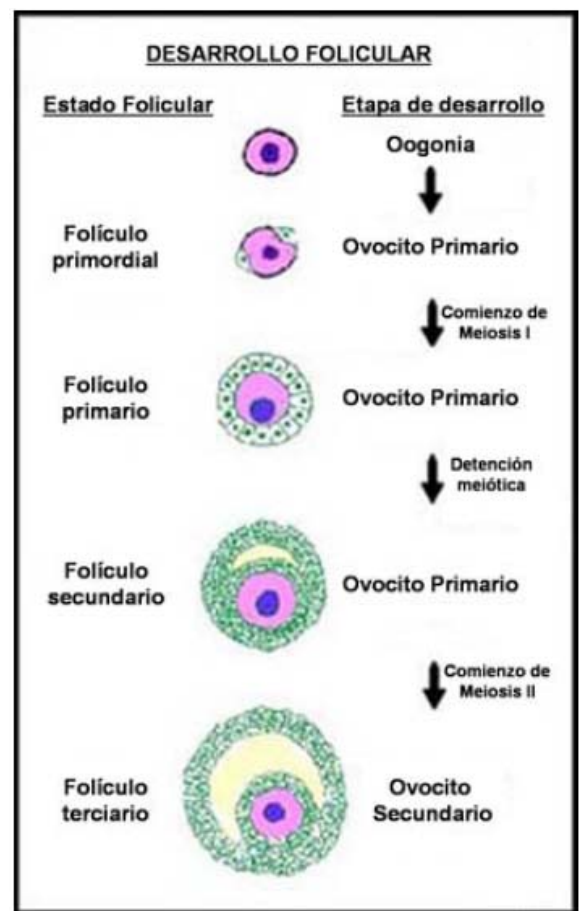


Figura 1. Esquema del desarrollo folicular. Modificada de [www.erin.utoronto.ca](http://www.erin.utoronto.ca). Universidad de Toronto.

Existe una clasificación clásica del desarrollo folicular en folículos primordiales, primarios, secundarios o preantrales, y terciarios o antrales (Fair, 2003, Figura 1). Una

clasificación más específica para bovinos sugiere la subdivisión de los folículos preantrales en dos tipos (Braw-Tal and Yossefi, 1997; Tabla 1).

Los ovocitos primarios permanecen detenidos en diplonema tardío o difuso (también llamado estadio de diacinesis) hasta que el folículo complete la atresia folicular o complete su crecimiento en respuesta al pico de LH, el cual induce la reanudación de la meiosis convirtiendo al ovocito primario en una gameta haploide (van den Hurk and Zhao, 2005).

Tabla 1. Clasificación de los folículos preantrales \*\*

Folículo (Tipo)	Capas de células de la granulosa	N° células de la granulosa	Folículo (diámetro) (rango- $\mu\text{m}$ )	Ovocito (diámetro $\mu\text{m}$ ) ( $\bar{X} \pm \text{ES}$ )	Zona pelúcida presencia	Teca interna claramente definida
<b>Primordial (tipo 1)</b>	1	< 10 (planas)	< 40	$29 \pm 0,3$	-	-
<b>Primario (tipo 2)</b>	1 – 1,5	10-40 (cúbicas)	40-80	$31 \pm 0,4$	-	-
<b>Pre-antral pequeño (tipo 3)</b>	2 – 3	41-100	81-130	$49,5 \pm 2,4$	-	+/-
<b>Pre-antral grande (tipo 4)</b>	4 – 6	101-250	131-250	$68,6 \pm 2,8$	+	+
<b>Antral pequeño (tipo 5)</b>	> 6	> 250	250-500	$92,9 \pm 4,5$	++	++

\*\*El número de capas de de células de la granulosa fue tomado en el folículo más grande, cuando el núcleo del ovocito estaba presente. (Modificado de Braw-Tal and Yossefi, 1997).

Una de las doctrinas básicas de la biología indica que la mayoría de las hembras de mamífero pierden la capacidad de renovación de las células germinales durante la vida fetal, quedando fijada la reserva de células germinales (ovocitos primarios) al nacimiento. Sin embargo, estudios realizados en primates adultos (Bukovsky y col., 2004) y en ratones (Johnson y y col., 2004) demostraron que los ovarios de estas especies poseían células

germinales mitóticamente activas capaces de formar ovocitos y folículos. Además, Bukovsky y col. (2004) observaron que los componentes de los folículos primordiales (células germinales y células de la granulosa primitiva) pueden diferenciarse a partir de células progenitoras mesenquimáticas presentes en la túnica albugínea de ovarios de mujeres adultas.

### c) Crecimiento: Folículos preantrales

Los folículos primordiales se convierten en folículos primarios tras la hipertrofia de las células planas que rodean al ovocito, y que se transforman en células cúbicas. A partir de este momento, el folículo comienza a crecer en un proceso continuo que está regulado por el ovario. El ovocito y las células foliculares que lo rodean, crecen coordinadamente progresando a través de una serie de estadios morfológicos definidos, que culminan en la ovulación de un huevo maduro o en la atresia folicular (Moniruzzaman y Miyano, 2010).

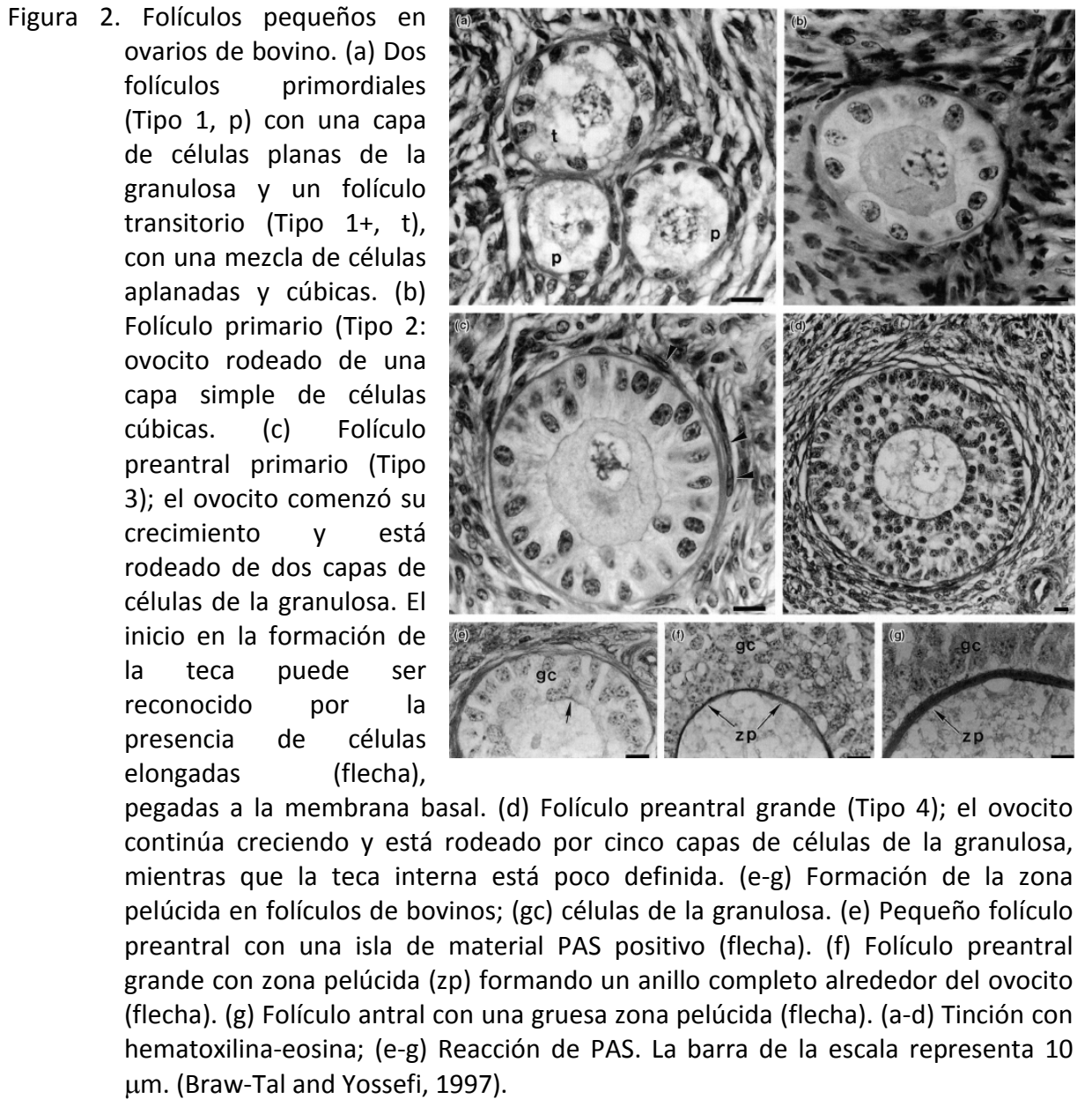
El ingreso de los folículos primordiales a la fase de crecimiento ocurre a ritmos relativamente constantes y por ciclos, es decir que periódicamente un grupo de folículos inicia esta etapa. Existe un balance entre los factores estimuladores e inhibidores de origen sistémico y local, que influyen sobre el número de folículos primordiales que comienzan a crecer en cada ciclo y que son independientes de la acción directa de la hormona FSH (Méduri y col., 2002; van den Hurk and Zhao, 2005; Tingen y col., 2009; Moniruzzaman y Miyano, 2010). Durante esta fase de crecimiento, el ovocito permanece detenido en diplonema de la primera profase meiótica e incrementa su volumen. La cantidad de citoplasma aumenta por acumulación de sustancias de reserva, produciéndose un incremento en la síntesis de ARN. Además, aumenta el número de mitocondrias que elevan

el consumo de oxígeno, se forman los gránulos corticales que contienen mucopolisacáridos y enzimas proteolíticas que se ubican por debajo de la membrana plasmática, se forman microvellosidades en la membrana citoplasmática y aparece la zona pelúcida (Aerts and Bols, 2010-a). Esta última, está constituida por glicoproteínas como la ZP I a IV, que si bien presentan variaciones entre especies son esenciales para mantener la esfericidad del ovocito, permitir la fijación del espermatozoide y generar la reacción acrosómica (Gupta y Bhandari, 2011).

La capa de células foliculares cúbicas del folículo primario se estratifica por una serie de divisiones mitóticas pasando a constituir las células de la granulosa. De esta manera queda formado el folículo preantral o folículo secundario (Young y McNeilly, 2010). Tanto los estrógenos como la FSH estimulan la proliferación de las células de la granulosa ejerciendo un efecto mitogénico sobre las mismas (Shimisu y col., 2007). Estas células, además de comunicarse entre sí, presentan uniones gap con el ovocito (Gilchrist y col., 2004). Estas uniones están formadas por proteínas llamadas conexinas, como la conexina-37 que se expresa en el ovocito a lo largo de todos los estadios de la foliculogénesis (Borowczyk y col., 2006). Este tipo de uniones se encuentran en muchos sistemas biológicos y actúan como mediadores de la comunicación intercelular, permitiendo el pasaje de pequeñas moléculas que influyen sobre las células vecinas, incluyendo nutrientes, precursores metabólicos como aminoácidos y nucleótidos, hormonas y factores de crecimiento (van den Hurk y Zhao, 2005). El ovocito estimula y controla el desarrollo de las células de la granulosa a través de las uniones *gap* y de una regulación de tipo parácrina (Gilchrist y col., 2004).

Las células tecales derivan del estroma intersticial del ovario y están presentes como células individuales en la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield 1991). Las primeras células de la teca interna pueden ser identificadas en folículos preantrales pequeños o Tipo 3. Sin embargo, la teca interna no se desarrolla claramente hasta el estadio preantral grande o Tipo 4 (Tabla 1; Fig. 2). La capa externa de la teca está densamente vascularizada y provee al folículo los factores endócrinos (Tajima y col., 2006; Rodgers y Irving-Rodgers, 2010).

Aunque los folículos multilaminares son sensibles a hormonas gonadotróficas, pueden desarrollar hacia el próximo estadio (antral) con una mínima circulación de FSH o en presencia de receptores de FSH defectuosos (McGhee and Hsueh, 2000). La hormona LH parecería ser más importante para el desarrollo del folículo multilaminar que la FSH. El crecimiento de los folículos preantrales es independiente de la acción directa de las gonadotropinas y se encuentra regulado por factores autocrinos y paracrinos, dentro de los cuales, los factores de crecimiento GDF9 y BMP15 secretados por el ovocito serían esenciales (Rajkovic y col., 2006).



## d) Maduración

### d-1) Folículos antrales

El fluido antral comienza a formarse cuando el folículo posee más de 250 células de la granulosa, y al principio son pequeñas acumulaciones que luego coalescen formando el antro folicular (Smitz y Cortvrindt, 2002). Se acepta que se forma por la atracción osmótica que generan proteoglicanos sintetizados por las células de la granulosa, con atracción de agua por las vías paracelular y transcelular

desde los vasos tecaes (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010; Figura 3). El fluido folicular es una importante fuente de sustancias regulatorias y moduladoras derivadas de la sangre, como gonadotrofinas, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, proteoglicanos y lipoproteínas (van den Hurk y Zhao, 2005). La señal que dispara la formación del antro folicular permanece poco clara hasta el momento. Estudios *In*

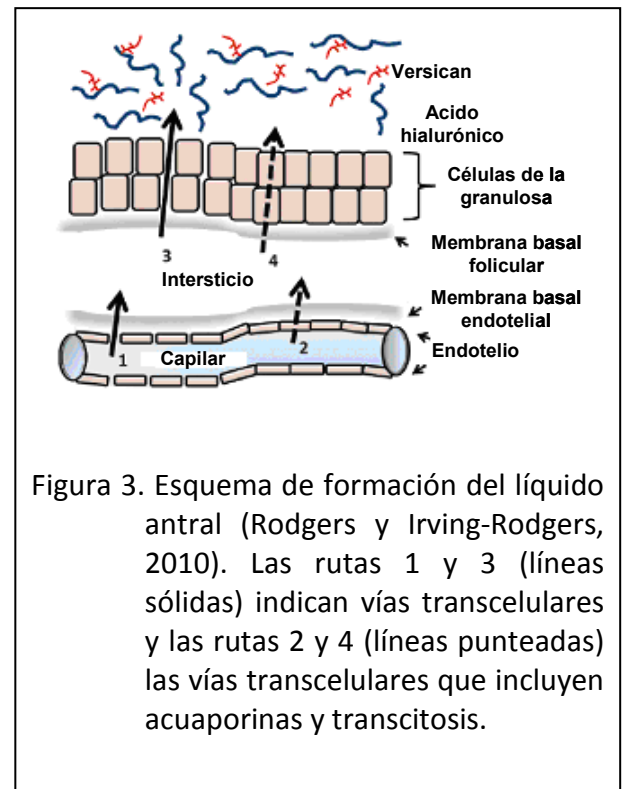


Figura 3. Esquema de formación del líquido antral (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010). Las rutas 1 y 3 (líneas sólidas) indican vías transcelulares y las rutas 2 y 4 (líneas punteadas) las vías transcelulares que incluyen acuaporinas y transcitosis.

*vitro* realizados en roedores, muestran como posibles candidatos a la FSH (Hartshorne, 1997; Mao y col., 2002), a la LH (Cortvrindt, 1998), a la activina (Zhao y col., 2001) y al Ligando K (Driancourt y col., 2000).

El desarrollo folicular se distinguen una etapa inicial, independiente de la estimulación por gonadotrofinas, y una segunda etapa dependiente de las mismas (Forde y col., 2011). Si bien los folículos antrales tempranos presentan ARNm para receptores de FSH, estos folículos son relativamente independientes de las gonadotrofinas durante el período de crecimiento inicial. Estos folículos aumentan su tamaño en presencia de muy bajas concentraciones de FSH y LH e incluso, lo hacen en ausencia de las mismas (van den Hurk y Zhao, 2005). Cuando los folículos antrales alcanzan un tamaño de aproximadamente 4 a 5 mm en la hembra bovina, se vuelven dependientes de gonadotrofinas y son reclutados para continuar su crecimiento (Driancourt, 2001). El número de folículos reclutados varía entre las especies, siendo de 5 a 20 en bovinos (Forde y col., 2011). El reclutamiento y la selección de folículos antrales ocurren en forma de ondas, con 2 a 3 ondas por ciclo estral, la última de las cuales llega a la ovulación (Figura 4). Una señal hormonal selecciona un grupo de folículos que continúan su crecimiento. En esta selección intervienen las hormonas FSH, LH y los estrógenos. La FSH estimula el crecimiento de los folículos por proliferación de las células foliculares. Cuando los folículos superan los 8 mm en vacas, comienzan a desarrollarse receptores de LH en las células de la granulosa y reciben el nombre de dominantes (Driancourt, 2001). Estos folículos sometidos a la acción de la LH, independientemente de que la concentración de FSH disminuya, crecerán rápidamente en pocos días y se volverán más grandes que el resto. En los folículos dominantes, el ovocito se encuentra rodeado muy estrechamente por células de la granulosa conocidas como células del *cúmulus*, formando un complejo muy compacto llamado complejo ovocito - *cúmulus* (COC), cuyo desarrollo *in vitro* es dependiente de FSH.



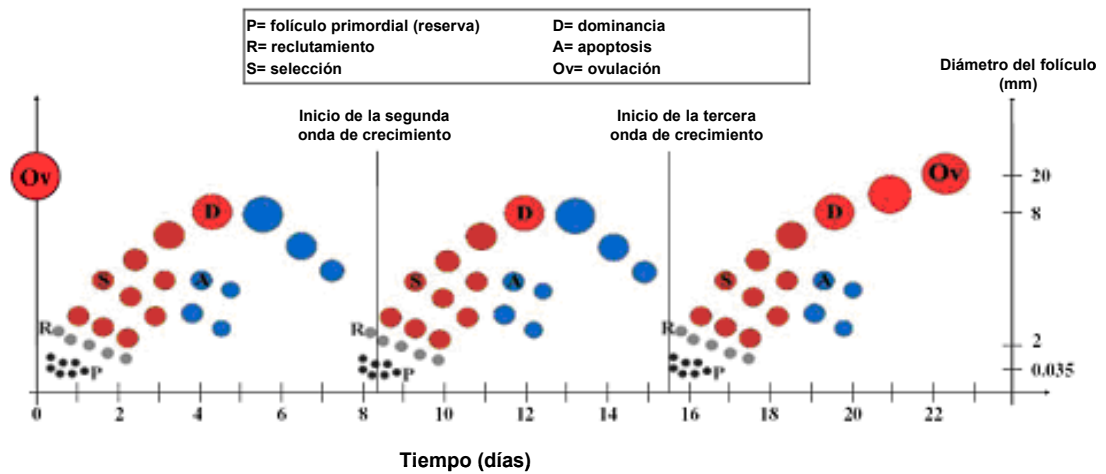


Figura 4. Ondas de crecimiento folicular durante un ciclo estral en bovinos. Cada onda de crecimiento folicular incluye una etapa de reclutamiento (R) de folículos primordiales de reserva (P), seguido de una etapa de selección de uno de ellos (S), mientras el resto se atrofia (A), y finalmente una etapa de dominancia (D) (modificado de Aerts y Bols, 2010-b).

Este complejo es una “península” embebida en líquido folicular y conectado con las células de la granulosa mural que rodean el antro folicular (Eppig y col., 2002; Figura 5). La dominancia folicular se encuentra reforzada por al menos dos factores locales, el IGF-I que estimula la formación de receptores para LH (Chase y col., 1998) y el VEGF, un potente promotor de la angiogénesis derivado de la teca, cuya producción se encuentra estimulada por la LH (Garrido y col., 1993). La LH que llega a las células foliculares estimula la producción de altos niveles de estrógenos, que mediante un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo e hipófisis, inhiben la producción de FSH, privando a los folículos menos desarrollados de la cantidad de hormona necesaria para comenzar o completar el proceso de crecimiento (Zelevnik, 1981). Se cree que esta inhibición disminuye la actividad de la enzima aromatasa, que es dependiente de FSH. Esta

falta de estrógenos en los folículos menos maduros impide completar su desarrollo por lo que estarían destinados a la atresia (Aerts and Bols, 2010-b).

Cuando se forma el antro, el ovocito finaliza su crecimiento y está en condiciones de reanudar la meiosis (Mattson y Albertini, 1990; Wickramasinghe y col., 1991). Las células de la granulosa poseen entonces un gradiente en el número de receptores para LH, siendo mucho más abundantes en las células próximas a la membrana basal que en las que están más alejadas de ella.

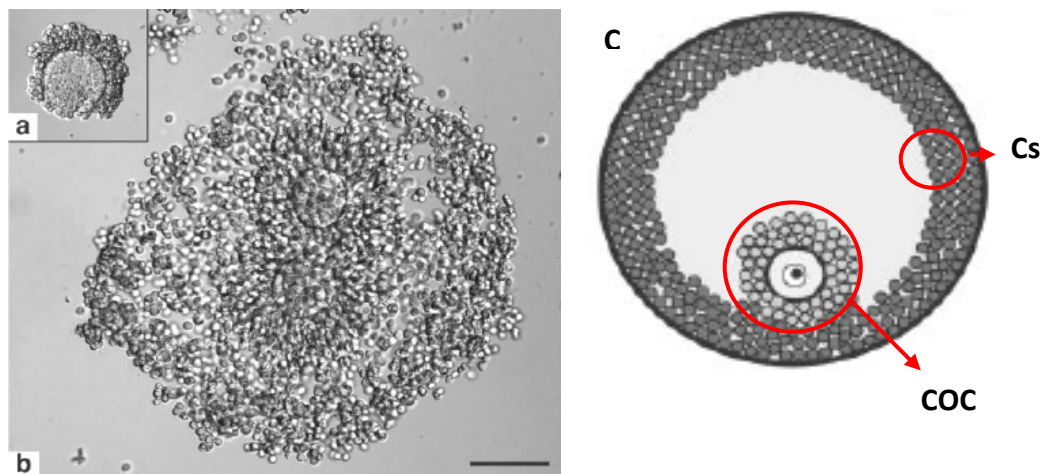


Figura 5. Complejos ovocitos *cúmulus*. Obsérvese la diferencia en la expansión de los COC *in vitro* con estimulación de FSH (a) y sin la misma (b). La barra de la escala representa 100  $\mu\text{m}$ . (c) Esquema de la estructura del folículo dominante con células de la granulosa dentro del COC y células murales. (Eppig y col., 2002).

## d-2) Maduración nuclear o meiótica.

Durante el período comprendido entre el pico de LH y la ovulación, el ovocito sufre una serie de cambios en su núcleo y en su citoplasma, proceso al que se denomina maduración del ovocito. En el mismo ocurre redistribución de organelas celulares, migración de mitocondrias a una posición perinuclear y acumulación de los gránulos a lo largo del oolema (van den Hurk and Zhao, 2005).

El progreso del ovocito desde el estadio de P-I hasta el de M-II se denomina maduración meiótica. Este proceso se lleva a cabo en aproximadamente 24 horas en rumiantes y se caracteriza por un fuerte incremento en la síntesis de proteínas durante el período de ruptura de la membrana nuclear o VG (van den Hurk and Zhao, 2005). Ya que no se puede realizar la transcripción *de novo* en este momento del ciclo, las proteínas deben ser sintetizadas a partir de un *pool* de ARNm latente. Por lo tanto, la regulación de la expresión génica en esta etapa del desarrollo está regulada a nivel de la traducción del ARNm preformado (Wrenzycki y col., 2007).

La maduración o competencia meiótica se caracteriza por la disolución de la membrana nuclear, la condensación de la cromatina formando cromosomas bivalentes distinguibles, la separación de los cromosomas homólogos, la emisión del primer cuerpo polar, y la detención en M-II con los cromosomas alineados en el huso acromático. Los ovocitos ovulados completan la meiosis con la separación de las cromátidas y la emisión del segundo cuerpo polar (segunda división reduccional) en el momento de la fecundación. Este proceso es inducido por la penetración del espermatozoide, completándose así el ciclo

celular y la subsecuente transición desde un tipo de división meiótica a una mitótica (Fan y Sun, 2004). La meiosis *in vivo* se inicia por el estímulo hormonal generado por la oleada de LH, pero en condiciones *in vitro* el proceso meiótico continúa, aún en medios carentes de LH (Hashimoto y col., 2002; Hashimoto, 2009).

Entre las múltiples moléculas que regulan la maduración del ovocito, se ha señalado como una de las más importantes al factor promotor de la maduración (FPM), que desempeña un papel clave en la ruptura de la VG (Liang y col., 2007). Posteriormente se determinó que el FPM participa tanto en la división meiótica como en la mitótica, por lo que actualmente se lo considera el regulador universal del ciclo celular o factor promotor de metafase (Han and Conti, 2006).

Los sustratos sobre los cuales actúa el FPM, son: a) la histona H1 cuya fosforilación interviene en la condensación de los cromosomas; b) las laminas que forman una malla fibrilar sobre la cara interna de la membrana nuclear y cuya fosforilación provoca la despolimerización y consiguiente ruptura de la membrana al fin de la profase y c) la nucleolina (N° 38 o B23) que al ser fosforilada por el FPM provoca el desensamblaje del nucléolo durante la división celular (Perry y Verlhac, 2008). El FPM regula además, la duración de las fases del ciclo celular durante la meiosis y controla los eventos para la formación de un huso meiótico funcional y la posterior división celular (Brunet and Maro, 2005).

El FPM es un heterodímero compuesto de una subunidad reguladora llamada ciclina B1 y una subunidad pequeña, catalítica llamada p34 (Liang y col., 2007; Solc y col., 2010).

Esta última, también conocida como quinasa dependiente de ciclina (CDK) 1, es una proteína quinasa (serina-treonina) de 34.000 Daltons que fue descubierta en levaduras y que es codificada por el gen *cdc 2* perteneciente al grupo de genes *cdc* que controlan la división celular (Nurse, 1990).

El FPM se activa en el momento de la ruptura de la VG y aumenta hasta alcanzar una meseta al final de la meiosis I. Una disminución transitoria de la actividad se lleva a cabo durante la transición desde la meiosis I a la meiosis II, para luego reactivarse rápidamente y mantenerse en un nivel alto durante toda la detención en MII (Brunet y Maro, 2005). La actividad del FPM es controlada por la concentración celular de ciclina B, que se encuentra determinada por su síntesis y degradación. Esta ciclina entra en la VG justo antes de su ruptura (Marangos y Carroll, 2004). Luego de la misma, su síntesis aumenta progresivamente alcanzando su máximo nivel al final de la meiosis I. La ciclina sintetizada se asocia con la subunidad p34 para formar el complejo activo. La degradación de ciclina B es necesaria para la expulsión del cuerpo polar (Ledan y col., 2001; Herbert y col., 2003; Terret y col., 2003).

Luego de la ruptura de la vesícula germinal aparece un factor citostático (FCS) que controla la detención en M-II y alcanza su concentración máxima cuando el ovocito llega a esta etapa (Perry y Verlhac, 2009). El FCS está constituido por una fosfoproteína de 39000 Daltons (p39), producto del gen *c-mos* y por una quinasa 2 que es producto del gen *cdk 2* dependiente de ciclina, que es muy sensible a los iones calcio y actúa inhibiendo la proteólisis de la ciclina (Watanabe y col., 1991; Gabrielli y col., 1993). Mientras la ciclina no es degradada, el FPM permanece activo. Otra proteína quinasa importante en la regulación del ciclo celular meiótico es la MAP quinasa, la cual fosforila proteínas cromosómicas

importantes para mantener a la cromatina en un estado condensado durante la transición de meiosis I a meiosis II y prevenir la formación de la envoltura nuclear por la fosforilación de las láminas nucleares (Gil Villa y col., 2007).

### d-3) Regulación hormonal de la maduración en mamíferos

Durante la fase de crecimiento del ovocito, la hipófisis secreta cantidades crecientes de FSH, que estimula la proliferación de las células de la granulosa y la formación de nuevos receptores para LH sobre la superficie de las mismas. Poco después del período de crecimiento inicial del folículo, la hipófisis comienza a secretar LH (hormona responsable de iniciar la maduración del ovocito). Las hormonas LH y FSH inducen a las células de la granulosa a sintetizar y liberar cantidades crecientes de estrógenos. El estradiol induce la síntesis de receptores de LH en las células de la granulosa, estimula su crecimiento, mantiene los receptores de FSH, eleva la actividad de la aromatasa con el subsecuente aumento en la producción de estradiol e inhibe la secreción hipofisaria de FSH.

Cuando los estrógenos circulantes se elevan, debido al crecimiento folicular, la secreción de FSH disminuye mientras que la de LH aumenta. El pico de LH se produce por estímulo de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) liberada por el hipotálamo en respuesta al estradiol. Los folículos preovulatorios expresan en las células de la granulosa gran cantidad de receptores de LH, que les permite responder a este pico iniciando una cascada de acontecimientos que conducen a la reanudación meiótica de los ovocitos, la expansión del cúmulus, la ruptura del folículo, la ovulación y finalmente la diferenciación de las células granulosas y tecaes para formar el CL (Edson y col., 2009).

## 1-b) Ovulación

Al final de la fase folicular, cuando los niveles de estradiol alcanzan su valor máximo, se produce un cambio en el efecto que esta hormona ejerce a nivel hipotalámico. La potente retroalimentación negativa del estradiol cambia a positiva a través de un mecanismo que aún permanece poco comprendido. Esto causa un aumento continuo en la liberación de GnRH (pico de GnRH), que junto con un aumento de la capacidad de respuesta gonadotrófica al factor de liberación, provoca el pico preovulatorio de LH (Rutter y Russo, 2002; Figura 6).

La ovulación ocurre durante el estro en todas las especies domesticas con excepción del bovino, que lo hace durante el metaestro (Forde y col., 2011). La ovulación espontánea en el bovino ocurre entre las 10 y 20 horas posteriores a la terminación del celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH, que provoca como primer evento un aumento del flujo sanguíneo en el folículo ovulatorio, mediado probablemente por agentes vasoactivos tales como histamina, quininas, prostaglandinas y lipooxigenasas. Posteriormente se edematizan las tecas interna y externa, se disocia el COC, se interrumpe la inhibición de la meiosis y se elimina el primer corpúsculo polar. A medida que el folículo avanza en su desarrollo hacia la ovulación se produce una reacción inflamatoria aguda controlada. Aumenta la despolarización de las células foliculares, se generan potenciales de acción y cambios en la concentración del  $Ca^{+2}$  citosólico, que contribuirían a la desintegración de tejido intacto de la superficie del ovario. Este proceso de degradación del tejido conectivo que separa el folículo de la superficie ovárica inicia la formación del estigma,

área extremadamente delgada del ápice folicular. La PGE2 estimula al activador del plasminógeno que media el paso del plasminógeno a plasmina. Esta última es la encargada de activar la colagenasa que lisa el tejido conectivo del estroma ovárico. La PGF2 $\alpha$  provoca la ruptura de los lisosomas con la consecuente liberación de las enzimas contenidas en su interior, las que sumadas a la actividad de la plasmina, culminan con la formación del estigma. La PGF2 $\alpha$ , también produciría contracciones ováricas que provocarían la ruptura del folículo y finalmente la liberación del ovocito rodeado por su *cúmulus* (Palma, 2001) (Figura 6).

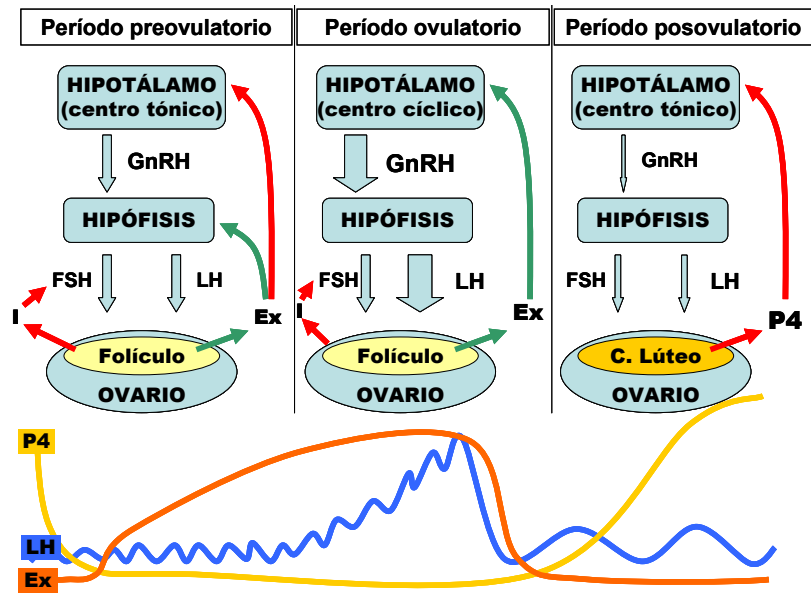


Figura 6. Representación esquemática de los periodos preparatorios de la ovulación (fase estrogénica), periovulatorios (pico de LH) y posovulatorios (fase luteal).



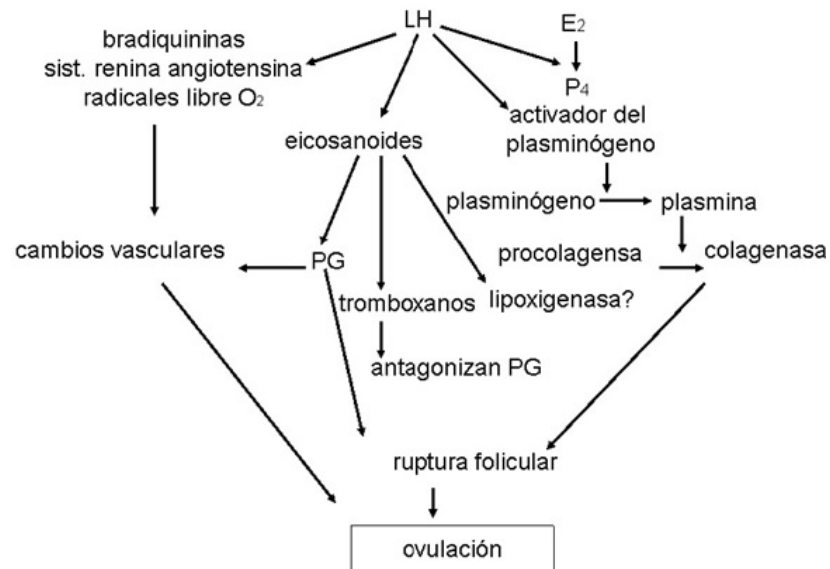


Figura 7. Esquema de la sucesión de eventos que conducen a la ovulación (Gigli y col., 2006).

### 1-a-3) Fase luteal del ciclo estral

Finalizada la ovulación, los restos del folículo vacío pasan a luteinizarse por acción de la LH, formando primero un cuerpo hemorrágico que luego evoluciona a un cuerpo luteo maduro (Forde y col., 2011). Estas estructuras son las encargadas de mantener elevados niveles de P4 en plasma, inhibiendo la secreción hipotalámica de GnRH, lo cual hace que las ondas de crecimiento folicular durante esta fase conduzcan a la atresia y no lleguen a ovular (Figura 6). Esta etapa culmina con la luteólisis, a cargo de la PGF2 $\alpha$  endometrial en caso que no exista concepción, reanudando el ciclo (Krzymowski and Stefańczyk-Krzymowska, 2008).

El cuerpo lúteo queda conformado por dos tipos celulares productores de P4, las células pequeñas (20  $\mu$ m), derivadas de la teca interna, que producen bajos niveles de P4

pero responden a LH, y Cs grandes (25 a 40  $\mu\text{m}$ ), derivadas de la granulosa y que producen la mayor parte de la P4 y de manera constitutiva (sin estímulo hormonal), siendo además responsables de producir oxitocina (Rutter y Russo, 2002).

A mitad de la fase luteal, la elevada y sostenida concentración de P4 inhibe la expresión de sus propios receptores en la superficie luminal del endometrio, y comienzan los cambios que conducen a la receptividad uterina (Spencer y col., 2008; Forde y col., 2009).

La luteólisis sobreviene si para el día 16 del ciclo no existe un reconocimiento materno de la preñez, que en bovinos ocurre por acción del interferón tau (IFN-tau) fetal (Forde y col., 2011). La efectividad de la  $\text{PGF2}\alpha$  como factor luteolítico no depende sólo de sus mecanismos de acción, sino también de una secreción creciente estimulada por un mecanismo de feedback positivo desde el propio cuerpo lúteo, y que se detendrá sólo cuando este último se haya inactivado. Este feedback es iniciado por la oxitocina hipofisaria que estimula la síntesis de  $\text{PGF2}\alpha$  en el endometrio, la cual sale a circulación y estimula la secreción de oxitocina luteal, iniciando la retroalimentación positiva. Este sistema propuesto logra funcionar sólo si los estrógenos generados en los folículos reclutados en la fase luteal estimulan la expresión de los receptores para la oxitocina en el endometrio y para la  $\text{PGF2}\alpha$  en las células luteales (Figura 8). La acción luteolítica de la  $\text{PGF2}\alpha$  podría deberse a varios mecanismos. Serían importantes los cambios vasculares, con un agudo aumento del flujo sanguíneo inicial, mediado por ON, seguido por vasoconstricciones intensas mediadas por angiotensina II y endotelina 1 (Miyamoto y col., 2005). La  $\text{PGF2}\alpha$  genera además estrés oxidativo, con aumento de la peroxidación lipídica (Motta y col., 2001).

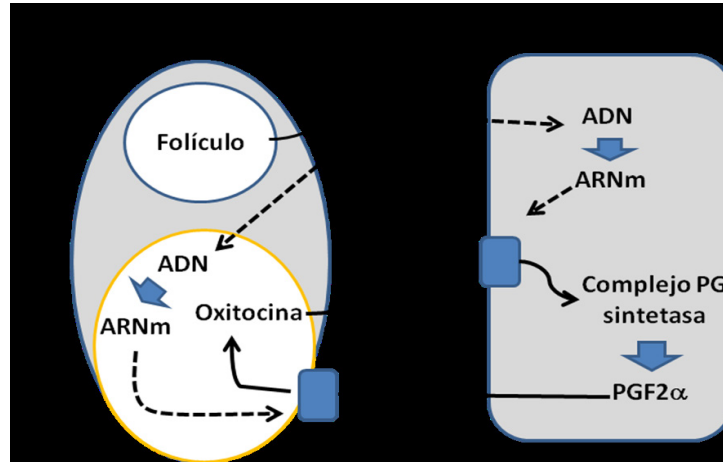


Figura 8. Mecanismo de luteólisis por  $\text{PGF2}\alpha$ . La oxitocina del cuerpo lúteo estimula la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  y ésta la de nueva oxitocina (feedback positivo). Los receptores para ambas hormonas dependen de estrógenos originados en folículos en desarrollo. (Modificada de Rutter y Russo, 2002)

Durante la luteólisis existe una invasión de células inmunes, como macrófagos y linfocitos T, que median a través del  $\text{TNF}\alpha$  y del ON una acción luteolítica complementaria, estimulando la apoptosis celular en células esteroideogénicas y endoteliales del cuerpo lúteo (Skarzynski y col., 2009). El IFN-tau suprime la acción de la  $\text{PGF2}\alpha$  (Okuda y col., 2002).

Cuando los niveles de P4 disminuyen por la luteólisis, cesa su inhibición sobre la GnRH y permite la aparición de un nuevo ciclo, que variará en su duración dependiendo de la onda de crecimiento folicular que lleva a la siguiente ovulación (Lucy y col., 2011. Figura 9).

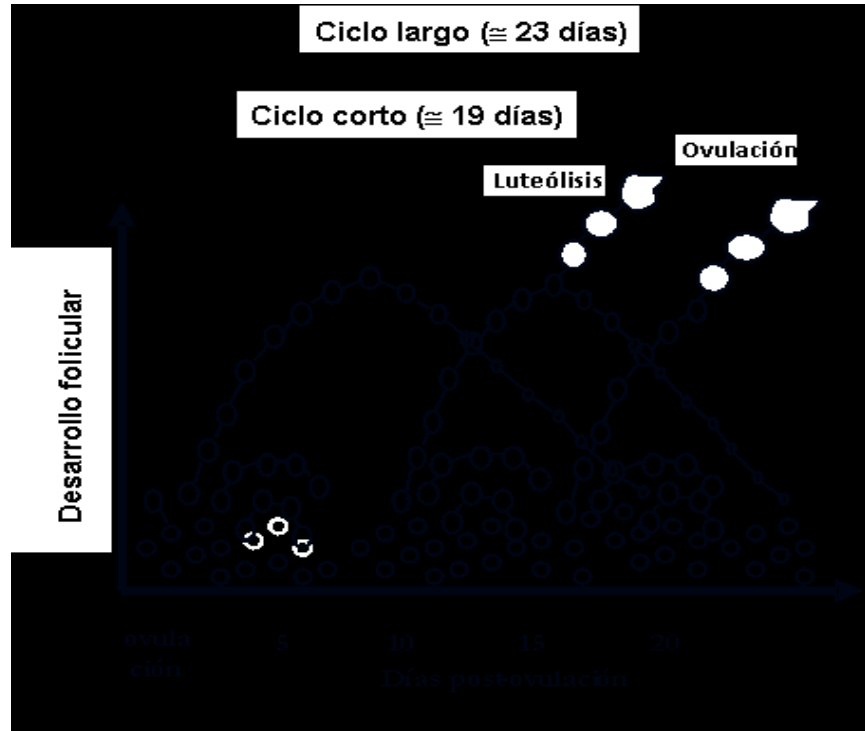


Figura 9. Variaciones en la duración del ciclo estral bovino en función del cese en la inhibición hipotalámica de la P4, generando la ovulación a partir de la segunda o tercer onda de crecimiento folicular (Modificada de Lucy y col, 1992).

## **2) Estrés oxidativo y su relación con minerales de importancia fisiológica**

Los procesos oxidativos han recibido enorme atención por su relación con la fisiología y la fisiopatología de la reproducción. Si bien se los reconoció inicialmente como factores de daño, los procesos oxidativos poseen también enorme importancia fisiológica. Ambos aspectos serán presentados en los siguientes apartados.

### **2-a. Los procesos oxidativos como generadores de daño**

Todos los procesos biotecnológicos de reproducción asistida han planteado dificultades técnicas que comprometen la viabilidad de los embriones producidos. Un factor asociado a dichas fallas es el daño oxidativo (Lonergan y col., 2003; Al-Gubory y col., 2010). Se presentarán a continuación los conceptos de daño oxidativo, su origen, los mecanismos de defensa contra el mismo y su asociación con minerales de importancia productiva.

Se llama daño oxidativo a una serie de cambios dañinos, irreversibles y usualmente letales para las células, que se originan por reacciones de reducción univalente de compuestos químicos vitales (Agnez-Lima y col., 2012). Los procesos de reducción implican que un compuesto cede a otro uno o varios electrones. El compuesto que cede electrones se denomina reductor y el que los recibe es el oxidante. Esta reacción no es necesariamente dañina, sino que por el contrario puede ser de vital importancia fisiológica, como por ejemplo la reducción de O<sub>2</sub> molecular a agua al final de la fosforilación oxidativa mitocondrial, acoplada a la producción de ATP en las células eucariotas (Buonocore y col.,

2010). Sin embargo, cuando esta reducción no es ordenada y se transfieren electrones desapareados, se generan productos intermedios, altamente reactivos y que buscan transferir estos electrones desapareados a otras moléculas. Se forman así especies reactivas, de las cuales las especies reactivas de oxígeno (ERO) son las de mayor importancia por afectar negativamente los procesos reproductivos *in vivo* e *in vitro* (Agarwal y col., 2006; Takahashi, 2012).

Las principales ERO incluyen al ión superóxido ( $O_2^\circ$ ), al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al radical hidroxilo ( $OH^\circ$ ). Estas ERO se generan por la transferencia al oxígeno de uno, dos o tres electrones respectivamente (Guérin y col., 2001). Usualmente se genera el  $O_2^\circ$  por diferentes vías, y luego este dismuta en  $H_2O_2$  (Buonocore y col., 2010). Existen tres fuentes principales de generación de  $O_2^\circ$ , una es la fosforilación oxidativa, otra es la vía del nicotina-adenosina-fosfato reducido (NADPH) y la tercera es la vía de la xantino oxidasa (XO) (Guérin y col., 2001).

La fosforilación oxidativa genera  $O_2^\circ$ , especialmente a nivel de los Complejos I y III (Dikalov, 2011; Figura 21). En condiciones normales el 3% de estas reacciones fallan y generan el  $O_2^\circ$ . Teniendo en cuenta que un embrión posee alrededor de 100 veces más cantidad de mitocondrias que una célula somática promedio, la generación de  $O_2^\circ$  por esta vía es importante (Takahashi, 2012). La citocromo C oxidasa es una enzima de la cadena respiratoria incorporada al complejo IV, e intervine en el paso final de formación de agua. Se trata de una metaloenzima que requiere Cu para su normal funcionamiento, por lo cual la carencia de Cu se asocia a mayor producción de  $O_2^\circ$  y menor síntesis de ATP, incluso en embriones (Hawk y col., 1998; Hawk y col., 2003).

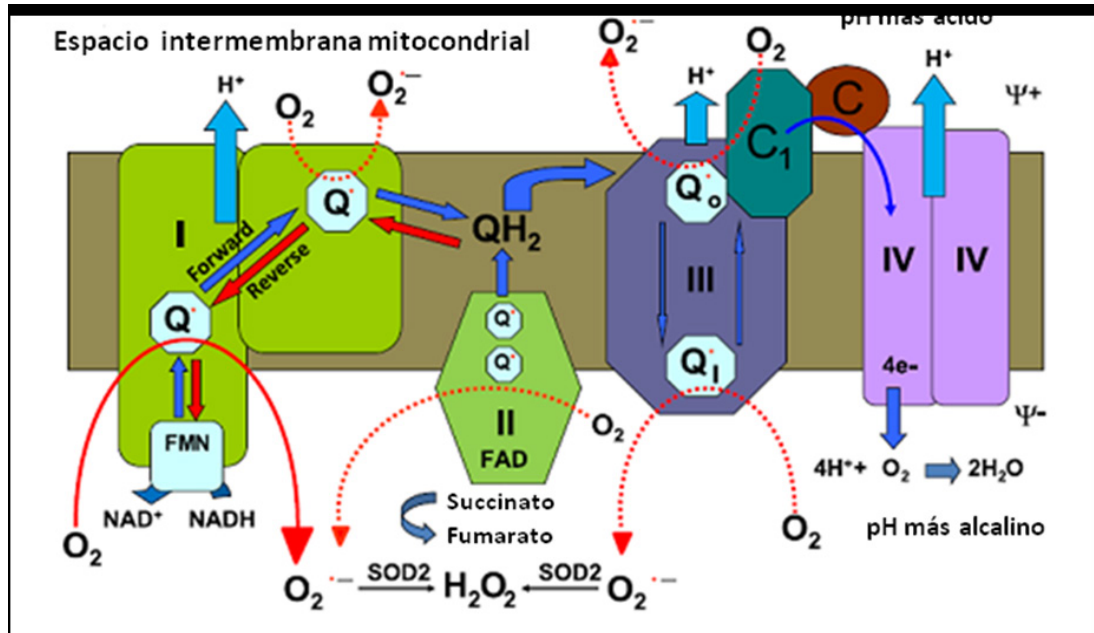


Figura 10. Generación de O<sub>2</sub> durante la fosforilación oxidativa (Dikalov, 2011).

El NADPH cede electrones y genera ERO al activarse la enzima NADPH oxidasa, siendo un mecanismo fisiológico de señalización celular y de respuesta inmune, y que además puede ser activada por compuestos exógenos o xenobióticos que generan NADPH por activación de reductasas, explicando la acción dañina de contaminantes o xenobióticos en técnicas *in vitro* (Guérin y col., 2001). El aumento en la producción de ERO mitocondrial puede estimular la producción de NADPH oxidasa, generando un círculo vicioso de estrés oxidativo (Dikalov, 2011). El NADPH es también producto de la Vía de Pentosas Fosfato, con la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como enzima paso limitante (Stanton, 2012). Esta vía es activa en células germinales y embriones para la generación de poder reductor (Dumollard y col., 2007). Sin embargo, la activación de esta vía es dependiente del aporte de glucosa a la célula, y de manera directa genera hipoxantinas y

xantinas. La xantina es el producto final del catabolismo de las purinas, y su conversión por la XO genera ERO y daño oxidativo (Figura 11). Esta afirmación encuentra apoyo en el aumento de lesiones en embriones a los que se les aumenta el aporte de glucosa o bien cigotos cuando degradan en ARNm residual materno (Guérin y col., 2001).

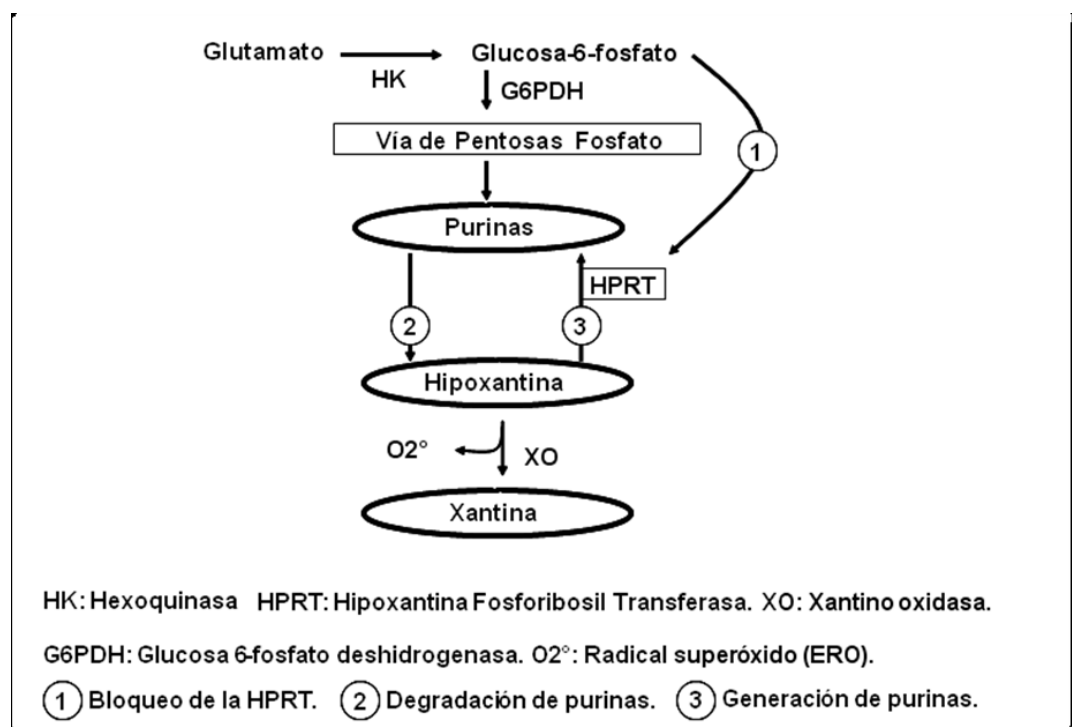


Figura 11. Interacción entre los metabolismos de glucosa y purinas, y su relación con la generación de especies reactivas de oxígeno. Obsérvese como la inhibición en la síntesis de purinas estimula las generación de ERO (Modificado de Guérin y col., 2001).



El  $H_2O_2$  puede ser producido directamente en algunas reacciones químicas del embrión, como por glicolato o por XO, pero la vía más común es a través de la dismutación del  $O_2^\bullet$  por una metaloenzima llamada superóxido dismutasa (SOD), paso inicial de inactivación de las ERO (Combelles y col., 2010). Tanto el  $H_2O_2$  como el  $O_2^\bullet$  poseen un efecto oxidativo menor, pero poseen también dos características que los hacen dañinos: tienen alta capacidad de difusión y en presencia de metales como hierro y cobre generan el poderoso  $OH^\bullet$ , en la reacción de Fenton. La reacción se hace cíclica retroalimentándose con los cambios del estado de óxido reducción de los metales en la Reacción de Haber Weiss (Kehner, 2000; Figura 12).

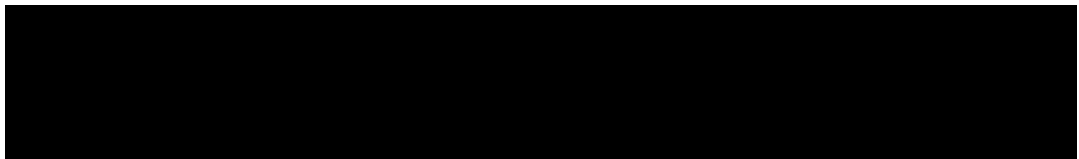


Figura 12. Reacción de Haber Weiss con generación del poderoso ión hidroxilo y con mediación de metales de transición.

Ciertos factores externos al medio de cultivo de embriones pueden generar ERO. Por ejemplo la excesiva exposición a la luz visible (Goto y col., 1993), la enzima amino oxidasa (EC 1.4.3.6) agregada por la adición de suero bovino o bien por espermatozoides que rodean al ovocito durante la FIV, o bien que se lisan liberando su carga enzimática al medio (Alvarez y col., 1996; Quinn y col., 1998). El aumento en la tensión de  $O_2$  en el medio de cultivo aumenta la acción de las oxidasas que generan  $O_2^\bullet$ , perjudicando el desarrollo embrionario en bovinos (Nagao y col., 1994). En estas condiciones aumenta el consumo de sustancias con

capacidad reductora como la de glutatión (GSH) en el medio (Bilodeau y col., 1999). En la Figura 13 se esquematizan algunos de los factores citados.

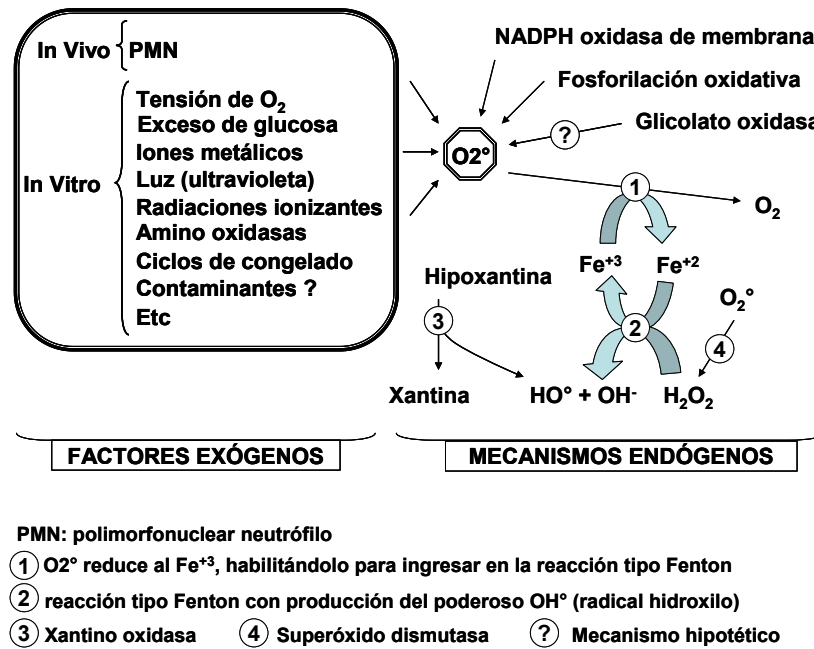


Figura 13. Representación esquemática de los principales orígenes de las ERO en ovocitos y embriones (Guérin y col., 2001).

Los efectos dañinos de las ERO sobre los embriones son variados, afectando a lípidos, proteínas y al ADN, causando alteraciones mitocondriales, inhibición del desarrollo, depleción del ATP y apoptosis (Guérin y col., 2001). Sobre los lípidos las ERO generan procesos de peroxidación, que han demostrado capacidad para bloquear embriones de ratón en el estadio de dos células (Noda y col., 1991). Sobre las proteínas las ERO causan oxidaciones de los grupos sulfidrilos y generación de puentes disulfuro (Kehner, 2000; Stadtman y Levine, 2003). En el ADN el daño oxidativo se expresa con efectos genotóxicos y

clastogénicos, fragmentación del ADN de espermatozoides, ovocitos y embriones (Halliwell y Gutteridge, 1989; Takahashi y col., 2000; Takahashi, 2012). Las alteraciones mitocondriales secundarias al estrés oxidativo son evidentes, especialmente en el ADN mitocondrial carentes del efecto protector de las histonas (Taanman, 1999). Las técnicas de MIV, FIV y CIV generan un estrés oxidativo superior al esperado en condiciones *in vivo* (Noda y col., 1991; Agarwal y col., 2006). Las fallas en la generación de ATP por efecto de las ERO son debidas al daño mitocondrial, al mayor consumo energético para reparar dicho daño y a una inhibición competitiva por la glucosa, que comienza a ser desviada hacia la vía de pentosas fosfato para generar poder reductor (Guérin y col., 2001). Tanto la acumulación de  $O_2^\bullet$  como de  $H_2O_2$  generan apoptosis celular en embriones humanos (Yang y col., 1998-de Guérin y col., 2001). Si bien los procesos de criopreservación han mejorado (Zhou y col., 2010), las mismas ERO aumentan su concentración y el correspondiente daño cuando las técnicas incluyen ciclos de congelado y descongelado, tanto sea de espermatozoides (Dalzell y col., 2004; Hendricks y Hansen, 2010), ovocitos (Van Blerkom y Davis, 1994) o embriones (Lim y col., 2008).

El daño oxidativo es la expresión extrema del estrés oxidativo. En realidad, la fisiología celular en general, y de la reproducción en particular, son dependientes de fenómenos oxidativos mediados por ROS (Valko y col., 2007; Gupta y Bhandari, 2011; Ray y col., 2012). Por esta razón los fenómenos oxidativos no son abolidos sino controlados por mecanismos antioxidantes que mantienen el equilibrio fisiológico. Estos mecanismos de defensa antioxidante actúan contra las ERO de tres modos: evitando su formación, neutralizándolas una vez formadas, o bien reparando el daño generado.

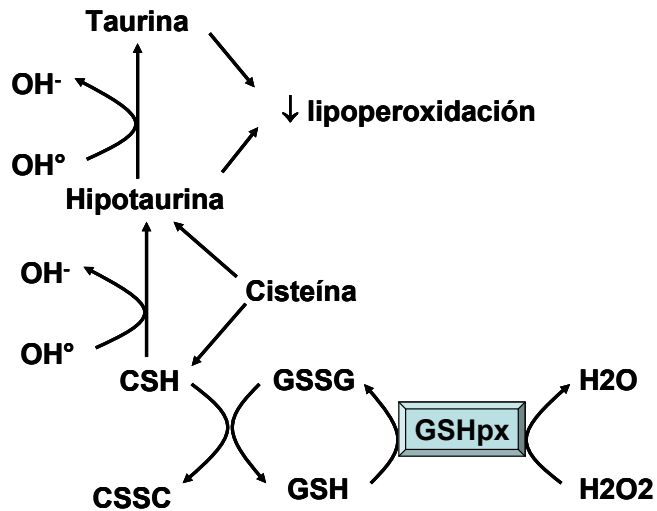
Células germinales y embriones evitan la sobreproducción de ERO ajustando su metabolismo energético y evitando la exposición a metales con capacidad redox, lo cual explica la presencia de transferrina en el licor folicular y en el fluido oviductal (Entman y col., 1987; Aleporou-Marinou y col., 2002).

Los mecanismos de neutralización de ERO, o antioxidantes, incluyen mecanismos no enzimáticos y enzimáticos de inactivación.

Entre los mecanismos no enzimáticos se encuentran compuestos azufrados, como GSH y cisteamina (CSH), vitaminas A, C y E y el piruvato.

El GSH es el principal antioxidante no enzimático del embrión, aportando capacidad reductora y a su vez como sustrato de la glutatión peroxidasa (GSHpx), la principal enzima antioxidante del mismo (Takahashi, 2012). Por esta razón la adición de GSH o de cisteína, como precursor de GSH, mejora la producción *in vitro* de embriones bovinos (Furnus y col., 2008; Curnow y col., 2010). La CSH es un neutralizante de  $\text{OH}^\circ$ , y a su vez contribuye a generar GSH. La CSH es regenerada a partir de cisteína, y actúa como antioxidante inactivando  $\text{OH}^\circ$  convirtiéndose en hipotaurina, otro neutralizante de  $\text{OH}^\circ$  que se convierte en taurina. Por otro lado tanto taurina como hipotaurina poseen efecto antioxidante inhibiendo la peroxidación lipídica de membranas (Figura 14). De este modo, cisteína, CSH, hipotaurina y taurina tendrían una acción protectora complementaria y secuencial sobre gametas y embriones (Guérin y col., 2001). Estos compuestos están presentes en fluidos seminal, foliculares y oviductales y su adición ha sido efectiva para mejorar procesos *in vitro*

como maduración y cultivo embrionario (Alí y col., 2003; Gadea y col., 2008, Takahashi, 2012).



**CSH: Cisteamina reducida. CSSC: Cisteamina oxidada.**  
**GSH: Glutation reducido. GSSG: Glutation oxidado.**  
**GSHpx: Glutation peroxidasa.**

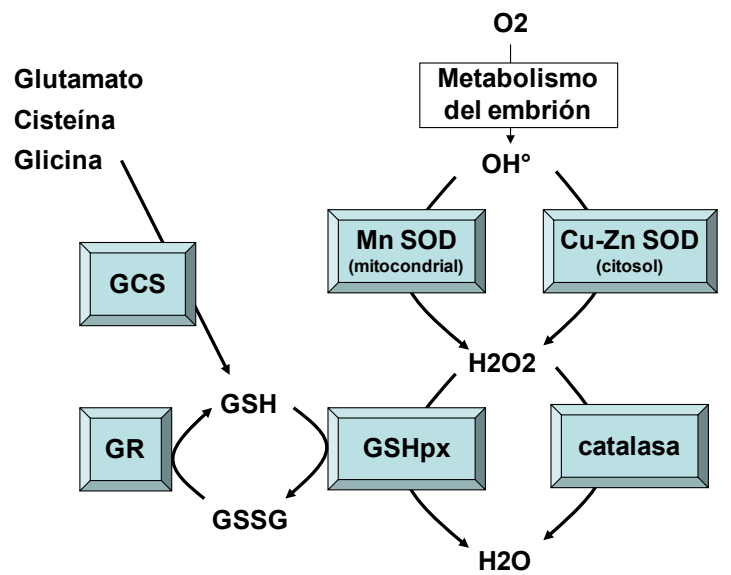
Figura 14. Representación esquemática de los antioxidantes azufrados y sus mecanismos de acción (modificado de Guérin y col., 2001).

La vitamina C posee efecto antioxidante por acción directa del ascorbato, recicla vitamina E y glutati3n, y adem3s induce la liberaci3n de taurina e hipotaurina desde el epitelio oviductal (Chan, 1993; Gu3rin y col., 1995). Sin embargo, en presencia de iones met3licos, el ascorbato se comporta como un prooxidante, regenerando la forma reducida del metal que reingresa en la reacci3n de Fenton.

La vitamina E actúa como antioxidante por acci3n directa incorpor3ndose a membranas biol3gicas y indirecta inhibiendo el sistema de NADPH oxidasa (Aurousseau y

col., 2006). La suplementación del medio de CIV con vitamina E (100 µM) mejoró en un 63% el desarrollo embrionario (Olson y Seidel, 2000).

El piruvato, producto terminal de la glucólisis aerobia, o incluso en conjunto con el lactato que proviene de la vía anaerobia, posee capacidad antioxidante, actuando como un neutralizante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Guérin y col., 2001). Posiblemente por esta razón sólo el 30 % del ATP consumido por el embrión proviene de la fosforilación oxidativa, generadora de O<sub>2</sub><sup>°</sup>, mientras que el resto se obtiene por la vía glucolítica, generadora de poder reductor (Trimarchi y col., 2000).



**GSHpx:** Glutatión peroxidasa.      **GR:** Glutatión reductasa.  
**GSSG:** Glutatión oxidado.      **GSH:** Glutatión reducido.  
**GCS:** Glutamil cisteína sintetasa      **SOD:** Superóxido dismutasa.

Figura 15. Representación esquemática de los antioxidantes enzimáticos y sus mecanismos de acción (modificado de Guérin y col., 2001).

Los mecanismos antioxidantes enzimáticos incluyen las enzimas superóxido dismutasas (SOD), que transforman el  $O_2^\bullet$  en  $H_2O_2$ , y luego el  $H_2O_2$  es neutralizado por catalasas y GSHpx (Gupta y Bhandari, 2011). Existen dos variedades de SOD, una dependiente de manganeso (Mn SOD) y otra dependiente de Cu y zinc (Cu-Zn SOD). Para lograr mayor efectividad, Mn SOD actúa directamente dentro de la mitocondria, mientras la Cu-Zn SOD lo hace a nivel citosólico. Del mismo modo, las catalasas actúan dentro de los peroxisomas y la GSHpx a nivel mitocondrial y citosólico, contando además esta última con un doble sistema de regeneración: vía glutatión reductasa (GR) y vía glutamil cisteína sintetasa (GCS) (Figura 15). La GSHpx es una metaloenzima dependiente de selenio, lo cual explica porqué la adición de selenito de sodio mejora el desarrollo folicular y embrionario en ratones, mejorando la capacidad antioxidante de los medios (Abdelahi y col., 2010).

### **2-b. Los procesos oxidativos como mecanismo fisiológicos**

El equilibrio entre la generación y la neutralización de ROS no es necesaria sólo para evitar el daño oxidativo, ya que estos compuestos son utilizados como mecanismos de señalización celular (Ray y col., 2012), y están involucrados en procesos fisiológicos esenciales, ajenos o propios de la función reproductiva, como el desarrollo folicular, la luteólisis y la ovulación entre otros (Tessaro y col., 2011; Skarzynski y col., 2005).

Entre las especies reactivas con importancia fisiológica se encuentra el óxido nítrico (ON). El ON se genera a partir de 3 tipos de sintetasa (NOS): endotelial, neuronal e inducible, y posee un electrón desapareado que puede generar daño oxidativo (Agarwall y col., 2005). Su capacidad de daño parece estar establecida por el equilibrio con la

concentración de  $O_2^\circ$ , con quien interactúa y forma peroxinitritos ( $ONOO^\circ$ ), los cuales causan peroxidación de lípidos de membrana, daño del ADN y apoptosis celular (Al-Gubory y col., 2010). Sin embargo, el ON cumple roles fisiológicos destacables, siendo esencial como mecanismo de señalización celular, como un poderoso vasodilatador y como un inhibidor de la agregación plaquetaria (Bagi y col., 2004). A nivel reproductivo colabora en la motilidad normal del oviducto bovino, facilitando la fertilización (Rosselli y col., 1996); y su carencia se asocia fallas en el desarrollo embrionario y fetal (Tiboni y col., 2003). La NOS endotelial se expresa en las células tecales, de la granulosa y del ovocito durante la maduración folicular y resulta esencial para el desarrollo folicular (Agarwall y col., 2005; Tessaro y col., 2011).

Una carencia de ON puede ser secundaria a un exceso de  $O_2^\circ$ , el cual reacciona con el ON formando peroninitritos reactivos ( $ON + O_2^\circ \rightarrow ONOO^\circ$ ). Una causa del exceso de  $O_2^\circ$  es la falta de actividad de SOD, dependiente de Cu. En el mismo sentido, la carencia de Cu se asocia con una disminución de la actividad SOD1 (Church y col., 1988). En embriones deficientes en Cu aumentan los niveles de ROS generando daño oxidativo y aumento de defectos en el desarrollo (Hawk y col., 2003). Otras consecuencias de la carencia de Cu incluyen el aumento de la peroxidación lipídica (Radi y col., 1991), rupturas de las cadenas de ADN que conducen a la apoptosis celular (Zhuang y Simon, 2000), menor actividad SOD y concomitantes aumentos en las concentraciones de  $O_2^\circ$  y  $ONOO^\circ$  que causan nitrificación de proteínas y alteraciones en el funcionamiento de proteínas vitales (Gow y col., 2004). Considerando que la carencia de Cu afecta a otras metaloenzimas como la Ceruloplasmina, encargada de secuestrar Fe e impedir la reacción de Fenton, y como la Citocromo C oxidasa, encargada de completar la fosforilación oxidativa formando agua, la deficiencia de Cu es



posiblemente la más asociada a daño oxidativo (Underwood y Suttle, 1999). Las carencias de los demás minerales asociados a metaloenzimas determinan consecuencias similares (George y col., 2008; Picco y col., 2010).

Numerosos procesos mediados por ROS son necesarios para que una gestación llegue a término en todas las especies (Al-Gubory y col., 2010). Algunas específicas de rumiantes incluyen el aumento de la actividad catalasa, GSHpx y glutathion transferasa en el oviducto controlando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la fertilización (Lapointe y Bilodeau, 2003); la mayor actividad SOD, GSHpx en cuerpo lúteo para evitar la apoptosis (Al-Gubory y col., 2004) y la mayor actividad GSHpx y glutathion reductasa en placentomas para posibilitar un adecuado desarrollo placentario (Garrel y col., 2010).

Por lo expuesto, las reacciones oxidativas generadas por especies reactivas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup>) o de nitrógeno (ON) poseen efectos fisiológicos importantes, pero en exceso causan daño oxidativo. Metales como Cu e Fe están involucrados tanto en la generación de especies reactivas como en su neutralización, mientras que otros minerales como Zn, Se y Mn están involucrados en la defensa antioxidante formando metaloenzimas. Nuevamente el equilibrio oxidativo es responsable de mantener el estado fisiológico de gametas y embriones, o bien de que prevalezca un estado de estrés y daño oxidativo.

### 3) Metabolismo y deficiencia de cobre en bovinos

#### 3-a) Metabolismo del cobre

##### Absorción

El conocimiento del metabolismo del cobre avanzó mucho en los últimos años gracias a los trabajos de investigación impulsados por enfermedades como la de Wilson y Menkes en humanos (Laloti y col., 2009). Por esta razón se conocen nuevos detalles, pero puestos de manifiesto sobre todo en animales de experimentación.

La absorción del cobre dietario ocurre especialmente en el intestino delgado (Hill y Link, 2009). En el ribete en cepillo de los enterocitos se ha identificado un transportador de Cu llamado CTR1 (Lönnerdal, 2008), cuya expresión aumenta en estados de carencia (Nose y col., 2010). El CTR1 es una proteína integral, con tres dominios transmembrana, que incorpora al Cu en estado cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) (Van den Verge and Klomp, 2009). Debido a que la mayor parte del cobre llega al intestino en su forma cúprica ( $\text{Cu}^{+2}$ ), debe ser reducido. Este rol lo cumplen el ácido ascórbico y también metaloreductasas como la "Steap 2" y "Dcytb", que actúan además como reductasas del hierro, pasando el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  (Lönnerdal, 2008). Ambos elementos en estado reducido pueden ingresar también por un transportador de cationes bivalentes 1 (DMT1) (Arredondo and Nuñez, 2005). El uso de un mismo transportador explica el efecto de interferencia de altas concentraciones de Fe sobre la absorción del Cu, siendo el Fe uno de los responsables de la deficiencia de Cu en bovinos (Underwood y Suttle, 1999). Recientemente se ha sugerido que el Cu podría ingresar al

enterocito por pinocitosis, especialmente durante la maduración del aparato digestivo (Lutsenko y col., 2007-a).

Se considera que la absorción intestinal de Cu es variable entre especies pero en todas ellas estaría regulada por el estatus de Cu del animal. En humanos tratados con  $^{65}\text{Cu}$ , el porcentaje de Cu dietario absorbido fue del 12 % cuando la dieta era rica de Cu (7,5 mg/d), pero aumentaba al 36 % cuando la dieta era sólo adecuada en Cu (1,68 mg/d) y finalmente ascendía al 56 % cuando la dieta era deficiente (0,78 mg/d) (Turnlund y col., 2005).

En rumiantes no se han realizado estudios profundos sobre los mecanismos íntimos de absorción, pero se sabe que el porcentaje de absorción es menor que en no rumiantes, promediando el 5,4% (Underwood y Suttle, 1999). El factor responsable de esta disminución es indudablemente el metabolismo ruminal, ya que el porcentaje de absorción es del 75 al 80% en lactante y desciende a menos del 10% con el desarrollo de la actividad ruminal (Spears, 2003). Este valor varía además en función de la fuente de cobre (Balemi y col., 2010; Pal y col., 2010), la raza (Mullis y col., 2003; Miranda y col., 2010) y la presencia de factores de interferencia como molibdeno (Hansel y col., 2008), azufre (Spears, 2003), e hierro (Ward y col., 1997).

Una vez absorbido, el Cu se une a proteínas citoplasmáticas, especialmente a la metalotioneína que lo almacena (Tapiero y Tew, 2003), o bien a chaperonas que lo conducen hacia diferentes vías metabólicas (Figura 16). Una chaperona, denominada Cox17, transporta y cede el Cu para que sea añadido a la citocromo C oxidasa mitocondrial. Otra de ellas,

llamada CCS (“copper chaperone for Cu, Zn - superoxidedismutase”) entrega el Cu para ser incorporado a la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1). Finalmente la Atox1 se encarga de transportar el Cu dentro de la célula, facilitando su incorporación a un sistema de vesículas aisladas y al trans-Golgi network (TGN). A diferencia del ingreso por CTR1, estos mecanismos de transporte a sistemas membranosos son dependientes de energía, liberada por ATPasas, de las cuales las ATP7A y ATP7B son las más importantes (Turski y Thiele, 2008).

La ATP7A introduce el Cu al TGN, el cual se encarga de sacarlo de la célula. Esta ATPasa es especialmente importante en el enterocito, para que el Cu sea liberado al sistema porta (Prohaska, 2008). Cuando la ATP7A no funciona el Cu queda retenido en el enterocito, hasta que este se descama y se pierde. Se genera de este modo una grave carencia de Cu que en humanos se conoce como “Enfermedad de Menkes” (Hill y Link, 2009). La ATP7B es similar a la anterior, pero se encuentra especialmente en hígado, cerebro y placenta, donde se encarga de facilitar la salida del Cu de la célula (Barry y col., 2010).

El Cu abandona la membrana basolateral del enterocito por mecanismos aún no bien definidos, pero posiblemente se realice empleando las vesículas del TNG o bien los mismos transportadores hallados en el borde luminal de la célula (Harris, 2000; Lønnerdal, 2008). El Cu pasa a la circulación portal, llegando al hígado unido especialmente a albúmina, y secundariamente a transferrina, aminoácidos y proteínas específicas como la transcupreína (Løvstad , 2004; Liu y col., 2007).

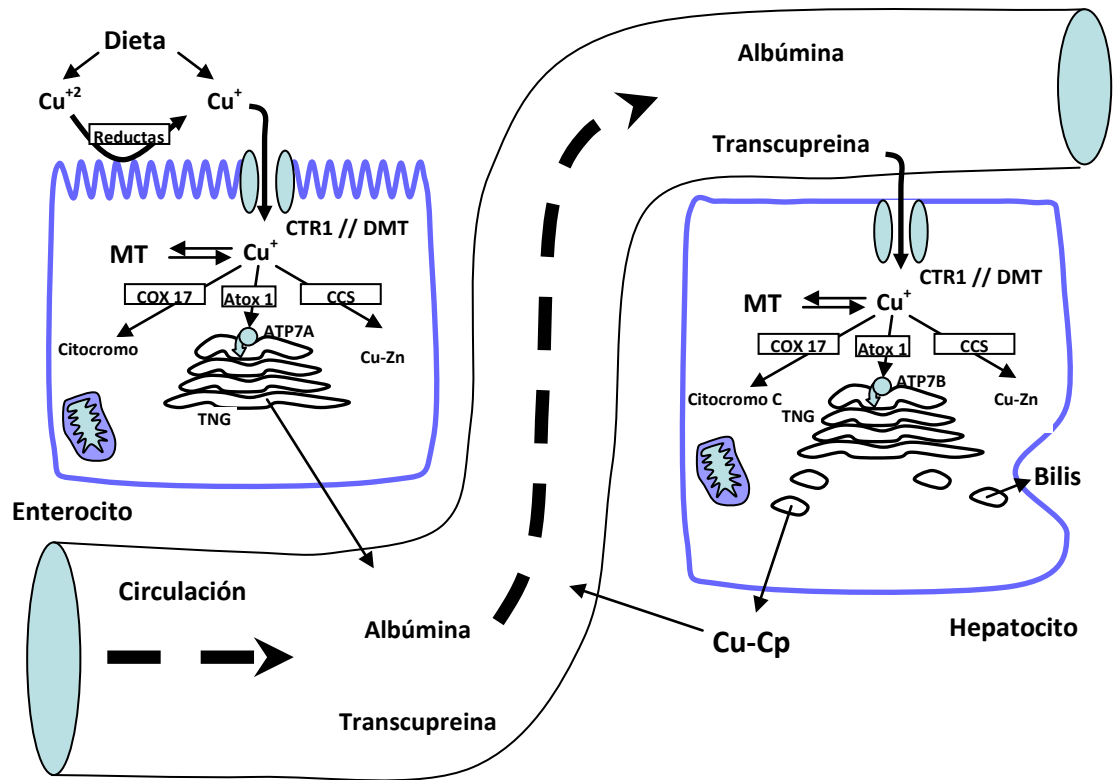


Figura 16. Metabolismo celular del cobre en el enterocito y el hepatocito MT: metalotioneína; TNG: Trans Network Golgy; COX 17, Atox 1 y CCS: Chaperonas de Cu; CP: ceruloplasmina; CTR1 y DMT: transportadores de membrana; ATP7A y ATP 7B: ATPasas de transporte activo de Cu al TNG (Fazzio y col, 2014).

### **Metabolismo hepático del Cu**

El hígado capta el Cu que llega por circulación portal y lo distribuye entre las chaperonas ya mencionadas para el enterocito. Adicionalmente el hepatocito decide enviarlo a la circulación sistémica, incorporándolo a la ceruloplasmina (Cp), puede enviar el Cu excedente a bilis para su eliminación, o bien puede depositarlo, convirtiéndose entonces el hígado en el único depósito orgánico del metal (Underwood y Suttle, 1999; Roberts y col., 2008). Estos movimientos de Cu en el hepatocito se realizan en forma activa por la ATP7B. Esta ATPasa incorpora el Cu a la Cp, una ferroxidasa que sale a circulación y representa la principal fracción plasmática de Cu (Healy y Tipton, 2007). Por otro lado la ATP7B también se activa cuando hay un exceso de Cu en el hepatocito y genera la incorporación del mismo al sistema de vesículas que lo eliminan por vía biliar (Lutsenko y col., 2007 b). Una falla en su funcionamiento causa graves acumulaciones tóxicas de Cu, especialmente en hígado y cerebro. Esta situación se presenta en humanos con la denominada “Enfermedad de Wilson” (Weiss y col., 2008). Finalmente la ATP7B genera el depósito hepático de Cu por unión del metal a la MT (Lalioi y col., 2009).

Un bovino con adecuado estatus de Cu posee una reserva hepática superior a las 100 ppm (MS), pero su concentración seguirá aumentando mientras se encuentre en balance positivo (Balemi y col., 2010). Esto establece un rango de normalidad entre 100 y 300 ppm (McDowell, 1992), por encima del cual se corre el riesgo de acumulaciones que pueden derivar en intoxicación crónica con Cu, especialmente cuando se alcanzan las 1000 ppm (MS) (Minervino y col., 2008). El organismo evita esta posibilidad aumentando las pérdidas por

bilis (Jenkins and Hidioglou, 1989), y bajando la expresión de las enzimas encargadas del metabolismo hepático del Cu (Han y col., 2009).

### **Circulación post-hepática**

La concentración plasmática normal de Cu o cupremia es a partir de los 60  $\mu\text{g/dl}$  (Laven y Livesey, 2006). La mayor fracción, aproximadamente un 80 %, está unido a Cp (Underwood y Suttle, 1999), el resto viaja unido a albúmina y a una globulina llamada transcupreína, mientras que cantidades menores lo hacen en otras moléculas más pequeñas (Harris, 2000).

Hasta hace poco tiempo, se pensó que la Cp era la forma de distribución del Cu hepático hacia los tejidos (Underwood y Suttle, 1999). Actualmente se sabe que una aceruloplasminemia no altera el metabolismo del Cu, pero si el del Fe, que no puede ser movilizado generando anemias ferroprivas (Meyer y col., 2001; Cater and Mercer, 2005). Esto se debe a que la Cp posee acción ferroxidasa, que permite la salida del  $\text{Fe}^{+2}$  del hígado y su incorporación a la transferrina como  $\text{Fe}^{+3}$  (Harris, 2000). Por otro lado la acción oxidasa de la Cp evita la acumulación de  $\text{Fe}^{+2}$  y de  $\text{Cu}^{+1}$ , los cuales pueden catalizar la reacción de Fenton generando daño oxidativo, por lo cual se le otorga a la Cp un importante rol antioxidante (Arredondo y Nuñez, 2005; Healy y Tipton, 2007). También se postuló a la albúmina como la transportadora de Cu, la cual posee incluso un sitio específico de unión para al mismo (Løvstad, 2004), pero estudios en ratas indican que su función no sería esencial en el transporte plasmático de Cu (Cater and Mercer, 2005). Otras moléculas, como

factores de coagulación y proteínas de bajo peso molecular, podrían ser de importancia en esta distribución (Cater and Mercer, 2005).

### **Vías de eliminación del Cu**

La principal vía de eliminación es la bilis (Cousin, 1985). Cantidades menores pueden perderse por orina (Buckley, 1991), así como por leche, lo cual hace que la lactancia no represente un período de altos requerimientos (NRC, 2001).

### **Rol fisiológico del Cu en el organismo**

El Cu posee cierta importancia como componente estructural, pero fundamentalmente es usado por el organismo como cofactor enzimático de metaloenzimas (Turski y Thiele, 2008). Un listado de las mismas y de su función se presenta en la Tabla 2.

### **3-b) Carencia de Cobre**

#### **Patogenia de la carencia de Cu**

La patogenia de la deficiencia de Cu implica una secuencia de etapas sucesivas que comienzan con la pérdida de la reserva hepática (depleción), la disminución de la cupremia (deficiencia), y la menor actividad de cuproenzimas (disfunción), que lleva finalmente a la manifestación de consecuencias (enfermedad), primero subclínicas y luego evidentes o clínicas (Figura 17).



Tabla 2. Metaloenzimas Cu-dependientes y su rol fisiológico\*\*

Cuproenzimas	Función
Aminooxidasas (monoamino oxidasa, tiramino oxidasa e histamino oxidasa)	Desaminación de aminas primarias.
Ceruloplasmina	Oxidación del hierro, transporte del cobre, antioxidante.
Cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD)	Detoxificación de radicales libres.
Citocromo c oxidasa	Transporte de electrones.
Diamino oxidasa	Desaminación oxidativa de aminas.
Dopamina $\beta$ -hidroxilasa	Producción de catecolaminas.
SOD Extracelular	Detoxificación de radicales libres.
Ferroxidasa II	Oxidación del hierro.
Hephaestin	Cobre oxidasa, exportación del hierro desde intestino.
Lisil oxidasa	Formación de puentes cruzados de colágeno y elastina.
Peptidilglicine $\alpha$ -amida monooxigenasa	$\alpha$ -amidación de péptidos.
Thiol oxidasa	Formación de puentes disulfuro.
Tirosinasa	Producción de melanina.
ATP7A (proteína de la enfermedad de Menkes)	Transportador de cobre.
ATP7B ((proteína de la enfermedad de Wilson)	Transportador de cobre.
Cox17	Chaperona de cobre para citocromo c oxidasa.
CCS	Chaperona de cobre para superóxido dismutasa.
ATOX-1 (HAH1)	Homeostasis del cobre y defensa antioxidante.

\*\*Bonham y col., 2002.

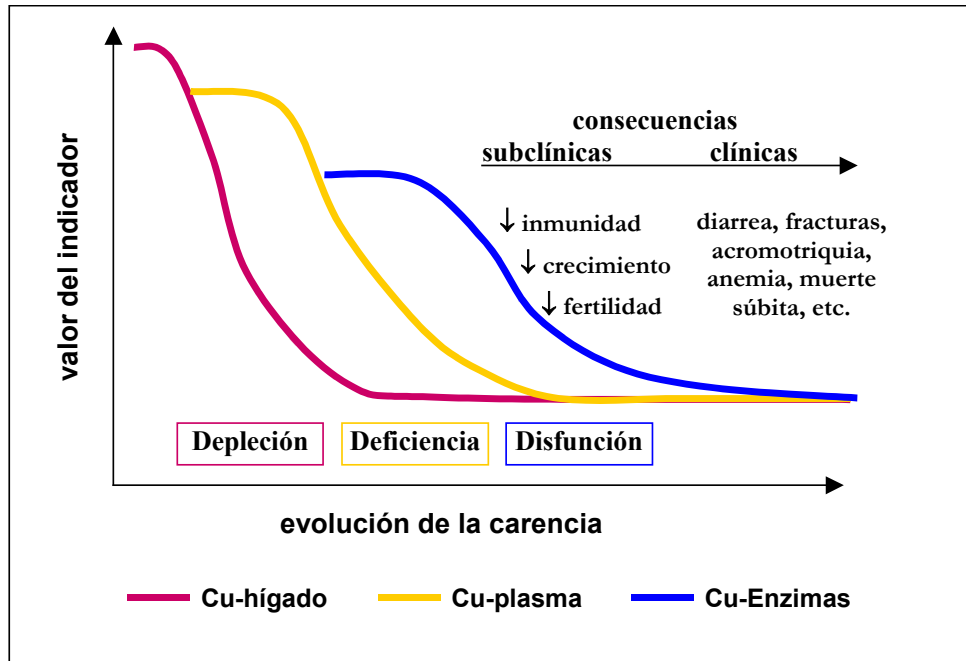


Figura 17. Etapas sucesivas de la deficiencia de Cu en el animal. Modificada de Underwood y Suttle.

### Consecuencias de la carencia de Cu

Las consecuencias clínicas se inician con alteraciones del color del manto (acromotriquia) y anteojeras, y avanzan con diarreas, deformaciones osteoarticulares, fracturas espontáneas, caquexia y muerte (Figura 18 y 19). Desde el punto de vista productivo son más graves las consecuencias inaparentes y persistentes, que se sostienen ante la falta de diagnóstico y prevención. Estas incluyen la menor ganancia de peso, la menor resistencia a infecciones y la menor eficiencia reproductiva (Underwood y Suttle, 1999).



Figura 18. Acromotriquia generalizada de un ternero cruza Aberdeen Angus-Hereford con hipocuprosis



Figura 19. Anteojera en un ternero *Aberdeen Angus* con hipocuprosis

Las menores ganancias de peso ya han sido caracterizadas en varias zonas de Argentina, como el este de Chaco y Formosa (Balbuena y col., 1989-a y -b), Entre Ríos (Ricciardino y col., 1991-a y -b), Santa Fe (Correa Luna y Lagos, 1985), Cuenca del Salado (Fazzio, 2006), etc. En sistemas de cría, los terneros dejan de ganar entre 3 y 10 kilos mensuales cuando sufren hipocupremias severas (Fazzio y col., 2010).

Las consecuencias inmunológicas poseen muchas más evidencias in vitro que certezas sobre rodeos en sistemas productivos (Minatel y Carfagnini, 2000; Bohman y col., 2002). De cualquier modo se ha asociado la hipocuprosis con una menor respuesta inmune innata (Cerone y col., 1998; White y col., 2009), menor producción de citocinas (Torre y col., 1995; Gengelbach y col., 1997) y fallas en la respuesta adaptativa humoral (Cerone y col., 1995) y celular (Ward y col., 1997).

Los primeros estudios que relacionaron a las alteraciones reproductivas con la deficiencia de Cu se basaron en ensayos de tipo “dosis-respuesta”, en los cuales la

suplementación con Cu mejoró los parámetros reproductivos (Soltan y Jenkins, 1983; Kappel y col., 1984; Maas, 1987; Ingraham y col., 1987; Hilario y col., 1991). Estos trabajos no permitieron establecer el origen de dichas alteraciones. En el año 1987 Phillip y colaboradores llegaron a la conclusión de que las alteraciones reproductivas derivadas de la deficiencia de Cu dependían de un exceso de Mo en la dieta (deficiencia secundaria). La presencia de Mo, más que el bajo nivel de Cu sería el responsable de la menor fertilidad, causando demoras en la aparición de la pubertad, menores tasas de concepción y alteraciones del ciclo estral. En dicho ensayo se observó además que la suplementación con Mo producía aparentemente una menor liberación de la hormona LH. Más tarde, ratas Cu-deficientes alimentadas con dietas ricas en Mo presentaban reducciones en los picos de la FSH y en la secreción de estrógenos (Igarza y col., 1996), coincidiendo sólo parcialmente con Phillip y col (1987). En cultivos *in vitro* de células tecales la adición de tiomolibdatos al medio inhibe la diferenciación celular mediada por LH, disminuyendo su producción de androstenediona, situación que se revierte suplementando el medio con Cu (Kendall y col., 2006). Estos estudios conforman la base de la asociación original entre la hipocuprosis y las fallas reproductivas (McDowell, 1992; Underwood y Suttle, 1999). Rodeos lecheros de Inglaterra exhiben una subfertilidad generalizada, con disminución o ausencia de celos, y que revierte con la suplementación con Cu (Kendall y col., 2003). Estos autores sugieren que estos cuadros son debidos a fallas en el desarrollo de las células de la granulosa estimuladas por FSH y disminución en los niveles de estrógeno producidos (Kendall y col., 2003). Actualmente existen nuevas evidencias que relacionan a un inadecuado aporte de Cu con numerosas alteraciones de la reproducción, siendo un factor común en estos casos la

existencia de estrés oxidativo, alteraciones estructurales y fallas energéticas (Keen y col., 1998).

### **Diagnóstico de la carencia de Cu**

La evaluación de la patogenia de la hipocuprosis (Figura 23) establece las alternativas de diagnóstico de esta carencia.

La concentración hepática de Cu es el primer parámetro afectado (etapa de depleción), estableciendo además el nivel de reserva orgánica del animal. Su concentración guarda una relación lineal con la absorción intestinal cuando la dieta cubre los requerimientos, por lo cual es un excelente indicador de depósito (Underwood y Suttle, 1999). Lamentablemente, cuando el animal se expone a un balance negativo de Cu que implica la movilización de su reserva hepática, esta se reduce de manera exponencial, perdiendo sensibilidad como indicador de deficiencia (Suttle, 1986). Por otro lado, la obtención de la muestra se realiza por biopsia hepática, que si bien es una herramienta útil y necesaria en trabajos experimentales, su uso es limitado en el diagnóstico poblacional de rutina.

El análisis de cupremia es un indicador sensible de la etapa de deficiencia, con muestreo poco costoso y mínimamente invasivo, y si bien no es un indicador directo de daño, ya que no evidencia un daño tisular, la cupremia se profundiza durante el desbalance y puede entonces emplearse su valor predictivo. Para ello resulta útil subdividir los valores de cupremia en tres rangos: por encima de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (normocupremia), entre 60 y 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (hipocupremia leve) y aquellos menores de 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$  (hipocupremia severa) (Tabla 3). La

normocupremia sugiere que los animales no se hallan expuestos al desbalance. La hipocupremia leve, en cambio, es indicativa de que la reserva hepática de Cu ya no es capaz de mantener el nivel plasmático normal, pero posiblemente no se vean afectadas las enzimas Cu dependientes a nivel tisular, debido a que los animales no suelen mostrar signos clínicos importantes de la enfermedad ni responden a la suplementación con Cu en los ensayos dosis-respuesta (Fazzio y col., 2010). La hipocupremia severa es indicativa de un desbalance de Cu más importante, con la posibilidad de que si se mantiene lo suficiente exista ahora un compromiso enzimático, debido a que con valores inferiores a 30 µg/dl se presentan las principales consecuencias de la enfermedad (Suttle, 1983). Cuando existe molibdenosis las cupremias pueden ser engañosamente elevadas, por formación complejos de Cu y Mo no disponibles, pero estos pueden descartarse tratando el plasma con ácido tricloroacético antes de su lectura por espectrofotometría de absorción atómica (Underwood y Suttle, 1999). Otra alternativa es la medición de la actividad de Cp sérica, que representa del 70 al 90 % de Cu plasmático (Kincaid, 1999). Debido a que el muestreo de sangre es rápido y sencillo es de elección en diagnósticos de rutina y estudios poblacionales (Ramírez y col., 1997).

La menor actividad de las enzimas Cu dependientes es un indicador directo de la etapa de disfunción, que llevarán a las manifestaciones de la hipocuprosis (Underwood y Suttle, 1999). Sin embargo, existen varios inconvenientes para utilizarlas con fines diagnósticos. Por un lado, la etiología de los signos clínicos es muchas veces compleja y no permite asociar una consecuencia de la carencia con una falla enzimática específica. Como ejemplo, resulta evidente que la acromotriquia se debe a una disfunción de la tirosinasa

(Bohman, 2002-Tabla 2), pero una menor ganancia de peso resulta difícil de asociar a una enzima o actividad Cu-dependiente. Por otra parte hay enzimas sobreexpresadas para su función, y su menor actividad no implica un daño bioquímico (Mills, 1983). Finalmente, medir la actividad de ciertas enzimas requiere de muestreos altamente invasivos y de técnicas poco sencillas, lo cual suele impedir su utilización con fines diagnósticos de rutina (Suttle, 1986; Underwood y Suttle, 1999).

Tabla 3. División de cupremias en rangos y su asociación con el estatus del animal y sus posibles consecuencias.

Rangos de Cupremia	Estatus de Cu en el animal	Consecuencias
<b>Normo-cupremia</b> ( $> 60 \mu\text{g/dl}$ )	Reserva hepática normal, con capacidad para cubrir etapas de carencia	<b>Nulas.</b> El animal cubre sus requerimientos de Cu y todas las actividades dependientes del mismo son cubiertas sin problemas.
<b>Hipocupremia moderada</b> ( $30 - 60 \mu\text{g/dl}$ )	Reserva hepática recientemente agotada, y no puede sostener la cupremia	<b>Poco probables.</b> El bajo aporte de Cu a los tejidos recién se inicia y se sostienen las principales funciones Cu-dependientes
<b>Hipocupremia severa</b> ( $< 30 \mu\text{g/dl}$ )	Reserva hepática totalmente agotada con fallas progresivas de cuproenzimas	<b>Muy probables.</b> La fallas de las cuproenzimas llevan a consecuencias inaparentes y luego clínicas de la enfermedad

#### **4) Importancia del Cu sobre la fisiología reproductiva y sus consecuencias en estados de carencia**

El carácter esencial del Cu para el desarrollo embrionario es evidente en ratones transgénicos, en los cuales la falta de transportadores de Cu, como CTR1, COX17 y Atox1, genera la muerte embrionaria en mitad de gestación o en el período posnatal temprano (Lee y col., 2001; Takahashi y col., 2002).

Estudios realizados en ratas y ratones demuestran que el déficit de Cu ocasiona muerte embrionaria temprana y un grosero aumento de anomalías embrionarias estructurales (Yang y col., 2007), disminución de la tasa de fertilización y de recuperación de óvulos, bajo índice de formación de blastocistos e incapacidad de estos para romper la zona pelúcida (Menino y col., 1998), aumento de la incidencia de alteraciones cardíacas y cerebrales post implantación (Hawk y col., 1998), así como daño oxidativo del ADN, lípidos y proteínas (Hawk y col., 2003; Keen y col., 1998).

Estas alteraciones podrían deberse a diferentes mecanismos, incluyendo la menor actividad de cuproenzimas (Tabla 2), aumento del estrés oxidativo, disminución del óxido nítrico disponible, alteraciones del metabolismo del hierro, anomalías en los puentes cruzados de las proteínas de la matriz extracelular, disminución de la angiogénesis, señalización celular alterada y fallas energéticas entre otras (Keen y col., 1998; Uriu-Adams y col., 2010).



La vinculación entre el estrés oxidativo y el Cu resulta de la participación de este elemento en enzimas con función antioxidante como Cu-Zn SOD, Ceruloplasmina (Cp) y citocromo c oxidasa (CCO) (Kleczkowski y col., 2004; Uriu-Adams y Keen, 2005). Embriones de rata desarrollados en medios carentes de Cu presentaron menor actividad de la CCO y de la Cu-Zn SOD, con el consiguiente aumento del daño oxidativo (Hawk y col., 1998). Trabajos posteriores demostraron en embriones Cu deficientes mayor concentración del ión superóxido, indicativo de la disfunción de la CCO, con una menor inactivación del mismo al fallar la Cu-Zn SOD encargada de dismutarlo (Hawk y col., 2003).

El ión superóxido acumulado reacciona con el óxido nítrico (ON) y baja su concentración, alterando la señalización celular. Embriones de ratas deficientes en Cu mostraron aumentos del ión superóxido y disminución del ON asociado a alteraciones teratogénicas, que disminuían al agregar un donante de ON (Yang y col., 2007). Daño oxidativo y alteraciones del ON se asocian además con lesiones teratogénicas del tubo neural (Beckers Trapp y col., 2006).

El Cu y el Fe no sólo comparten funciones y atributos, poseen además sus metabolismos relacionados. Ambos actúan fundamentalmente como cofactores enzimáticos y ambos poseen la capacidad de intercambiar electrones cambiando de valencia en reacciones de óxido-reducción, razón por la cual deben ser estrictamente controlados para que no generen o amplifiquen reacciones oxidativas (Arredondo y Nuñez, 2005). Por otro lado sus metabolismos se relacionan, de modo que la carencia de uno afecta al otro. Así, animales con hipocuprosis, poseen menor actividad de dos ferroxidasas como la hephaestina y la Cp. La primera es la enzima encargada de permitir la salida del Fe desde el

enterocito hacia la circulación portal (Petrak y Vyoral, 2005). La Cp cumple la misma función, pero facilitando la salida del Fe especialmente desde el hígado y también desde otros tejidos (Healy y Tipton, 2007). Por lo expuesto es que la carencia de Cu genera finalmente signos de carencia de Fe, como la anemia, pero con acumulación de Fe en órganos como la mucosa intestinal o el hígado (Reeves y DeMars, 2004). La acumulación de Fe en tejidos, secundaria a la carencia de Cu, deja Fe libre y disponible para generar daño oxidativo (Gambling y col., 2008).

Fallas en la metaloenzima lisil oxidasa explicarían alteraciones teratogénicas asociadas a la mala formación de los puentes cruzados del tejido conectivo (Tchaparian y col., 2000), aunque posiblemente también se altere el aporte de Cu a los tejidos, que podría depender en parte de esta misma enzima (Rucker y col., 1998).

El Cu promueve la angiogénesis, estimulando la proliferación y diferenciación de células endoteliales y promoviendo la formación de microtúbulos (Kang, 2011). En embriones de ratón, la carencia de Cu redujo la angiogénesis del saco vitelino (Yang y col., 2006). La menor angiogénesis secundaria a la deficiencia de Cu coincide con la menor actividad de la Cu-Zn SOD1 (Lowndes y col., 2009) y su asociación es tan clara que quelantes del Cu, como el tetratiomolibdato, está siendo usado para la terapia anticancerosa para inhibir la angiogénesis en los tejidos tumorales (Brewer, 2005).

La disfunción de la CCO durante la deficiencia de Cu genera fallas en la síntesis de ATP y altera el metabolismo energético celular (Medeiros y Jennings, 2002; Stiburek y col., 2006). Este hecho ha sido demostrado en animales de laboratorio, con consecuencias evidentes

como alteraciones mitocondriales y aumento en las concentraciones de lactato en el cerebelo de ratas Cu deficientes (Prohaska y Wells, 1975, Gybina y Prohaska, 2009). Otro hallazgo interesante en ratas fue que la deficiencia de Cu no sólo reduce la producción de energía sino que además provoca una mayor utilización de grasa en desmedro del uso de carbohidratos (Hoogeveen y col., 1994).

Lamentablemente, en rumiantes no existen tantos antecedentes de las consecuencias de la hipocuprosis sobre la fisiología reproductiva, quedando pendiente la necesidad de conocer cuando, porqué y en qué grado se afecta la productividad. Una consecuencia clínica llamativa de la carencia de Cu durante la gestación es el Swayback, una enfermedad neurodegenerativa que afecta especialmente al ovino (Gambling and McArdle, 2004). Corderos que llegan a nacer con esta entidad presentaron disfunción de la CCO, asociada a fallas estructurales y baja producción de ATP (Alleyne y col., 1998). En bovinos adultos estas mismas fallas se han informado asociadas a alteraciones mitocondriales en tejidos como corazón e intestino, atribuibles la disfunción de la CCO (Leigh, 1975, Fell y col., 1975). Estudios que profundicen las consecuencias de la carencia de Cu sobre la fisiología de la reproducción serían necesarios para comprender y cuantificar los riesgos sanitarios, productivos y reproductivos de esta deficiencia mineral tan extendida.

## 5) Técnica de producción de embriones bovinos *in vitro*

La producción *in vitro* de embriones involucra tres etapas fundamentales: 1) Maduración *in vitro*, 2) Fecundación *in vitro* y 3) cultivo *in vitro* de embriones (CIV). Para la MIV de ovocitos bovinos se utilizó el medio de cultivo TCM-199 suplementado con LH, FSH y suero fetal bovino (SFB). Para la FIV se empleó el TALP (Parrish y col. 1984) y para el CIV el medio SOFm (*Synthetic Oviduct Fluid* modificado) (Tervit y col. 1972; Gardner y col., 1994).

### Reactivos

Todos los reactivos fueron provistos por Sigma Chemical Company (St. Louis, EE.UU.), a menos que se indique lo contrario. Todos los medios y soluciones (7.1) se prepararon con agua Tipo I (Sigma) y fueron almacenados a 4°C en oscuridad. La técnica de PIV se utilizó como modelo experimental para el desarrollo del presente trabajo de tesis. Las técnicas específicas se describen en el capítulo correspondiente.

### 5-a) Maduración *in vitro*

Los ovarios de frigorífico extraídos de hembras jóvenes, se colocaron en solución fisiológica a 37-39°C y se mantuvieron en termos hasta llegar al laboratorio. Luego se lavaron tres veces en solución fisiológica con antibióticos. De cada ovario se aspiraron los folículos de 2-8 mm usando una aguja de 18 G conectada a un tubo estéril y a una línea de vacío (50 mm Hg). Los complejos ovocito-cúmulus se recolectaron a menor aumento (20X) con un microscopio estereoscópico y platina térmica a 39° C y, se colocaron en medio HEPES-199 + 10% SFB (Medio de mantenimiento) hasta el momento de la selección por calidad. Para la

MIV, se eligieron los COC cuyos ovocitos presentaron el citoplasma homogéneo y las células del cúmulus compactas. Los COC se lavaron dos veces en medio de MIV, se tomaron grupos de 10 COC en 10  $\mu$ l de medio, se sembraron en gotas de 40  $\mu$ l de medio bajo aceite mineral y se incubaron a 39°C en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación.

#### *Preparación de cajas para MIV:*

Las cajas de Petri para MIV se preparan previamente a la recolección de los COC con gotas de 40  $\mu$ l de medio de maduración (7.1.2), cubiertas con aceite mineral. Posteriormente, las cajas de MIV se incuban durante 2 hs a 39° C en atmósfera gaseada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación para equilibrar el pH (7,2-7,4) del medio. El volumen final de las gotas de MIV es de 50  $\mu$ l: 40  $\mu$ l de medio de MIV + 10  $\mu$ l con los COC.

### **5-b) Fecundación *in vitro***

#### a) Preparación de las cajas de FIV

Luego de preparar el medio de FIV (7.1.2), se armaron las placas de Petri con gotas de 30  $\mu$ l de medio y se cubrieron con aceite mineral. Las cajas fueron incubadas para equilibrar el pH del medio (7,2-7,4) a 39° C en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación durante un tiempo mínimo de 2 hs.

#### b) Preparación de los ovocitos para la FIV.

Después de 24 hs de MIV se lavaron los COC rápidamente en HEPES-TALP sin quitarles las células del cúmulus. Luego se lavaron 2 veces en medio FIV, se tomaron entre 5 a 10 COC

en un volumen de 10  $\mu$ l de medio y se sembraron en cada gota de FIV preparada previamente. Los COC se mantuvieron en estufa a 39°C hasta el momento de la inseminación.

#### c) Procesamiento del semen

Con el objetivo de separar los espermatozoides vivos se utilizó un gradiente de Percoll. En un tubo cónico de 15 ml se colocaron 2 ml de Percoll 90% y se agregaron cuidadosamente sobre él 2ml de Percoll 45%. Tanto el Percoll 90% como el 45% se encontraban a temperatura ambiente al momento de su utilización. Luego, se descongelaron 2 pajuelas de semen, se evaluó la calidad del mismo y se sembró sobre la superficie del gradiente de Percoll. El gradiente se centrifugó a 700 g durante 15-30 minutos y se retiró cuidadosamente el pellet (espermatozoides vivos) con una pipeta Pasteur para transferirlo a otro tubo. Se agregó 250  $\mu$ l de HEPES-TALP, se homogeneizó agitando suavemente y se volvió a centrifugar a 200 g durante 5 min. Luego de descartar el sobrenadante el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de medio de FIV y se mantuvo en la incubadora. Se tomó una muestra para determinar la concentración de espermatozoides utilizando una cámara de Neubauer y microscopio óptico. Finalmente se ajustó el volumen con medio de FIV para obtener una suspensión de 10 millones de espermatozoides/ml.

#### d) Inseminación

Se agregó rápidamente 10  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides concentrada (10 millones/ml) a las gotas de FIV que ya contenían los ovocitos. Se incubó durante 24 hs a 39°C

en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub> en aire con humedad a saturación. La concentración final de espermatozoides en la gota de FIV fue de 2 millones/ml.

### **5-c) Cultivo de embriones in vitro**

Se prepararon gotas de 30 µl con medio SOFm (7.1.2) en cajas de Petri bajo aceite mineral. Las cajas de CIV se prepararon 2 horas antes de la siembra y se incubaron a 39° C en atmósfera gaseada con una mezcla de 7% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>- 88% N<sub>2</sub> y humedad a saturación. Luego de 24 horas de FIV los presuntos cigotos se separaron de las CC con pipeta de punta fina y se lavaron 2 veces en HEPES-SOF y 2 veces en SOFm. Grupos de 5-10 presuntos cigotos en 10 µl de SOFm fueron sembrados en las gotas de 30 µl previamente equilibradas, alcanzando un volumen final de 40 µl de medio en las gotas de CIV. Los embriones se cultivaron en medio SOFm sin glucosa durante las primeras 24 horas de cultivo (D1) y SOFm con 1,5 mM de glucosa desde el día 2 (D2) hasta el día 8 (D8). El medio de cultivo se renovó cada 48 hs.

Al finalizar los 8 días de cultivo se evaluó la calidad morfológica de los embriones utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon, Diaphot). Los embriones se colorearon con Hoechst 33342 que se une al ADN y permite determinar el número de células de los blastocistos al final del cultivo. Para la evaluación con Hoechst 33342 se utilizó un filtro UV2A.

#### **5-d) Coloración fluorescente para núcleos (HOESCHT 33342)**

Se preparó una solución stock diluyendo 10 mg de Hoescht 33342 en 20 ml de etanol proanálisis (500 µg/ml). Para la solución de trabajo se tomó 0,2 ml de la solución stock y se le agregó 9,8 ml de Glycerol SIGMA 65516. Los ovocitos o embriones se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente en la solución de trabajo y se montaron entre porta y cubreobjeto bajo lupa y se evaluaron con microscopio de epifluorescencia (Filtro UV A).



## 6) Objetivo de la Tesis

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el efecto del Cu, en distintas concentraciones, sobre la adquisición de la capacidad de desarrollo de los ovocitos durante el período de maduración (maduración meiótica + citoplasmática) y su impacto en el desarrollo embrionario posterior.

Los objetivos específicos para llevar a cabo el presente trabajo de tesis pueden ser resumidos en los siguientes puntos:

*Capítulo 2: Determinar la concentración de Cu en plasma, licor folicular y en el medio de maduración completo.*

*Capítulo 3: Establecer el efecto de distintas concentraciones de Cu sobre la maduración in vitro de los ovocitos bovinos.*

*Capítulo 4: Estudiar el efecto de distintas concentraciones de Cu sobre la capacidad de desarrollo posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto.*

*Capítulo 5: Determinar el rol de las células del cúmulus como puente metabólico entre el medio externo y el ovocito bovino, con diferentes niveles en el aporte de Cu durante la MIV.*

## Capítulo II

### Determinación de la Concentración de Cu en Plasma, Licor Folicular y en el medio de maduración completo

#### II-a) Introducción

Dentro del folículo ovárico el ovocito en desarrollo se encuentra embebido por el licor folicular (LF) que nutre al ovocito y a las células del cúmulus que lo rodean. El folículo es un compartimento avascular separado del estroma ovárico por la pared folicular quien forma la “barrera hemato-folicular” (Bagavandoss y col., 1983). Si bien el LF es un trasudado del suero, también se encuentra parcialmente constituido por sustancias producidas localmente que están relacionadas a la actividad metabólica de las células foliculares (Gerard y col., 2002). Esta actividad metabólica, junto a la propiedad “barrera” de la pared folicular, cambian significativamente durante la fase de crecimiento del folículo, por lo que la composición del LF varía con los diferentes tamaños foliculares (Arshad y col., 2005). A pesar de la importancia que poseen los microelementos, como el Cu, sobre la reproducción, sus concentraciones en el LF no han sido hasta el momento bien caracterizadas. El conocimiento que hoy se tiene acerca del papel que cumplen los micronutrientes sobre los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano, se basa principalmente en trabajos *in vivo* donde se han alterado las dietas maternas o se han suplementado a las madres de forma parenteral (Ashworth y Antipatis, 2001).

Estudios realizados en bovino (Picco y col., 2010; Anchordoquy, 2012) y en búfalo (Arshad y col., 2005) han demostrado que la concentración de elementos traza, folicular y plasmática, no presentan diferencias cuando se evalúa la concentración en folículos mayores y menores a 10 mm. En condiciones *in vitro*, el medio de MIV representa el medio ambiente del ovocito y de su composición depende en gran medida, su capacidad de desarrollo posterior (Abeydeera, 2002; Martinez, 2002). Muy poco se conoce acerca de cuál es la concentración apropiada de Cu en este medio, pero probablemente se corresponda a la encontrada en el licor folicular de animales adultos saludables.

Por lo tanto, el objetivo fue determinar las concentraciones de Cu en plasma, LF y en el medio de MIV completo para establecer las concentraciones de trabajo.

## **II-b) Materiales y métodos**

### **Determinación de Cu en plasma, licor folicular y medio de MIV**

Se recolectaron 40 muestras de sangre (10 ml) de la vena yugular de vaquillonas al momento de la faena en tubos con EDTA. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos, se separó el plasma y se guardó a 4°C. Los ovarios de las mismas vaquillonas se recolectaron e individualizaron para asociarlos a las muestras de sangre. Los ovarios se envolvieron en film y se transportaron al laboratorio en un recipiente térmico dentro de las 2 horas de obtenidos. El diámetro de los folículos ováricos se midió con un calibre y se clasificaron en dos grupos: a) Folículos pequeños (< 10 mm) y b) Folículos grandes (> 10 mm). El líquido folicular de cada grupo se obtuvo por aspiración con jeringas de insulina

estériles. Además, se tomaron muestras (n=6) de medio de MIV suplementado con 5 % de SFB. Las muestras de LF, plasma y medio de MIV se centrifugaron y el sobrenadante se trató con 10% (p/v) de ácido tricloroacético. La concentración de Cu se midió con un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito (GBC 902).

### **II-c) Diseño experimental**

Los valores de concentración de Cu en plasma, LF y medio de MIV se analizaron utilizando ANOVA de una vía y el test de Student-Newman-Keuls a posteriori (CSS: Statistica, module C-Stasoft, Tulsa, OK, USA). Se consideraron efectos significativos a las  $p < 0,05$  y tendencias a las  $p < 0,10$  y  $> 0,05$ .

### **II-d) Resultados**

#### Determinación de Cu en plasma, licor folicular y medio de MIV

La concentración de Cu fue de  $116 \pm 27,1$   $\mu\text{g/dl}$  en plasma;  $90 \pm 20,8$   $\mu\text{g/dl}$  Cu en LF de folículos grandes;  $82 \pm 22,1$   $\mu\text{g/dl}$  Cu en LF de folículos pequeños y  $0,05 \pm 0,01$   $\mu\text{g/dl}$  Cu en el medio de MIV. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de Cu en plasma y LF, mientras que la concentración en el medio de MIV fue significativamente menor ( $p < 0,01$ ).

### **II-e) Discusión y Conclusiones del Capítulo**

La concentración de Cu fue similar en plasma y LF de folículos mayores y menores a 10 mm. Este mismo comportamiento fue observado en las concentraciones de Zn (Picco y

col., 2010) y de Mn (Anchordoquy y col., 2014). En base a nuestros resultados y a los valores definidos por Kincaid (1999) y Underwood y Suttle (1999) se establecieron cuatro condiciones experimentales para el presente trabajo de tesis: un tratamiento Control que consistió en medio de maduración sin el agregado de Cu (concentración final del medio: 0,05 µg/dl Cu, aportado exclusivamente por el SFB); y tres tratamientos donde el medio de MIV alcanza las siguientes concentraciones finales de Cu: Cu1: 20 µg/dl; Cu2: 40 µg/dl y Cu3: 60 µg/dl. Cabe recordar que el estatus de Cu en vacas se define como deficiente, marginal y adecuado de acuerdo a si la concentración plasmática de Cu corresponde a valores  $\leq 30$  µg/dl, entre 31–60 µg/dl o  $>60$  µg/dl de Cu respectivamente (Underwood y Suttle, 1999). El grupo Control y Cu1 corresponden al estatus de “deficiencia” propuesto por Kincaid (1999), mientras que la concentración de Cu2 se considera como “deficiencia marginal” y el estatus “adecuado” se ve representado por el grupo Cu3.

El estatus de Cu en el plasma de las hembras podría ser una herramienta predictiva del estatus de Cu del entorno folicular *in vivo*.

## Capítulo III

### Efecto de distintas concentraciones de Cu sobre la maduración de los ovocitos bovinos

#### III-a) Introducción

El glutatión (GSH) es el principal compuesto sulfatado no proteico, que protege a las células de mamífero del daño oxidativo, ya que juega un rol importante en la defensa celular contra agentes exógenos y endógenos. (Meister y Anderson, 1988; Lafleur y col., 1994; Lubberda, 2005). El GSH es un tripéptido tiólico que cumple múltiples funciones como el transporte de aminoácidos, la síntesis de ADN y proteínas, la activación de enzimas y la reducción de compuestos disulfuros (Lafleur y col., 1994). Además, es fundamental para la descondensación de la cromatina del espermatozoide y la formación del pronúcleo masculino luego de la fecundación (Perreault y col., 1988; Yoshida y col., 1992; Yoshida, 1993). En el ovocito, el GSH posee una función activa manteniendo la morfología del huso meiótico y protegiéndolo contra el daño oxidativo (Zuelke y col., 1997). El GSH se considera como un indicador de la maduración citoplasmática del ovocito ya que, durante el proceso de maduración, su concentración intracelular aumenta condicionando el desarrollo embrionario posterior hasta el estadio de blastocisto (de Matos y col., 1995; Miyamura y col., 1995; de Matos y col., 1996; de Matos y Furnus, 2000).

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso altamente regulado y crucial en todos los organismos multicelulares (Rana y col., 2008). Las células apoptóticas sufren una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas características, incluyendo condensación de la cromatina, compactación de las organelas citoplasmáticas, cambios en la simetría de la membrana y fragmentación del ADN (Kerr y col., 1972; DeLong, 1998; Chandra y col., 2000). Como consecuencia de estos cambios, se

forman estructuras celulares envueltas en membrana plasmática llamadas “cuerpos apoptóticos” que son expulsados al espacio extracelular (DeLong, 1998). El proceso de apoptosis también implica la activación de una cascada de proteasas denominadas caspasas que son responsables de degradar sustratos celulares específicos y que llevan a la muerte celular (Hampton y Orrenius, 1997; Chandra y col., 2000). La apoptosis ocurre cuando el daño celular, incluyendo el daño en el material genético, ha sobrepasado la capacidad de reparación de la célula (Rana y col., 2008). El daño en el ADN puede ser el producto final del fenómeno de apoptosis o uno de los responsables de su desarrollo (Wang, 2001; Norbury y Zhivotovsky, 2004; Rana y col., 2008; Song y col., 2009). Si bien se ha demostrado, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, que las células de la granulosa mueren a través del proceso activo de apoptosis (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly y col., 1991; Luciano y col., 2000), la información sobre este fenómeno en células del cúmulus (CC) durante la MIV es todavía muy limitado (Luciano y col., 2000; Ikeda y col., 2003). Diversos autores han encontrado una relación inversa entre la tasa de apoptosis de las CC que rodean al ovocito y su capacidad de desarrollo posterior (Nakahara y col., 1997a,b; Lee y col., 2001; Host y col., 2002; Ikeda y col., 2003). Se ha establecido una fuerte correlación entre el aumento de la actividad SOD y la resistencia a la lesión celular y la apoptosis (Keller y col., 1998; Epperly y col., 2002; Holley y col., 2011).

El cobre actúa como intermediario en la transferencia de electrones de las reacciones redox siendo un factor esencial para las enzimas reductoras y oxidativas [Uauy y col., 1998]. Las ATPasas transportadoras de Cu como la ATP7A y ATP7B son dos proteínas claves que regulan el estatus de Cu y transportan el Cu a través de la membrana celular para funciones de biosíntesis y de protección celular. Esto permite que el Cu cumpla su rol catalítico y estructural como cofactor de muchas enzimas esenciales previniendo que el Cu se acumule en forma tóxica dentro de la célula [La Fontaine y col., 2010]. Las consecuencias de la hipocuprosis están asociadas con fallas en la función de las metaloenzimas dependientes de cobre (MT) (Cerone y col., 2000; Picco y col., 2004). La deficiencia de cobre induce daño en el ADN a través de un incremento en el estrés oxidativo [Johnson y Thomas, 1994; Pan y Loo, 2000; Kasprzak, 2002; Picco y col., 2004]. Sin embargo, no se conoce el daño que pueda

ocurrir en el ADN de ovocitos. La teratogenicidad de la deficiencia de Cu incrementa el estrés y el daño oxidativo (Kambe y col., 2008). En embriones de rata, la deficiencia de Cu causa malformaciones y reduce la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Hawk et al, 2003). También se ha descrito en embriones de ratón deficientes en Cu la presencia de anomalías en cerebro, corazón y en la vascularización del saco vitelino con altos niveles de nitración de proteínas (Beckers-Trapp y col., 2006). El glutatión reducido (GSH) es un abundante compuesto muy compartimentalizado y con varias funciones en el metabolismo y en la defensa celular incluyendo la detoxificación de metales pesados (Sies, 1999). La captación e incorporación de Cu dentro a las MT está fuertemente influenciada por los niveles de GSH (Chen y Maret, 2001). El Cu es rápidamente captado por el GSH y luego ingresado a la célula para ser transferido a las MT (Freedman y col., 1999). Períodos prolongados en ausencia de hierro y Cu incrementan el número de blastómeras apoptóticas en embriones bovinos (Gao y col., 2007).

En consecuencia, se diseñaron una serie de experimentos para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de Cu durante la MIV sobre: 1) los niveles intracelulares de GSH en ovocitos y CC, 2) la tasa de apoptosis en CC y 3) la integridad de su ADN en CC.

### **III-b) Materiales y métodos**

#### Complejos Ovocitos-Cúmulus

Los ovarios de bovino fueron obtenidos de frigoríficos y transportados al laboratorio en solución de ClNa (9 g/l) estéril con antibióticos a 37 °C dentro de las tres horas de extraídos. Los ovarios fueron recolectados independientemente de la etapa del ciclo estral de las hembras. Los COC fueron aspirados de folículos de 3 a 8 mm, utilizando una aguja 18-G conectada a un tubo estéril y a una línea de vacío (50 mmHg). Solo fueron seleccionados para la maduración los COC con el cúmulus intacto y con el citoplasma del ovocito uniformemente granulado. Para ello se utilizó un estereomicroscopio de bajo poder (20-30X). Las repeticiones (n= 4-6) de cada experimento se realizaron en diferentes días y en cada día se obtuvieron 200 COC, utilizando 50 COC por tratamiento.



### Maduración *in vitro*

Los COC fueron lavados dos veces en TCM-199 con 15 mM de HEPES y 10% (v/v) de suero fetal bovino, y luego dos veces en medio de MIV. Grupos de 10 COC fueron transferidos a microgotas de 50  $\mu$ l de medio de MIV bajo aceite mineral (Squibb, Princeton, NJ, USA) previamente equilibradas en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub>. El medio de MIV fue suplementado con hormonas, 1  $\mu$ g/ml FSH y 10  $\mu$ g/ml LH. El Cu se agregó al medio de MIV de modo de alcanzar las siguientes concentraciones: Cu1) 20  $\mu$ g/dl; Cu2) 40  $\mu$ g/dl; Cu3) 60  $\mu$ g/dl. También se trabajó con un tratamiento Control sin suplementar. Los COC fueron cultivados a 39 °C en 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación por 24 hs.

### Ensayo de GSH

Luego de la MIV los ovocitos se separaron del cúmulus mecánicamente por pipeteo en HEPES–TCM 199, y se lavaron 3 veces en PBS libre de Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>. La ruptura de los ovocitos se realizó por congelamiento/descongelamiento y aspiraciones repetidas con micropipeta. Las CC de  $\geq 50$  COC se transfirieron a tubos Eppendorf y se lavaron 2 veces en PBS por centrifugación a 14.000 g por 10 segundos. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ l de PBS y la concentración de células se contó en una cámara hemocitométrica. La destrucción de las CC se realizó por aspiraciones repetidas con aguja 26-G. Las muestras se diluyeron con 1,2 ml de buffer fosfato 0,2 M conteniendo 10 mM de EDTA. Luego se agregó 100  $\mu$ l de ditio-bis ácido 2-nitrobenzoico (DTNB) 10 mM, 1 unidad de glutatión reductasa y 50  $\mu$ l de NADPH 4,3 mM. El incremento de absorbancia se midió a 412 nm cada 30 segundos hasta completar 5 minutos con un espectrofotómetro de doble haz (Beckman Mod. 35, Irvine, CA, USA). La concentración total de GSH-GSSG (reducido-oxidado) en ovocitos y CC se calculó a partir de la curva estándar de GSH.

### Ensayo de apoptosis (Anexina V)

La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca<sup>++</sup> con una gran afinidad a fosfatidilserina (PS). La PS usualmente se ubica en la cara interna de la monocapa lipídica de la membrana plasmática. Cuando la célula sufre apoptosis, la PS se redistribuye

quedando expuesta en la superficie de la célula (Glander y Schaller, 1999; Paasch y col., 2004). Luego de la MIV la tasa de apoptosis temprana fue evaluada en CC utilizando un kit de tinción de Anexina-V-Fluos (Roche, Cat n° 11-858-777-001). La prueba involucra la tinción simultánea con Anexina-V-FLOUS (verde) y el colorante de ADN, ioduro de propidio (IP, rojo). Las células normales observadas al microscopio no presentan ninguna de las dos tinciones. Las células apoptóticas son visibles en color verde y pueden ser diferenciadas de las células necróticas por la tinción de IP (se tiñen de verde y naranja) (Figura 20). Las muestras ( $1 \times 10^6$  CC) fueron lavadas dos veces con PBS y centrifugadas a 200g por 5 min. Luego el pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de solución de marcado de Anexina-V-Fluos (Anexina-V + fluoresceína, HEPES e IP), e incubado en oscuridad por 10 a 15 min a 15 - 20 °C.

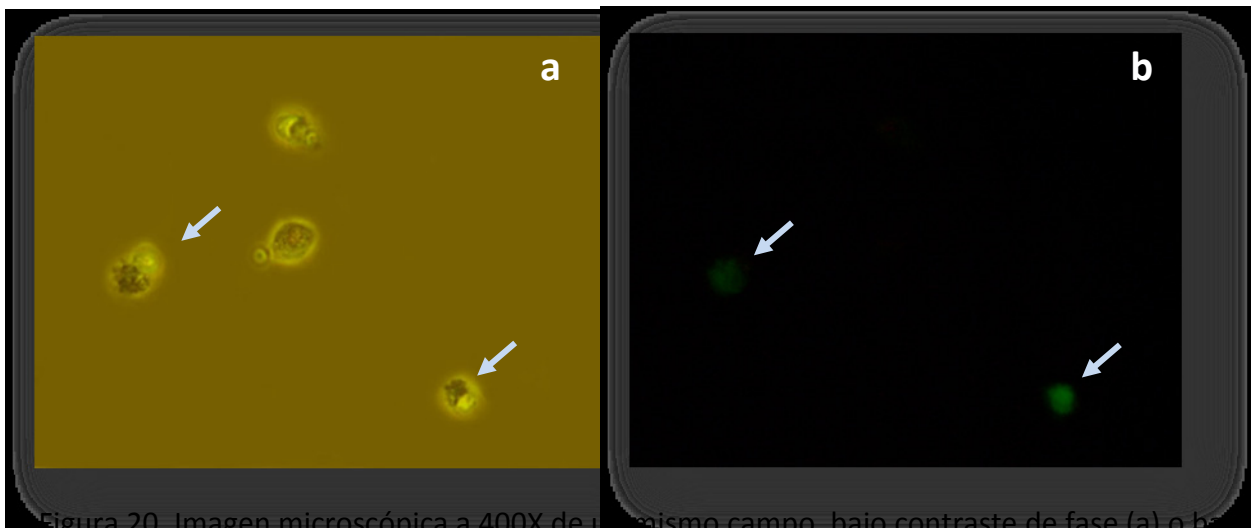


Figura 20. Imagen microscópica a 400X de un mismo campo, bajo contraste de fase (a) o bajo fluorescencia (b). Pueden observarse CC positivas para Anexina V (Flechas).

#### Ensayo cometa (Integridad del ADN)

Al finalizar la MIV, los ovocitos de cada tratamiento fueron separados de sus CC con pipeteo repetido usando pipeta de vidrio en medio HEPES-TCM 199. Las CC fueron lavadas tres veces en PBS libre de  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  con 1mg/ml PVP (polivinilpirrolidona). La ruptura completa de las células se realizó por repetidas aspiraciones con pipeta delgada. Las muestras fueron luego mezcladas con agarosa de bajo punto de fusión. Se realizó la electroforesis de células individuales en gel utilizando la versión alcalina descrita por Singh

y col. (1988) con algunas modificaciones (Tice y Strauss, 1995). Los portaobjetos se cubrieron con una capa de 180  $\mu$ l de agarosa al 0,5% (Carlsbad, Carlsbad, CA, USA). Las muestras de CC se mezclaron con 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (Carlsbad, Carlsbad, CA, USA), se distribuyeron sobre los portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos. Luego de la solidificación de la agarosa a 4°C por 10 min., los cubreobjetos fueron removidos, los portaobjetos con las muestras fueron sumergidos en solución de lisis durante una noche a 4°C y finalmente equilibrados en una solución alcalina por 20 min. La electroforesis se realizó por 30 min a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm). Luego de la corrida electroforética, los portaobjetos fueron neutralizados con tres lavados (5 min. cada uno) con TRIS (pH 7,5) y por último con agua destilada. Las muestras fueron teñidas con una solución 1/1000 de SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Olive y col., 1999). La evaluación y conteo de las células se realizó a 400X con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40, con filtro de 515-560 nm) conectado a una cámara de video (Sony 3 CCD-IRIS) y las imágenes fueron almacenadas usando el software Image Pro Plus. En base a la longitud de la cola del cometa las células se clasificaron en 5 categorías (Figura 32): Grado 0 (cola no visible); Grado 1 (cometa con una pequeña cola); Grado 2 (cometa con una cola más ancha y difusa); Grado 3 (cometa con una cola bien definida) y Grado 4 (cometa con una cola bien definida y una clara disminución en el diámetro de la cabeza). Las unidades de daño en el ADN se establecieron arbitrariamente de acuerdo a Collins (Olive y col., 1999; Collins, 2004). El índice de daño fue obtenido de la siguiente manera: El Índice de Daño del ADN (IDD) se obtuvo de la siguiente manera: se evaluaron 100 cometas, y a cada uno se le asignó un valor de 0 a 4 (según la clasificación de Grados), por lo tanto, el valor total para el portaobjetos fue de 0 a 400 “unidades arbitrarias” (Collins, 2004). Se determinó además, el valor de *Olive Tail Moment* (OTM). Este índice es el resultado del producto entre el porcentaje de ADN que constituye la cola y la distancia existente entre los centros de la cabeza y la cola del cometa (Olive y col., 1993; Poul y col., 2004). Para ello, las imágenes fueron procesadas utilizando el software Casp® (Figura 21).

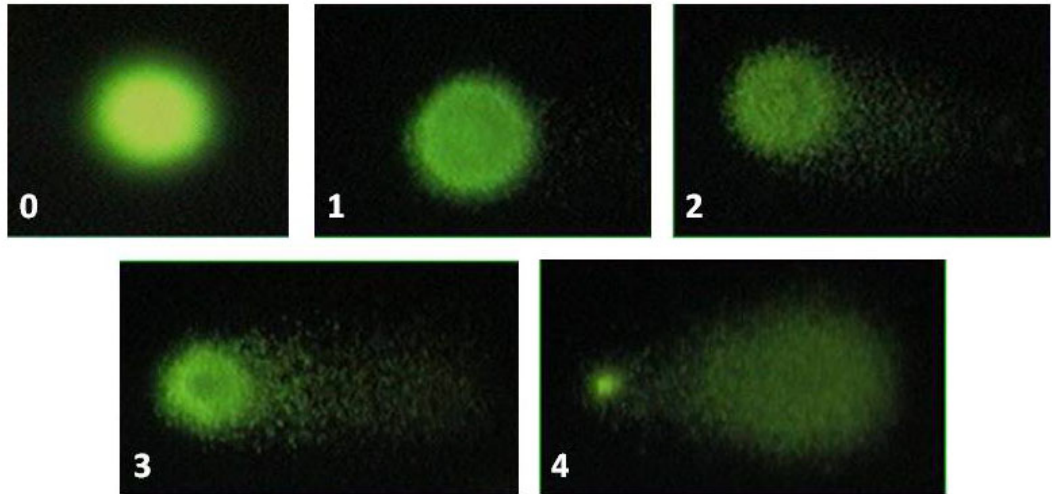


Figura 21. Clasificación de las células según la longitud del cometa. Grado 0 (cola no visible), Grado 1 (cometas con cola delgada), Grado 2 (cometas con cola difusa), Grado 3 (cometas con colas bien definidas), Grado 4 (cometas con una clara disminución en el diámetro de la cabeza y con una cola bien definida) (Collins, 2004).

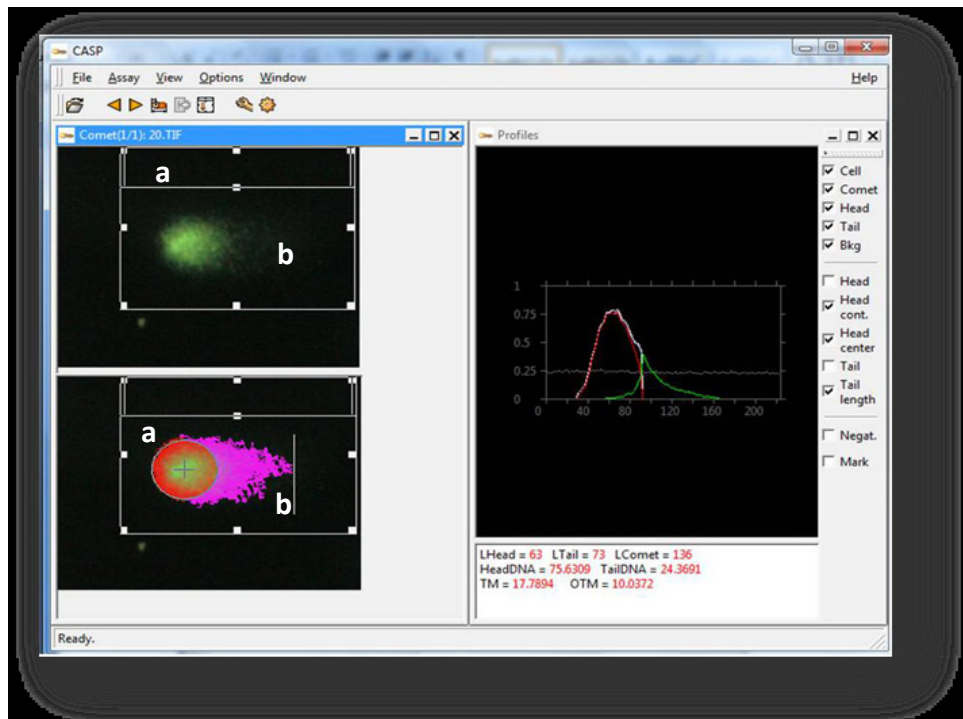


Figura 22. Determinación del valor de *Olive Tail Moment* (OTM) mediante el empleo del software Casp®. Este índice es el resultado del producto entre el porcentaje de ADN que constituye la cola y la distancia existente entre los centros de la cabeza y la cola del cometa. (a) Cabeza, (b) cola del cometa.

### **III-c) Diseño experimental**

#### Efecto del Cu sobre la concentración intracelular de GSH

En el Experimento 1, se evaluó el efecto del agregado de Cu al medio de MIV sobre la concentración intracelular de GSH-GSSG en ovocitos y CC. Para ello, los COC fueron madurados por 24 hs (4.2.2) en el medio Control o con el agregado de 20 µg/dl Cu (Cu1), 40 µg/dl Cu (Cu2) y 60 µg/dl Cu (Cu3). La concentración total de GSH se determinó como se describe en 4.2.3. Se utilizaron 800 COC recolectados en cuatro días diferentes (n= 4 repeticiones) y en cada repetición se incubaron 200 COC distribuidos en grupos de 50 COC por tratamiento.

#### Efecto del Cu sobre la tasa de apoptosis en CC.

En el Experimento 2, se evaluó el efecto del agregado de diferentes concentraciones de Cu (Cu1, Cu2 y Cu3) al medio de MIV, sobre la apoptosis temprana de CC de COC madurados in vitro (4.2.2). La apoptosis fue evaluada con un kit de Anexina-V-FLUOS (Roche, Cat # 11-858-777-001) como se describe en la sección 4.2.4. Para este propósito, se utilizaron 800 COC distribuidos en cuatro repeticiones en días diferentes (200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento). Se analizó un total de 500 CC por tratamiento bajo microscopio de fluorescencia a 400X con filtro de 515-560 nm.

#### Efecto del Cu sobre la integridad del ADN de CC

En el Experimento 3, se analizó el efecto de la adición de distintas concentraciones de Cu (Cu1, Cu2 y Cu3) al medio de MIV sobre el daño en la integridad del ADN de CC evaluado por Ensayo Cometa. Los COC fueron madurados por 24hs (4.2.2), y luego se evaluó el daño en el ADN como se describe en 4.2.5. Para este propósito, se utilizaron 800 COC en cuatro repeticiones de días diferentes (200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento). Para preparar los portaobjetos con las muestras, los 50 COC de cada grupo se procesaron juntos y se analizaron al menos 250 células por tratamiento.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio en bloque. El análisis estadístico de las variables continuas (concentración intracelular de GSH, índice de daño del ADN y *Olive Tail Moment*) se realizó mediante una regresión lineal mixta con el procedimiento MIXED de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). El modelo incluyó el efecto aleatorio del bloque (repetición= 4-6) y el efecto fijo del tratamiento (Control vs. Cu1 vs. Cu2 vs. Cu3). El análisis estadístico de las variables binomiales (tasa de apoptosis en CC y porcentaje de CC con daño en el ADN) se realizó mediante una regresión logística con el procedimiento GENMOD de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Se utilizó una distribución Binomial y un enlace Logit. El modelo logístico incluyó los efectos descriptos anteriormente (bloque y tratamiento). Se consideraron efectos significativos a las  $p < 0,05$  y tendencias a las  $p < 0,10$  y  $> 0,05$ . Los resultados de las variables continuas se expresan como el promedio  $\pm$  ESM, mientras que, los resultados de las variables binomiales se expresan como porcentaje (%).

### III-d) Resultados

Efecto del Cu sobre la concentración intracelular de GSH-GSSG de ovocitos y células del cúmulus.

En el Experimento 1, se maduraron *in vitro* 800 COC con distintas concentraciones de Cu (4 repeticiones, 200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento). Las concentraciones intracelulares de GSH-GSSG se incrementaron con el agregado de 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de Cu ( $P < 0,01$ ; Tabla 4). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido de GSH-GSSG en ovocitos y CC entre los COC madurados con 40 o 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de Cu. El número de CC por COC fue similar antes de la MIV ( $n= 4$ ) y después de la MIV ( $n= 4$  por tratamiento): Antes de la MIV el promedio ( $\pm$  ESM) de CC /COC fue de 15200 ( $\pm$  1200); y después de la MIV de 15233 ( $\pm$  1280) para el Control, de 15287 ( $\pm$  1197) para Cu1, de 15354 ( $\pm$  277) para Cu2 y de 15599 ( $\pm$  1230) para Cu3. En todos los experimentos, los porcentajes de maduración nuclear fueron evaluados por la presencia del cuerpo polar y la placa metafásica luego de 24 horas de MIV

mediante la tinción fluorescente con Hoechst 33342. Los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas entre el Control y las distintas concentraciones de Cu (Control:  $83 \pm 4.1\%$ ; Cu1:  $84 \pm 4.7$ ; Cu2:  $83 \pm 3.2$  y Cu3:  $60 \mu\text{g}/\text{dl}$ ).

Tabla 4. Contenido intracelular de GSH-GSSG en ovocitos bovinos y CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre

	Control	Cu1	Cu2	Cu3
<b>GSH-GSSG (pmol/ovocitos)</b>	$3,0 \pm 0,9^a$	$4,2 \pm 0,5^a$	$4,7 \pm 0,4^b$	$5,0 \pm 0,5^b$
<b>GSH-GSSG (nmol/10<sup>6</sup> CC)</b>	$0,3 \pm 0,05^a$	$0,3 \pm 0,02^a$	$0,4 \pm 0,04^b$	$0,5 \pm 0,05^b$

CC: células del cúmulus

(a y b) indican que los valores dentro de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,01$ ).

Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control) o suplementado con Cu: Cu1)  $20 \mu\text{g}/\text{dl}$ ; Cu2)  $40 \mu\text{g}/\text{dl}$  y Cu3)  $60 \mu\text{g}/\text{dl}$ . Todos los valores correspondientes a pmol GSH-GSSG/ovocito y nmol GSH-GSSG/10<sup>6</sup> células cúmulus se expresan como la media  $\pm$  ESM (800 COC en 4 repeticiones, 200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento en cada repetición).

Efecto del Cu sobre la tasa de apoptosis de las células del cúmulus.

En el Experimento 2, se evaluó la frecuencia de apoptosis de las CC de COC madurados con diferentes concentraciones de Cu:  $0 \mu\text{g}/\text{dl}$  (Control),  $20 \mu\text{g}/\text{dl}$  (Cu1),  $40 \mu\text{g}/\text{dl}$  (Cu2), y  $60 \mu\text{g}/\text{dl}$  (Cu3). Cada grupo incluyó la evaluación de 500 células. En el Control la frecuencia de células apoptóticas fue de 0,129 (64/500) mientras que con el agregado de Cu las frecuencias fueron las siguientes: Cu1: 0,116 (58/500); Cu2: 0,119 (60/500) y Cu3: 0,112 (56/500). La tasa de apoptosis fue significativamente menor en el caso de Cu3 ( $60 \mu\text{g}/\text{dl}$  Cu) con respecto al medio Control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no existieron diferencias significativas en la tasa de apoptosis cuando se analizaron los grupos correspondientes a Cu1 y Cu 2 ( $p > 0,05$ ; Figura 23).

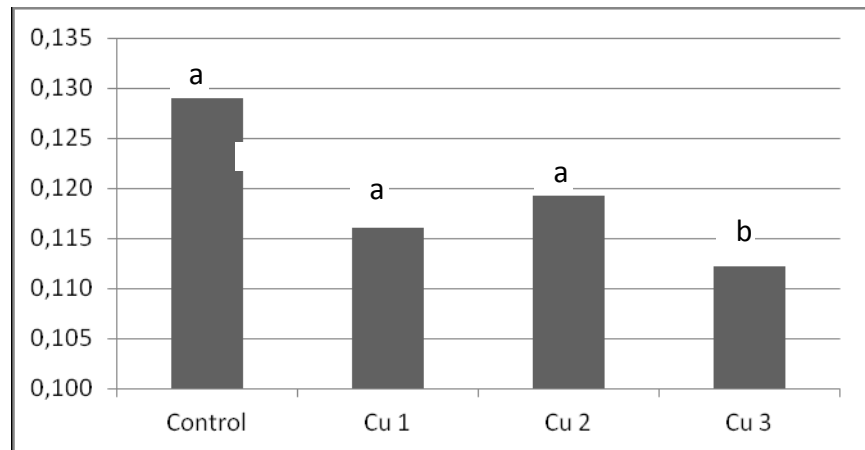


Figura 23. Efecto de distintas concentraciones de cobre durante la MIV sobre la tasa de apoptosis de las células del cúmulus.

a- b Indican las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control) o suplementado con Cu: Cu1) 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; Cu2) 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y Cu3) 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Se maduraron 800 COC distribuidos en cuatro repeticiones en días diferentes (200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento). Se analizó un total de 500 CC por tratamiento).

Efecto del Cu sobre la integridad del ADN de las células del cúmulus.

En el Experimento 3, el Índice de Daño (ID) del ADN de las CC obtenidas a partir de los COC madurados *in vitro* con el agregado de Cu, fue significativamente menor con 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu. Los valores del ID para el Control y los distintos tratamientos de Cu fueron:  $200,0 \pm 27,6$  (Control);  $127,6 \pm 6,0$  (Cu1);  $46,4 \pm 4,8$  (Cu2) y  $51,1 \pm 6,0$  (Cu3). Los porcentajes de células sin daño en el ADN (Grado 0) se incrementaron junto con las concentraciones de Cu agregadas al medio de MIV (Tabla 5). El porcentaje de daño fue menor en ovocitos madurados con 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  comparado con el medio sin suplementar ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el grado de daño del ADN de las CC maduradas sin Cu agregado (Control) y 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de Cu.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo cometa demostraron que el agregado de distintas concentraciones de Cu al medio de MIV disminuyó el valor de OTM en las CC ( $p < 0,05$ ; Figura 24). El porcentaje de ADN en la cabeza del cometa (HDNA) fue significativamente mayor en Cu1 (20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), Cu2 (40  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y Cu3 (60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) respecto al Control ( $P < 0,01$ ; Figura 25). No hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones de Cu ( $P > 0,05$ ).



Tabla 5. Grado de daño del ADN en CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre.

Tratamiento	Grados de Daño (%)				
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
<b>Control</b>	37.4 <sup>a</sup> (3.7)	17.4 <sup>a</sup> (1.9)	12.3 <sup>a</sup> ( 1.1)	11.2 <sup>a</sup> ( 1.6)	11.0 <sup>a</sup> (4.5)
<b>Cu 1</b>	38.9 <sup>a</sup> (3.7)	25.0 <sup>a</sup> (3.8)	18.0 <sup>a</sup> (1.0)	7.9 <sup>a</sup> (0.9)	10.1 <sup>a</sup> (3.0)
<b>Cu 2</b>	72.7 <sup>b</sup> (3.0)	13.0 <sup>b</sup> (2.1)	10.9 <sup>b</sup> (2.3)	1.6 <sup>b</sup> (0.6)	1.7 <sup>b</sup> (0.3)
<b>Cu 3</b>	66.2 <sup>b</sup> (2.0)	19.5 <sup>b</sup> (0.6)	7.2 <sup>b</sup> (1.8)	0.9 <sup>b</sup> (0.4)	0.6 <sup>b</sup> (0.2)

a-b Indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM (800 COC en 4 repeticiones, 200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento en cada repetición). Los tratamientos empleados fueron Control (0  $\mu\text{g/dl}$  Cu); Cu1 (20  $\mu\text{g/dl}$ ), Cu2 (40  $\mu\text{g/dl}$ ) y Cu3 (60  $\mu\text{g/dl}$ ).

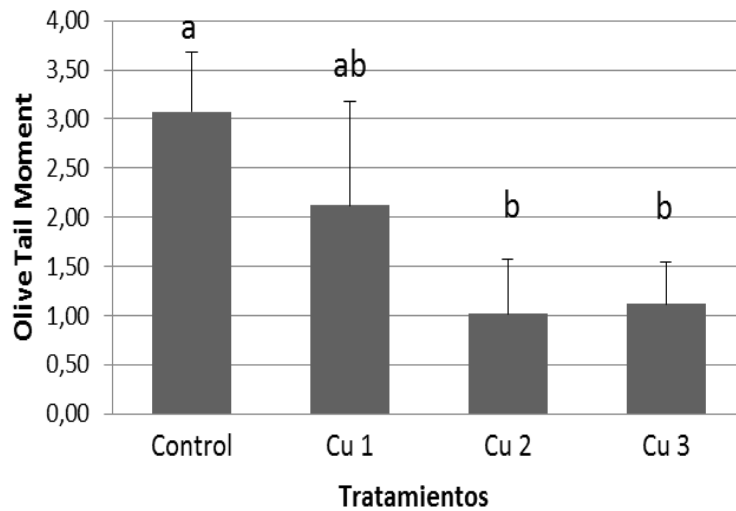


Figura 24. Valor de *Olive Tail Moment* en CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre.

a - b Indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control) o suplementados con Cu (Cu1= 20  $\mu\text{g/dl}$ ; Cu2= 40  $\mu\text{g/dl}$  y Cu3= 60  $\mu\text{g/dl}$ ). Los valores se expresan como valor de OTM  $\pm$  ESM (Control= 3,07  $\pm$  0,60; Cu1= 2,12  $\pm$  1,06; Cu2= 1,01  $\pm$  0,56; Cu3= 1,12  $\pm$  0,43) (800 COC en 4 repeticiones, 200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento en cada repetición).

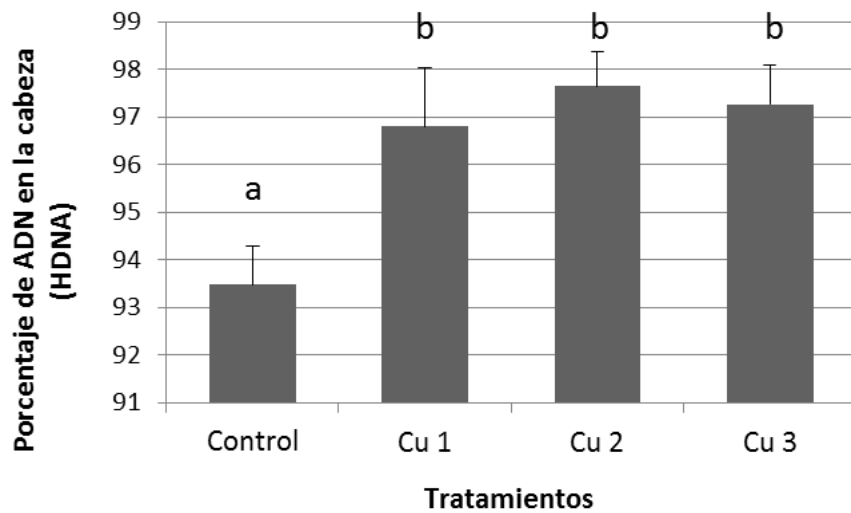


Figura 25. Porcentaje de ADN en la cabeza en CC luego de la MIV con distintas concentraciones de cobre

a – b Indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control) o suplementados con Cu (Cu1= 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; Cu2= 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y Cu3= 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). Los valores se expresan como porcentaje de ADN en la cabeza (HDNA)  $\pm$  ESM (800 COC en 4 repeticiones, 200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento en cada repetición).

### III-e) Discusión y Conclusiones del capítulo

El agregado de Cu al medio de maduración incrementó la concentración intracelular de GSH-GSSG en el ovocito y en las células del cúmulus. Esto podría deberse a un mejor estatus antioxidante de las células. El GSH es el principal compuesto sulfatado no proteico que protege a las células de mamífero del daño oxidativo (Pastore y col., 2003). Cuando el estado redox de una célula se ve alterado, se produce un mayor consumo de GSH que conduce a un agotamiento intracelular de este compuesto tiólico. (Martin y Teismann, 2009). Los ovocitos madurados *in vivo* poseen una concentración de GSH mayor que los madurados *in vitro* (Brad y col. 2003). Esto se debe a una mayor exposición a especies reactivas del oxígeno (ROS) durante la MIV, momento en el que los ovocitos están sometidos a una alta concentración de oxígeno (Luberda, 2005). Estudios previos han demostrado que

un alto contenido de GSH durante la maduración del ovocito es importante para la expansión del cúmulus *in vitro* y para proteger al embrión hasta el estadio de blastocisto (Takahashi y col., 1993; de Matos y col., 1995; Furnus y col., 1998). Además, altas concentraciones de GSH durante la MIV mejoran el desarrollo y la calidad embrionaria (de Matos y col., 1996; Furnus y col., 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis indicaron que cuando el medio de MIV se suplementó con 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu, la concentración total de GSH-GSSG fue mayor tanto en ovocitos como en CC. Estudios previos han demostrado que la disminución drástica del Cu intracelular produce una disminución abrupta del GSH en células CHO (Chinese hamster ovary) cultivadas *in vitro* (Chaderjian y col., 2005). La relación entre el Cu y el GSH ha sido estudiada exhaustivamente, el Cu es un ligando biológico formado por complejos binarios con GSH (Jiménez y Speisky, 2000). La formación del complejo Cu-GSH, el cual es estable en presencia de algunos quelantes de Cu, pierde la reactividad a todos los tioles pero conserva plenamente las propiedades para captar los radicales libres del GSH (Jiménez y Speisky, 2000). La mayoría del Cu plasmático es transportado unido a ceruloplasmina (95%), mientras que el resto se une a albúmina, transcupreína y complejos Cu-aminoácidos (Cunningham y col., 1995). El cobre libre es tóxico ya que altera el balance de las ROS debido a que es un agente redox muy activo (Cunningham y col., 1995; Evans y col., 2002). La totalidad del pool de tioles constituye la mayor parte de la actividad antioxidante del cuerpo. La mayor contribución al pool de tioles proviene del glutatión reducido y de los grupos sulfridilos libres (SH) presentes en la mayoría de las proteínas, principalmente en la albúmina (Sarkar y col., 2010; Prakash y col., 2004).

La tasa de apoptosis disminuyó en las CC de los COC madurados *in vitro* con el agregado de Cu. Las CC maduradas con 60 µg/dl Cu (Cu3), concentración plasmática considerada “adecuada” para el bovino por Kincaid (1999), presentaron la tasa de apoptosis más baja. Existe evidencia que demuestra que el estrés oxidativo induce la muerte celular programada o apoptosis (DeLong, 1998). Sin embargo, este proceso es también un mecanismo fisiológico destinado a mantener la homeostasis tisular y de acción fundamental durante la embriogénesis (Schrantz y col., 1999). Este fenómeno que se inicia por diferentes vías depende en todos los casos, de la activación de un grupo de proteasas llamadas caspasas (Czerski y Nuñez, 2004; Elmore, 2007). Entre estas enzimas se encuentra la caspasa-3 responsable de desencadenar la fragmentación del ADN, la degradación de las proteínas nucleares y del citoesqueleto, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas (Martinvalet y col., 2005; Elmore, 2007). La apoptosis ocurre cuando el daño celular, incluyendo el daño en el material genético, ha sobrepasado la capacidad de reparación de la célula (Rana y col., 2008). El daño en el ADN puede ser el producto final de este proceso o uno de los responsables de su desarrollo (Wang, 2001; Norbury y Zhivotovsky, 2004; Rana y col., 2008; Song y col., 2009). Estudios previos han demostrado que en células endoteliales porcinas transfectadas con la enzima Cu/Zn-SOD se logra prevenir la apoptosis por el daño oxidativo originado durante el cultivo *in vitro* (Yokoyama y col., 2002). En modelos *in vivo* con ratones, se pudo comprobar que la deficiencia de Cu y Mn en la dieta trae consecuencias sobre la apoptosis neuronal de estos animales (Bolea y col., 2010). Además, en células de la granulosa de ovarios porcinos, el agregado de Cu en bajas dosis disminuye la tasa de apoptosis (Roychoudhury y col., 2014).

El daño en el ADN de las CC fue menor cuando se agregaron al medio de MIV concentraciones de 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Estudios previos han demostrado una asociación entre la concentración de Cu en plasma y el daño en el ADN de linfocitos de vaquillonas hipocuprémicas (Picco y col., 2004). Además, el incremento en el daño del DNA encontrado en animales hipocuprémicos se explica por un alto estrés oxidativo (Picco y col., 2004). La hipocupremia en vacas está asociada a un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, así como también a una mayor migración del ADN evaluada por ensayo cometa. Sin embargo, las aberraciones cromosómicas detectadas sólo permiten diferenciar entre animales normales o hipocuprémicos, no siendo posible diferenciar los distintos niveles de Cu en plasma (Picco y col., 2004). El Cu cumpliría un rol importante como antioxidante durante la MIV actuando en el mantenimiento de la integridad del ADN del complejo ovocito-cúmulus, previniendo el daño oxidativo del ADN de las CC.

En las CC, la tasa de apoptosis y el daño en el ADN no presentaron el mismo comportamiento. Mientras que la tasa de apoptosis disminuyó únicamente cuando el Cu agregado al medio de MIV correspondió a la concentración más alta (60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu), el grado de daño en el ADN fue menor con todas las concentraciones de Cu estudiadas. Sin embargo, el daño más bajo en la integridad del ADN se obtuvo con las concentraciones que corresponden a la deficiencia marginal y a la concentración adecuada (Cu<sub>2</sub> y Cu<sub>3</sub>).

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que: 1) El agregado de Cu al medio de maduración incrementó la concentración intracelular de GSH-GSSG en el ovocito y las CC. 2) La tasa de apoptosis disminuyó en las CC de COC madurados *in vitro* con el agregado de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu al medio de MIV. 2) El agregado de Cu al medio de maduración

disminuyó el daño en el ADN de las CC durante la MIV, evidenciando un efecto “protector” de este mineral contra el daño en dicha molécula. Nuestros resultados sugieren que el Cu podría actuar como un factor importante durante la maduración *in vitro*, mejorando el estatus antioxidante del COC bovino.

## Capítulo IV

### **Efecto de distintas concentraciones de Cu durante la MIV sobre la capacidad de desarrollo posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto**

#### **IV-a) Introducción**

La maduración de los ovocitos de mamífero tanto *in vivo* como *in vitro*, tiene como resultado final la obtención de un ovocito en metafase II (MII), capaz de ser fertilizado y que permita, eventualmente, el desarrollo embrionario normal (Fulka y col., 1998). Este es un proceso largo durante el cual los ovocitos adquieren la capacidad intrínseca de avanzar a través de las etapas subsiguientes del desarrollo e implica tanto la maduración nuclear como la maduración citoplasmática del mismo, la cual se ve acompañada de la expansión y mucificación de las células del cúmulus (Eppig, 1982; Fulka y col., 1998; Ferreira y col., 2009). La maduración nuclear implica la reanudación de la meiosis, la formación del huso acromático, la condensación de la cromatina, la segregación de los cromosomas y la liberación del primer cuerpo polar. En este momento, los ovocitos quedan detenidos en MII hasta el momento de la fertilización (Evans y Robinson, 2011). La maduración citoplasmática es un proceso menos comprendido y consiste en tres grandes eventos, la redistribución de las organelas, cambios en el citoesqueleto y la denominada maduración molecular, caracterizada por la síntesis y fosforilación de proteínas relacionadas con la meiosis y la

formación del pronúcleo femenino (Hunter y Moor, 1987; Simon y col., 1989; Fulka y col., 1991).

Una maduración citoplasmática incompleta compromete seriamente la capacidad fértil y el desarrollo posterior de los ovocitos. Estas gametas acumulan durante su crecimiento ARNm materno, proteínas y moléculas reguladoras que intervienen en la culminación de la meiosis, la fertilización y la embriogénesis temprana (Eppig y Wigglesworth, 2000). Existen moléculas que se sintetizan y acumulan en el ovocito durante la maduración y que son esenciales para el desarrollo embrionario. A estas moléculas se las consideran como indicadores de la maduración citoplasmática. Algunos de ellos son las moléculas de ATP (Stojkovic y col., 2001) y el glutatión (GSH) (de Matos y col., 1995).

En los últimos años, se han hecho importantes esfuerzos para determinar el papel de los elementos traza en la reproducción de mamíferos. Sin embargo, se ha estudiado poco en la especie bovina y sobre todo en lo referente a la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario posterior *in vitro* (Gao y col., 2007).

En consecuencia, se diseñaron una serie de experimentos para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de Cu durante la MIV sobre: 1) el desarrollo embrionario posterior hasta el estadio a blastocisto y 2) la calidad de los embriones evaluada a partir del número de células por blastocisto a Día 8 de cultivo.



## **IV-b) Materiales y métodos**

### **Complejos Ovocitos-Cúmulus**

La obtención de los ovocitos se llevó a cabo como se describe previamente (2.3). Las repeticiones de cada experimento (n= 6) se realizaron en días diferentes y en cada día se obtuvieron 200 COC, utilizando 50 COC por tratamiento.

### **MIV, FIV y CIV**

Los medios y el procedimiento utilizados para la MIV, FIV y la CIV corresponden a los descritos previamente en la sección 2.3, 2.4 y 2.5 respectivamente. El medio de MIV fue suplementado con Cu de modo de alcanzar las siguientes concentraciones: Cu 1) 20 µg/dl; Cu 2) 40 µg/dl; Cu 3) 60 µg/dl y un Control sin suplementar. Al final del CIV, los embriones fueron evaluados para determinar su estado morfológico de desarrollo con un microscopio invertido (Nikon, Diaphot).

### **Número de células por blastocisto a Día 8**

Los blastocistos se fijaron en formaldehído al 4% luego de haber sido lavados 3 veces en PBS con 1% de PVP. Los embriones se incubaron con Triton X-100 al 1%, se colorearon con Hoechst 33342 (2.6) y se montaron con glicerol entre portaobjeto y cubreobjeto. El número total de células por blastocisto (Grado 1) se determinó contando el número de núcleos con un microscopio de epifluorescencia a 40 X y con filtro de excitación de 365-nm, filtro de barrido de 400-nm y un filtro de emisión de 400-nm.

#### **IV-c) Diseño experimental**

Efecto del Cu sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto

En el Experimento 4, se evaluó el efecto del Cu agregado al medio de MIV (Cu1: 20 µg/dl; Cu2: 40 µg/dl; Cu3: 60 µg/dl) sobre la capacidad de desarrollo posterior de ovocitos de bovino hasta el estadio preimplantacional de blastocisto. El medio Control no fue suplementado pero contiene 0,05 µg/dl Cu aportado por el SFB (Capítulo 1). Para este propósito, 1265 COC en seis repeticiones de días diferentes fueron madurados *in vitro* con distintas concentraciones de Cu. La tasa de clivaje se evaluó a las 48 horas luego de la inseminación. La tasa de blastocistos incluye aquellos embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto expandido y eclosionado (*hatched*) al Día 8 de cultivo.

Efecto del Cu sobre el número de células por blastocisto a Día 8

En el Experimento 5 se analizó el efecto de distintas concentraciones de Cu durante la MIV de ovocitos bovinos, sobre el número promedio de células por blastocisto al Día 8 de cultivo. El número de células se evaluó sobre un total de 146 embriones obtenidos en el Experimento 4.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de las tasas de clivaje, tasas de blastocistos y número de células por blastocisto se realizó mediante ANOVA y a *posteriori* se aplicó el Test de Comparación

Múltiple de Student-Newman-Keuls luego de la transformación angular de los datos (CSS: Statistica, module C, Statsoft, Tulsa, OK). Se consideraron efectos significativos con valores de  $p < 0,05$ . Los resultados de las tasas se expresan como porcentajes (%), mientras que el número de células por embrión como el promedio  $\pm$  ESM.

#### **IV-d) Resultados**

Efecto del Cu sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto

La tasa de clivaje (Experimento 4) evaluada a las 48 horas post inseminación, teniendo en cuenta el porcentaje de embriones de 2 células, fue similar en todos los grupos estudiados. No hubo diferencias significativas en la tasa de clivaje cuando el Cu fue agregado al medio de MIV en ninguna de las concentraciones estudiadas ( $P > 0,05$ ; Tabla 6) El Cu incrementó las tasas de blastocistos (blastocistos/ovocitos) cuando los ovocitos fueron madurados con concentraciones de 20, 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu ( $P < 0,01$ ; Tabla 6). Sin embargo, la diferencia en la tasa de blastocistos fue altamente significativa cuando se agregó 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu al medio de MIV ( $P < 0,001$ ; Tabla 6). El agregado de Cu al medio de MIV también incrementó los porcentajes de blastocistos /clivados ( $P < 0,01$ ; Tabla 6). La tasa de *eclosión* aumentó cuando los ovocitos se maduraron con el agregado de Cu, alcanzando el grupo Cu3 el porcentaje más alto ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7).

Tabla 6. Efecto del Cu durante la maduración *in vitro* de ovocitos sobre el desarrollo embrionario posterior.

Tratamiento	Ovocitos	Clivaje	Blastocisto/Ovocito	Blastocisto/Clivados
	N	%	%	%
<b>Control</b>	313	65,0 ± 2,0 a	18,7 ± 0,6 a	29,3 ± 1,1 a
<b>Cu 1</b>	339	66,6 ± 1,6 a	16,4 ± 0,03 b	36,4 ± 2,2 b
<b>Cu 2</b>	309	72,0 ± 2,1 a	29,0 ± 1,7 b	40,5 ± 2,7 b
<b>Cu 3</b>	304	70,7 ± 2,1 a	33,2 ± 1,6 c	47,0 ± 1,5 c

(a, b y c) indican que los valores dentro de una misma columna difieren significativamente..

Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control) o suplementado con Cu: Control (0,05 µg/dl Cu); Cu1 (20 µg/dl), Cu2 (40 µg/dl) y Cu3 (60 µg/dl).

Los valores corresponden a 6 repeticiones independientes.

Clivaje: Porcentaje de los ovocitos fertilizados que clivaron por lo menos una vez (embriones de 2 células).

Tabla 7. Efecto del Cu durante la maduración *in vitro* de ovocitos sobre el porcentaje de *eclosión*

	Control	Cu1	Cu2	Cu3
<b>Porcentaje de Eclosión</b>	18,97 % <sup>a</sup>	21,33 % <sup>b</sup>	26,38 % <sup>b</sup>	30,02 % <sup>c</sup>

(a, b y c) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control) o suplementado con Cu: Control (0 µg/dl Cu); Cu1 (20 µg/dl), Cu2 (40 µg/dl) y Cu3 (60 µg/dl).

Los valores se expresan como el porcentaje de blastocistos eclosionados/blastocistos totales por tratamiento. Se evaluaron un total de blastocistos en 6 repeticiones.

## Efecto del Cu sobre el número de células por blastocistos a Día 8

En el Experimento 5, el número de células por blastocisto aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando los ovocitos fueron madurados con 40 µg/dl (Cu2) y 60µg/dl (Cu3) (Tabla 8).

Tabla 8. Promedio de células por blastocisto al día 8 de cultivo desarrollados a partir de ovocitos madurados con distintas concentraciones de cobre.

Tratamiento	Blastocistos (n)	Número Promedio de Células $\pm$ ESM / blastocisto
Control	35	102,3 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>
Cu1	39	107,2 $\pm$ 5,5 <sup>a</sup>
Cu2	32	127,4 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>
Cu3	40	129,0 $\pm$ 5,0 <sup>b</sup>

(a y b) indican que los valores dentro de una misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control= 0,05  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) o suplementado con Cu: Cu1) 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; Cu2) 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y Cu3) 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Los valores se expresan como el promedio del número de células/ blastocisto  $\pm$  ESM (82 blastocistos en 3 repeticiones).

#### IV-e) Discusión y Conclusiones del Capítulo

Las primeras etapas del desarrollo embrionario son dependientes, en gran medida, de los sucesos que ocurren durante la maduración del ovocito. El suministro adecuado de sustratos metabólicos necesarios para el COC durante la MIV, impacta en la capacidad de desarrollo embrionario posterior de los mismos (Krisher y Bavister, 1998). Actualmente, la evidencia disponible indica que las condiciones de cultivo permiten una adecuada maduración nuclear, pero con frecuencia no pueden mantener una óptima maduración citoplasmática, lo que resulta en una disminución en la capacidad de los ovocitos para avanzar hacia los estadios embrionarios subsiguientes (Cha y Chian, 1998; Moor y col., 1998; Trounson y col., 2001).

En este estudio, se evaluó el efecto del agregado de varias concentraciones de Cu durante las 24 horas de maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos, independientemente

del estatus de Cu del animal para determinar la capacidad o competencia (maduración citoplasmática) de estos ovocitos para desarrollar hasta el estadio de blastocisto. El agregado de 20, 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu (Cu1, Cu 2 y Cu3) al medio de MIV no modificó las tasas de clivaje luego de la FIV comparado con los ovocitos madurados en el medio sin el agregado de este mineral. Sin embargo, la producción de embriones que desarrollaron hasta el estadio de blastocisto se incrementó cuando los ovocitos se maduraron con Cu (20, 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) durante la MIV, siendo significativamente más alta la tasa de blastocistos obtenida con 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  Cu. En estudios previos, Gao y colaboradores (2007) encontraron que el agregado de 0,68 y 0,46 mg/l de Cu al medio de cultivo de los cigotos mejoró la producción de embriones bovinos *in vitro*. En este trabajo de tesis se demostró que concentraciones adecuadas de Cu durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos incrementaron las tasas de desarrollo embrionario preimplantacional. Por lo tanto, se podría inferir una posible asociación entre la producción de embriones y las concentraciones de Cu presentes durante la maduración *in vitro*.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que: 1) El agregado de Cu al medio de MIV incrementó la tasa de blastocistos; 2) La calidad de los embriones (expresada como blastómeras por embrión y tasa de *eclosión*) fue mejor cuando se agregó Cu al medio de MIV. Es decir que el aporte de Cu en concentraciones consideradas como “adecuadas” durante la maduración *in vitro* del ovocito, favorece el desarrollo embrionario temprano.

## Capítulo V

### **Rol de las células del cúmulus como puente metabólico entre el medio externo y el ovocito, con diferentes niveles en el aporte de Cu durante la MIV.**

#### **V-a) Introducción**

La capacidad de desarrollo posterior del ovocito depende en gran medida del medio ambiente folicular que lo rodea. Los ovocitos de mamíferos crecen y se desarrollan en íntima relación con las células somáticas adyacentes. Durante la formación del antro folicular (en la foliculogénesis) las células de la granulosa se diferencian en dos linajes celulares funcional y anatómicamente diferentes: las células de la granulosa mural que recubren la pared del folículo, y las células del cúmulus, que forman una asociación íntima con el ovocito (Huang y Wells, 2010).

Durante la MIV, los ovocitos de mamíferos se encuentran rodeados por las células del cúmulus a las que se hayan unidos metabólicamente (Moor y col., 1980). Las CC poseen proyecciones citoplasmáticas transzonales (PTZ) altamente especializadas que penetran la zona pelúcida y se comunican con el citoplasma del ovocito a través de uniones nexo (uniones gap) (Albertini y col., 2001). Las uniones gap ubicadas en los extremos de estas PTZ (y entre las células del cúmulus) conectan a las CC entre sí y con el ovocito, facilitando la transferencia de moléculas de bajo peso molecular como iones, metabolitos y aminoácidos necesarios para el crecimiento de la gameta, así como también pequeñas moléculas reguladoras como el AMPc (Larsen y Wert, 1988; Larsen, 1989; Albertini y col., 2001; Sutton y col., 2003; Gilchrist y col., 2008).

Por otra parte, Kim y colaboradores (1996) demostraron que si bien, la presencia de CC junto a ovocitos bovinos no era necesario para la maduración nuclear, ellas desempeñan un papel importante en la capacidad de los mismos para desarrollarse hasta la etapa de blastocisto. Es por ello que en la actualidad, la morfología del cúmulus es uno de los criterios más utilizados en la selección de los COC para la MIV. Características tales como, mayor número de capas de células y mayor grado de compactación, están directamente relacionados con mejores resultados en el desarrollo, comparados con ovocitos rodeados de un cúmulus comprometido u ovocitos desnudos (DO) (Shioya y col., 1988; Madison y col., 1992; Lonergan y col., 1994; Goud y col., 1998). Se ha comprobado además, la existencia de una relación positiva entre el número de CC en el cocultivo y la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos (Hashimoto y col., 1998).

Debido a la delicada relación existente entre el carácter esencial del Cu y su toxicidad, su homeostasis es vital para el óptimo funcionamiento de cualquier organismo. Durante las últimas dos décadas, varios de los mecanismos de ingreso del Cu a la célula han sido identificados. La captación celular de Cu se realiza por múltiples mecanismos, entre los que se encuentran: el transportador de Cu CTR1 y el transportador de cationes bivalentes 1 (DMT1) (Arredondo y Nuñez, 2005) cuando el metal se encuentra en su estado reducido.

En consecuencia, se diseñaron una serie de experimentos con el fin estudiar el rol de las CC en el transporte de Cu entre el medio externo y el ovocito.

## **V-b) Materiales y métodos**

### Complejos Ovocitos-Cúmulus (COC)

Los ovarios de bovino obtenidos de frigorífico fueron transportados al laboratorio en solución fisiológica a 37 °C dentro de las 3 hs de realizada la extracción. Los ovarios fueron recolectados independientemente de la etapa del ciclo estral de las hembras y los COC fueron aspirados y seleccionados como se describe en 2.3. Las repeticiones de cada experimento (n= 4) se realizaron en días diferentes y en cada día se obtuvieron 300 COC, utilizando 50 COC por tratamiento.



### Maduración *in vitro* (MIV)

Los DO se obtuvieron a partir de ovocitos con el cúmulus completo, que por pipeteo fueron separados de las células que los rodean. Luego los DO se lavaron en medio TCM-199 con 15 mM de Hepes y 10 % (v/v) de SFB y dos veces en el medio de MIV. Grupos de 10 COC o de 10 DO fueron transferidos a microgotas de 50  $\mu$ l de medio MIV bajo aceite mineral (Squibb, Princeton, NJ) equilibrado previamente en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Los COC y los DO fueron cultivados a 39 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación por 24 hs.

### Cocultivo de CC

Las monocapas de CC fueron preparadas a partir de COC obtenidos por aspiración folicular como se describió anteriormente (2.3). Los ovocitos se separaron de las CC en medio de MIV con pipeta de punta fina. Luego, los ovocitos fueron descartados y las células se pipetearon vigorosamente para permitir su separación. De la suspensión de CC se tomó una muestra, se determinó la concentración con una cámara hemocitométrica y se diluyó en medio de MIV hasta obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  CC/ml. Para cada cocultivo se sembró 0,5 ml de esta suspensión de CC bajo aceite mineral. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas hasta lograr el 70 – 80 % de confluencia, que se obtuvo dentro de los 4 - 5 días posteriores al inicio del cocultivo. El porcentaje de células vivas, establecido con un colorante vital, fue mayor al 80 % al comienzo del cultivo.

### Fertilización *in vitro* (FIV) y Cultivo *in vitro* (CIV)

Los medios y el procedimiento utilizados para la FIV y la CIV corresponden a los descritos previamente en 2.4 y 2.5 respectivamente.

## **V-c) Diseño experimental**

### 6.3.1 Rol de las CC durante la MIV de ovocitos bovinos en presencia de Cu sobre la capacidad de desarrollo posterior

En el Experimento 6, los ovocitos se maduraron *in vitro* en tres formas diferentes: complejos ovocito-cúmulus (400 COC), cocultivo de ovocitos desnudos junto a monocapas

de CC (400 DO + CC) y ovocitos desnudos (400 DO). En cada forma de maduración, los ovocitos se dividieron en 2 grupos correspondientes a los tratamientos sin suplementación de Cu (0,05 µg/dl) y con Cu (Cu= 6 µg/dl). Los ovocitos fueron recolectados en cuatro días diferentes (n= 4 repeticiones) y en cada repetición se dividieron en los siguientes grupos: 50 COC; 50 COC Cu; 50 DO + CC; 50 DO + CC Cu; 50 DO y 50 DO Cu. Luego de la MIV, los ovocitos fueron fertilizados *in vitro* y cultivados hasta el estadio de blastocisto como se describe en 2.4 y 2.5 respectivamente. La tasa de clivaje se evaluó 48 horas luego de la FIV. La tasa de desarrollo hasta blastocisto se evaluó el Día 8 del cultivo e incluyó a los embriones que alcanzaron los estadios de blastocisto expandido y eclosionado.

#### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio en bloque con un arreglo 2 X 3 factorial. El análisis estadístico de las variables binomiales (tasa de clivaje y tasa de blastocistos) se realizó mediante una regresión logística con el procedimiento GENMOD de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Se utilizó una distribución Binomial y un enlace Logit. El modelo logístico incluyó los efectos del bloque (n= 6), del Cu (Control vs. Cu3), de la forma de maduración (COC vs. DO + CC vs. DO) y la interacción (Cu por forma de maduración). Las variables binomiales están expresadas como porcentaje. Se consideraron efectos significativos a las  $p < 0,05$  y tendencias a las  $p < 0,10$  y  $p > 0,05$ . En el caso de la interacción se consideró significativa a la  $p < 0,10$ .

### V-d) Resultados

Rol de las CC durante la MIV de ovocitos bovinos en presencia de Cu sobre la capacidad de desarrollo posterior

En el Experimento 6, no se observó interacción entre la forma de maduración (COC, DO + CC y DO) y la disponibilidad de Cu (Control y Cu). La tasa de clivaje fue mayor cuando los ovocitos fueron madurados en presencia de células del cúmulus (COC o DO+CC) (COC=  $68,7 \pm 3,01\%$ ; COC Cu=  $72,8 \pm 3,01\%$ ; DO+CC=  $67,1 \pm 3,01\%$  y DO+CC Cu=  $70,79 \pm 3,01\%$ ), respecto a los ovocitos desnudos (DO=  $52,8 \pm 3,01\%$  y DO Cu=  $55,14 \pm 3,01\%$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 26 A).

El agregado de Cu al medio de maduración no tuvo ningún efecto sobre la tasa de clivaje de ovocitos madurados en presencia o ausencia de células del cúmulus (COC, DO + CC y DO) (Figura 26 A). Los COC alcanzaron el porcentaje más alto de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (COC= 22,2 ± 1,69% y COC Cu= 34 ± 1,69%; p < 0,01), los ovocitos desnudos en cocultivo con CC alcanzaron una tasa menor de blastocistos comparado con los madurados con cúmulus completo (DO+CC= 15,8 ± 1,69% y DO+CC Cu= 25,6 ± 1,69%; p < 0,01) mientras que, el porcentaje más bajo de blastocistos se obtuvo a partir de ovocitos desnudos (DO) (DO= 5,9 ± 1,69% y DO Cu= 12,7 ± 1,69%; p < 0,01) (Figura 26 B). Además, el agregado de Cu al medio de MIV aumentó significativamente la tasa de blastocistos obtenidos en presencia o ausencia del cúmulus (p < 0,01) (Figura 26 B).

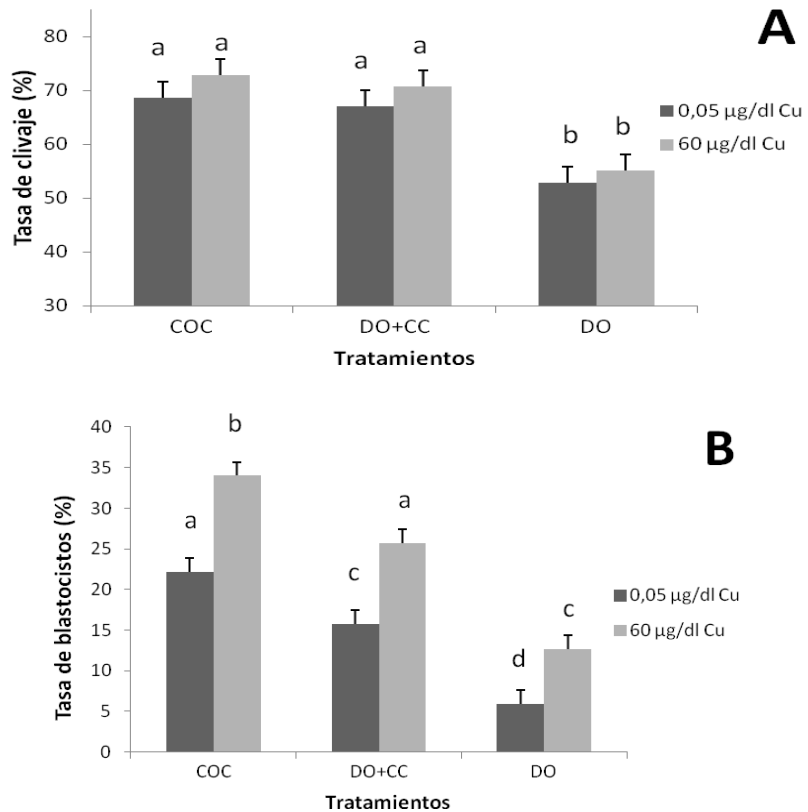


Figura 26. Efecto de la presencia o ausencia del cúmulus oophorus sobre el desarrollo posterior hasta el estadio de blastocisto de ovocitos bovinos madurados in vitro con y sin cobre.

**COC**= complejo ovocito cúmulus; **DO + CC**= ovocitos desnudos + monocapa de CC; **DO**= ovocitos desnudos.

(a, b, c y d), indican diferencias significativas (p < 0,01). Se maduraron un total de 1200 ovocitos repartidos en 4 repeticiones. En cada repetición se maduraron 100 COC (50 COC y 50 COC Cu); 100 DO (50 DO y 50 DO Cu) y 100 DO para cocultivo (50 DO + CC y 50 DO + CC Cu). Los datos se expresan como el promedio ± ESM.

## V-e) Discusión y Conclusiones del Capítulo

Dentro del folículo, el ovocito se encuentra rodeado por células de la granulosa que durante el proceso de foliculogénesis se diferencian en células murales y CC (Edson y col., 2009). Estas células se encuentran íntimamente relacionadas con el ovocito y están encargadas de proporcionarle nutrientes, factores involucrados en la maduración y un microambiente adecuado que asegure la adquisición de la capacidad de desarrollo posterior (Eppig, 1991; Gilchrist y col., 2008). Las CC, poseen uniones gap ubicadas en los extremos de los PTZ que las conectan al ovocito creando de esta manera un soporte metabólico del mismo, transportando moléculas de bajo peso molecular, iones y aminoácidos (Larsen y Wert, 1988; Larsen, 1989; Tanghe y col., 2002). Además, estas uniones participan en la regulación meiótica de los ovocitos al permitir el paso de pequeñas moléculas reguladoras, tales como AMPc y purinas (Dekel y Beers, 1980; Salustri y Siracusa, 1983; Eppig y Downs, 1984; Racowsky y Satterlie, 1985).

La interrupción prematura de esta comunicación altera la capacidad de desarrollo posterior del ovocito (Modina y col., 2001). La inhibición de las uniones gap afecta considerablemente la maduración citoplasmática de los ovocitos bovinos y por lo tanto, la tasa de blastocistos obtenidos *in vitro* (Ali y col., 2005). Esto es debido, probablemente, a la falta de transferencia de señales moleculares específicas que coordinan la maduración final de los mismos (Gilchrist y col., 2004, Lodde y col., 2007).

La tasa de blastocistos aumentó cuando la MIV se realizó en presencia de CC, alcanzando la tasa más alta aquellos ovocitos madurados con su cúmulus intacto (COC). Esto concuerda con lo descrito por diversos autores, quienes observaron que la eliminación de las CC antes de la MIV deteriora la maduración de los ovocitos en diferentes especies (Eppig, 1991; Grazul-Bilska y col., 1997; Tanghe y col., 2002; Gilchrist y col., 2004; Assidi y col., 2008) y que el cocultivo de los ovocitos desnudos, con complejos ovocito-cúmulus o con CC, restaura parcialmente el potencial de desarrollo de los ovocitos sin cúmulus (de Matos y col., 1997; Mori y col., 2000; Fatehi y col., 2002; Matzuk y col., 2002; Tanghe y col., 2002; Wongsrikeao y col., 2005). Esta mejoría podría explicarse por el tipo de comunicación que

existe entre las CC y el ovocito, la cual implica además de las uniones gap, la participación de diversos factores parácrinos de señalización (Gilchrist y col., 2004). La acción mejoradora de la presencia de estas células en ovocitos desnudos de bovino y de ratón se pone en evidencia a través de la producción de factores difusibles durante la maduración (Luciano y col., 2005; Ge y col., 2008).

El Cu dietario es principalmente absorbido en el intestino delgado (Hill y Link, 2009). En el ribete en cepillo de los enterocitos se ha identificado un transportador de Cu llamado CTR1 (Lönnerdal, 2008). El Cu pasa a la circulación sanguínea unido especialmente a albúmina, y secundariamente a transferrina, aminoácidos y proteínas específicas como la transcurreína (Løvstad, 2004; Liu y col., 2007). La captación celular de Cu se realiza por múltiples mecanismos, entre los que se encuentran: el transportador de Cu CTR1 y el transportador de cationes bivalentes 1 (DMT1) cuando el metal se encuentra en su estado reducido (Arredondo y Nuñez, 2005). Una vez incorporado a la célula, el Cu se une a proteínas citoplasmáticas, especialmente a la metalotioneína que lo almacena, o bien a chaperonas que lo conducen hacia diferentes vías metabólicas (Tapiero y Tew, 2003).

El agregado de Cu durante la MIV aumentó la producción de blastocistos posterior, independientemente de la presencia de CC, lo que indicaría la importancia de este mineral en el metabolismo del ovocito. El conocimiento acerca del mecanismo por el cual el Cu ingresa al COC es aun limitado, al igual que la información sobre los transportadores de este metal presentes en ovocitos y CC. El efecto beneficioso del Cu durante la MIV sobre el desarrollo embrionario posterior, tanto en presencia como en ausencia de las CC, sugiere la existencia de transportadores de Cu en el ovocito bovino.

En consecuencia, los resultados del presente estudio muestran que: 1) el agregado de Cu durante la MIV mejoró la tasa de blastocistos; 2) la producción de blastocistos fue mayor cuando los ovocitos se maduraron en presencia de células del cúmulus; 3) la tasa de blastocistos más alta se obtuvo a partir de los ovocitos madurados con el cúmulus intacto (COC); 4) los complejos ovocito-cúmulus madurados con Cu produjeron la mejor tasa de blastocistos. Estos resultados sugieren que el aumento en la tasa de desarrollo embrionario,

independientemente de la presencia de las CC, podría deberse a la existencia de transportadores de Cu en el ovocito bovino.

## Capítulo VI

### VI-a) Discusión General

Considerando que la deficiencia de Cu genera severas pérdidas productivas por su presentación subclínica, se han realizado permanentes esfuerzos por caracterizar estos riesgos. Es universalmente aceptado que el estatus de Cu en un animal puede evaluarse por sus niveles de cupremia, clasificados como normocupremia, hipocupremia moderada o hipocupremia severa. Es en este último rango donde los animales en crecimiento manifiestan menores ganancias de peso y comienzan las consecuencias inmunológicas por la deficiencia. Las consecuencias reproductivas no han sido caracterizadas, y si bien existen antecedentes que asocian el bajo estatus de Cu con fallas en la función reproductiva de la hembra, estos trabajos han sido mayoritariamente hechos en animales de laboratorio. Al evaluarse los resultados del Capítulo II de este trabajo de tesis, surge que el licor folicular mantiene valores de Cu similares a los del plasma, creando la posibilidad de que los ovocitos sufran consecuencias de la deficiencia, al igual que otras células durante los estadios de hipocupremia. Presumiblemente, estas consecuencias serían oxidativas, debido al rol central del Cu en las defensas antioxidantes. Esta posibilidad se evaluó sobre un modelo de producción in vitro de embriones bovinos, realizando el proceso de MIV sin el agregado de Cu al medio y en las concentraciones propias de los tres rangos de cupremia en evaluación.

Considerando que las células se defienden del desafío oxidativo con sistemas específicos de defensas, basados en mediadores que aportan poder reductor como ocurre con el glutatión, las concentraciones del mismo son indicativas de su consumo. En el presente trabajo los niveles de glutatión fueron significativamente inferiores en las CC y en los propios ovocitos madurados sin Cu o con 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , correspondiente al rango de hipocupremia severa. Siendo el estatus de Cu el único factor diferente entre grupos resulta evidente que se trata de un efecto de tratamiento. El glutatión es el principal antioxidante no enzimático del ovocito bovino y cuando es adicionado durante la MIV mejora el número

de células del blastocisto (Curnow y col., 2010). Del mismo modo, en el presente trabajo el número de células por blastocisto aumentó significativamente en los medios suplementados con 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de Cu (Capítulo III). La adición de otros minerales involucrados en las defensas antioxidantes, como Mn y Zn, durante la MIV también han mejorado la cantidad de glutatión en los ovocitos y la calidad de los embriones obtenidos (Picco y col., 2010; Anchordoquy y col., 2014).

La ausencia de defensas antioxidantes predispone al daño oxidativo y entre sus consecuencia más graves está la apoptosis celular (Takahashi, 2012). En el presente ensayo, los niveles de apoptosis celular aumentaron en la CC en todos los medios con niveles subnormales de Cu (0, 20 y 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) al compararlos con la MIV con niveles de normocupremia (60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). Este hallazgo coincide con el aumento de glutatión en los grupos más suplementados. Otros autores han demostrado que la incorporación de cisteína aumenta la síntesis de glutatión durante la MIV (Furnus y col., 2008). En el mismo sentido, la incorporación de cisteína redujo la incidencia de apoptosis en ovocitos y CC expuestos a estrés térmico (Nabenishi y col., 2012). La adición de antioxidantes al medio de MIV redujo la expresión del gen HSP70 en embriones bovinos, el cual se asocia a apoptosis celular (Park y col., 2014; Tatsuta y col., 2014).

Cuando el nivel de daño oxidativo se evaluó en el ADN de las CC por ensayo cometa, nuevamente se muestran más afectados los grupos sin Cu o con 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , con respecto a aquellos con 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , copiando el comportamiento de los niveles de glutatión. Ya ha sido demostrado en CC de humanos y en células de embriones bovinos de 3 días que el daño en el ADN evaluado por el ensayo cometa aumenta a consecuencia del estrés oxidativo (Takahashi y col., 2000; Sinkó y col., 2005).

Cuando se consideran en conjunto las tres variables anteriores: concentración de glutatión, apoptosis celular y ensayo cometa sobre CC, surge que todos ellos orientan sobre la existencia de daño oxidativo a medida que descienden las concentraciones de Cu en el medio de MIV, siendo la tasa de apoptosis el primero en verse afectado, ya en el rango de deficiencia moderada (40  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ).



Los parámetros evaluados durante el desarrollo embrionario tuvieron resultados variables. Por un lado el porcentaje de clivaje no varió entre los grupos, pero el resto fue mejorando con el estatus de Cu. Las tasas de blastocitos/ovocitos, blastocistos/clivados y el porcentaje de eclosión diferenciaron tres grupos, con el medio libre de Cu como el menos eficiente, las suplementaciones con 20 y 40  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en posición intermedia y el tratamiento con 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  como el mejor. En cambio, el número de células de los blastocistos diferenció estadísticamente dos grupos, con menor cantidad de células los tratamientos con 0 o 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  y con mayor cantidad aquellos con 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Analizados en conjunto los parámetros evaluados al octavo día de cultivo ratifican la necesidad de un estatus elevado de Cu para el desarrollo embrionario preimplantacional. Sin embargo, cada parámetro posee diferente sensibilidad. El número de células por blastocisto ratificó la diferenciación entre dos estatus, con 0 y 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$  por un lado y 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$  por otro, al igual que otros parámetros de la maduración como la concentración de glutatión o el daño del ADN por ensayo cometa. En cambio, las tres tasas embrionarias establecen la necesidad de un estatus mínimo de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , como ocurriera con la incidencia de apoptosis durante la maduración. Esta situación resulta alarmante si se extrapola al estatus de Cu en vacas de cría en producción. Por ejemplo, la incidencia histórica de hipocupremia en la Cuenca del Salado es superior al 50 % en vacas y más del 30% presenta hipocupremia severa (Ramírez y col., 1998). Si bajo estas mismas condiciones ocurrieran las maduraciones in vivo de los ovocitos y asumiéramos las consecuencias observadas en el presente trabajo, las fallas reproductivas podrían ser importantes, incluso peores a las esperadas por la deficiencia de Cu ya que los animales se encuentran en esta zona expuestos a otras deficiencias o factores que también afectan las defensas antioxidantes. Más allá de estas especulaciones, resulta evidente que los medios de MIV requieren de Cu y en concentraciones similares al plasma, de modo de evitar fallas o lesiones de tipo oxidativas.

## VI-b) Conclusiones finales

- ✓ El estatus de Cu en el plasma de las hembras condiciona el estatus de Cu del entorno folicular in vivo.

**Por lo tanto..**

**Con técnicas in vitro se podrían evaluar las posibles consecuencias reproductivas de estatus subnormales de Cu**

- ✓ El agregado de Cu al medio de maduración incrementó la concentración intracelular de GSH-GSSG en el ovocito y las CC.
- ✓ La tasa de apoptosis disminuyó en las CC de COC madurados in vitro con el agregado de 60 µg/dl Cu al medio de MIV.
- ✓ El agregado de Cu al medio de maduración disminuyó el daño en el ADN de las CC durante la MIV, evidenciando un efecto “protector” de este mineral contra el daño en dicha molécula.

**Por lo tanto..**

**El Cu podría actuar como un factor importante durante la maduración in vitro, mejorando el estatus antioxidante del COC bovino.**

- ✓ El agregado de Cu al medio de MIV incrementó la tasa de blastocistos
- ✓ La calidad de los embriones (expresada como blastómeras por embrión y tasa de eclosión) fue mejor cuando se agregó Cu al medio de MIV.

**Por lo tanto..**

**el aporte de Cu en concentraciones consideradas como “adecuadas” durante la maduración in vitro del ovocito, favorece el desarrollo embrionario temprano.**

- ✓ El agregado de Cu durante la MIV mejoró la tasa de blastocistos, independientemente de la presencia de CC
- ✓ La producción de blastocistos fue mayor cuando los ovocitos se maduraron en presencia de células del cúmulus
- ✓ La tasa de blastocistos más alta se obtuvo a partir de los ovocitos madurados con el cúmulus intacto (COC)

**Por lo tanto..**

**el aumento en la tasa de desarrollo embrionario, independientemente de la presencia de las CC, podría deberse a la existencia de transportadores de Cu en el ovocito bovino.**

## Bibliografía

1. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA, Davoodi D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. *Hum Reprod.* 2010; 25(4):977-85.
2. Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57(1):256-273.
3. Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim.* 2010a; 45(1):171-9.
4. Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod Domest Anim.* 2010b; 45(1):180-7.
5. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2005,3:28-49.
6. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and Sterility.* 2006; 86(3): 503-512.
7. Agnez-Lima LF, Melo JT, Silva AE, Oliveira AH, Timoteo AR, Lima-Bessa KM, Martinez GR, Medeiros MH, Di Mascio P, Galhardo RS, Menck CF. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res.* 2012; 751(1):15-28.

8. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 2001; 121(5):647-53.
9. Aleporou-Marinou V, Pappa H, Marinou H, Yalouris P, Patargias T. Presence of alpha1-antitrypsin and transferrin in human follicular fluid-correlation with fertilization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002; 133(1):105-11.
10. Al-Gubory KH, Bolifraud P, Germain G, Nicole A, Ceballos-Picot I. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reproduction* 2004; 128(6):767–74.
11. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(10):1634-50.
12. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 2003; 59(3-4):939-49.
13. Alleyne T, Joseph J, Lalla A, Sampson V, Adogwa A. Cytochrome-c oxidase isolated from the brain of swayback-diseased sheep displays unusual structure and uncharacteristic kinetics. *Mol Chem Neuropathol*. 1998; 34(2-3): 233-47.
14. Alvarez JG, Minaretzis D, Barrett CB, Mortola JF, Thompson IE. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 1996; 65(2):400-5.

15. Anchordoquy JM. Efecto del zinc sobre la maduración de los ovocitos de bovino y su impacto sobre la capacidad de desarrollo embrionario posterior. Tesis doctoral. Fac. Cs. Veterinarias, Univ. Nac. La Plata, Argentina. 2012.
16. Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Picco SJ, Sirini MA, Errecalde AL, Furnus CC. Influence of manganese on apoptosis and glutathione content of cumulus cells during in vitro maturation in bovine oocytes. *Cell Biol Int.* 2014; 38(2): 246-53.
17. Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C. Mouse primordial germ cells lacking  $\alpha_1$  integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development.* 1999; 126 (8):1655–1664.
18. Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, Matsui Y, Nagasawa T. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100(9):5319–5323.
19. Arredondo M, Núñez MT. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(4-5):313-27.
20. Arshad HM, Ahmad N, Zia-ur-Rahman, Samad HA, Akhtar N, Ali S. Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes. *Pakistan Vet. J.* 2005; 25(4)189- 193.
21. Ashworth CJ, Antipatis C. Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction.* 2001, 122(4): 527-535.

22. Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algriany O, Dielemann S, Sirard MA. Identification of Potential Markers of Oocyte Competence Expressed in Bovine Cumulus Cells Matured with Follicle-Stimulating Hormone and/or Phorbol Myristate Acetate In Vitro. *Biol Reprod.* 2008; 79(2): 209-22.
23. Arousseau B, Gruffat D, Durand D. Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reprod. Nutr. Dev.* 2006; 46(6):601–620.
24. Bagavandoss P, Midgley AR, Wicha M. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1983; 31(5):633-640.
25. Bagi Z, Toth E, Koller A, Kaley G. Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2):H626–33.
26. Balbuena, O., McDowell, L.R., Luciani, C.A., Conrad, J.H., Wilkinson, N. Y Martín, F.G. Estudios de la nutrición mineral de los bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina).3. Cobre, molibdeno y azufre. *Vet. Arg.* 1989-a; Vol VI, N°56: 365-374.
27. Balbuena, O.; McDowell, L.R.; Mahyew, I.G.; Toledo, O.H.; Luciani, C.A.; Stahringer, R.C.; Wilkinson, N.; Conrad, J.H. Ataxia enzoótica tardía en corderos. Contribución al conocimiento de su etiología en el Chaco (Argentina). *Vet. Arg.* 1989-b; Vol. VI, N° 52, 111-127.

28. Balemi SC, Grace ND, West DM, Smith SL, Knowles SO. Accumulation and depletion of liver copper stores in dairy cows challenged with a Cu-deficient diet and oral and injectable forms of Cu supplementation. *N Z Vet J.* 2010; 58(3):137-41.
29. Barry AN, Shinde U, Lutsenko S. Structural organization of human Cu-transporting ATPases: learning from building blocks. *J Biol Inorg Chem.* 2010; 15(1):47-59.
30. Beckers-Trapp ME, Lanoue L, Keen CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Abnormal development and increased 3-nitrotyrosine in copper-deficient mouse embryos. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(1):35-44.
31. Beckers-Trapp ME, Lanoue L, Keen CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Abnormal development and increased 3-nitrotyrosine in copper-deficient mouse embryos. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(1):35– 44.
32. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Cryopreservation of bovine semen decreases antioxidant defenses in spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1999. 60 (suppl 1): 102 Abstract.
33. Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr.* 2002; 87(5):393-403.
34. Borowczyk E, Johnson ML, Bilski JJ, Borowicz P, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. *Endocrine.* 2006; 30(2):223-30.
35. Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 1997; 109(1):165-71.



36. Brewer GJ. Copper lowering therapy with tetrathiomolybdate as an antiangiogenic strategy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005; 5(3):195-202.
37. Brunet S, Maro B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*. 2005; 130(6):801-11.
38. Buckley WT. A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 1991; 71:155-66.
39. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004; 2:20.
40. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2010; 15(4):186-190.
41. Cater MA, Mercer JFB. Copper in mammals: mechanisms of homeostasis and pathophysiology. *Topics in Current Genetics*, Vol. 14 M.J. Tamás, E. Martinoia (Eds.): *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification* DOI 10.1007/4735\_101 / Published online: 11 August 2005 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005
42. Cerone SI, Sansinanea AS, Auza NJ. Copper deficiency alters the immune response of bovine. *Nutr Res*. 1995; 15:1333-41.

43. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberg SA, García MC, Auza NJ. Cytochrome c-oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase and caeruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Element Res* 2000; 73(3):269–78.
44. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. *Veterinary Research Communications*, 1998; 22(1):47-57.
45. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update*. 1998; 4(2):103-120.
46. Chaderjian WB, Chin ET, Harris RJ, Etcheverry TM. Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed. *Biotechnol Prog* 2005; 21(2):550–3.
47. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(3-4): 323-33.
48. Chase CC, Kirby CJ, Hammond AC, Olson TA, Lucy MC. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone deficiency. *J Anim Sci*. 1998; 76(1):212–219.
49. Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2007; 148(8):3580-90.
50. Chen Y, Maret W. Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione. *Eur J Biochem* 2001; 268(11):3346–53.

51. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3):249–61.
52. Combelles CMH, Holick EA, Paoletta LJ, Walker DC and Wu Q. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. *Reproduction*. 2010; 139(5):871–881.
53. Correa Luna, M. y Lagos, F. Efectos del molibdeno y del cobre en la producción de bovinos para carne en los bajos submeridionales. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 1985; 4 (supl. 3): 99-101.
54. Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiating factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulated hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod*. 1998; 13:1292–1303.
55. Cousin RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 1985; 45(2):238-309.
56. Cunningham J, Leffell M, Mearkle P, Harmatz P. Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism* 1995; 44:996–9.
57. Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ES. Developmental potential of bovine oocytes following IVM in the presence of glutathione ethyl ester. *Reprod Fertil Dev*. 2010; 22(4):597-605.

58. Czerski L, Nuñez G. Apoptosome formation and Caspase activation: is it different in the heart ?. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37(3):643-652.
59. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril.* 2004; 82(5): 1443-5.
60. De Felici M, Scaldaferri ML, Farini D. Adhesion molecules for mouse primordial germ cells. *Front Biosci.* 2005 Jan 1; 10:542-51.
61. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1995; 42(4):432-6.
62. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(4):451–7.
63. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 1997; 57(6): 1420–1425.
64. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of  $\beta$  – mercaptoethanol, cystein and cystin. *Theriogenology.* 2000; 53(3):761-771.
65. de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo

- development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*. 2002; 57:1443-1451.
66. Dekel N, Beers W. Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev Biol*. 1980; 75(2):247-254.
67. DeLong, M. J. Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Ann. N Y Acad. Sci*. 1998; 842:82–90.
68. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(7):1289-301.
69. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of kit and kit ligand in ovarian function. *Rev Reprod*. 2000; 5(3):143–152.
70. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 2001; 55(6):1211–1239.
71. Dumollard R, Ward Z, Carroll J, Duchen MR. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*. 2007; 134(3):455-65.
72. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009; 30(6):624-712.
73. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516.

74. Entman SS, Maxson WS, Bradley CA, Osteen K, Webster BW, Vaughn WK, Wentz AC. Follicular fluid transferrin levels in preovulatory human follicles. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1987; 4(2):98-102.
75. Epperly MW, Sikora CA, DeFilippi SJ, Gretton JE, Zhan Q, Kufe DW, Greenberger JS. Manganese superoxide dismutase (SOD2) inhibits radiation-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial membrane. *Radiat. Res.* 2002; 157(5):568–577.
76. Eppig JJ, Downs SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 1984; 30(1):1-11.
77. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(5):2890-4.
78. Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod.* 2000; 63(4):1014–1023.
79. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 1991; 13(11):569–574.
80. Eppig JJ. The Relationship between Cumulus Cell Oocyte Coupling, Oocyte Meiotic Maturation, and Cumulus Expansion. *Dev Biol* 1982; 89(1) :268-272.
81. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrin Rev* 2002; 23(5):599 –622.

82. Evans JP, Robinson DN. The Spatial and Mechanical Challenges of Female Meiosis. *Mol Reprod Dev* 2011; 78(10-11):769-777.
83. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78(3-4):203–216.
84. Fair T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22(1):13-20.
85. Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod* 2004; 70(3):535-47.
86. Farini D, La Sala G, Tedesco M, De Felici M. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Dev Biol.* 2007; 306(2):572–583.
87. Fatehi AN, Zeinstra EC, Kooij RV, Colenbrander B, Bevers MM. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology.* 2002; 57(4):1347–1355.
88. Fazio LE, Caracterización de terneros de cría con hipocuprosis. Tesis doctoral. Fac. Cs. Veterinarias, Univ. Nac. La Plata, Argentina. 2006.
89. Fazio L, Mattioli G, Picco S, Relling A y Rosa D. Nutrición Mineral y Vitamínica de Bovinos. Editorial CCB Academic Press. La Plata, Argentina. 2014.
90. Fazio LE, Mattioli GA, Picco SJ, Rosa DE, Minatel L, Gimeno RJ. Diagnostic value of copper parameters to predict growth of suckling calves grazing native range in Argentina *Pesq. Vet. Bras.* 2010; 30(10):827-832.

91. Fell BF, Dinsdale D, Mills CF. Changes in enterocyte mitochondria associated with deficiency of copper in cattle. *Res Vet Sci.* 1975; 18(3):274-81.
92. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology.* 2009; 71(5):836-48.
93. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci.* 2011; 124(3-4):163-9.
94. Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P, Roche JF. Progesterone regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol. Reprod.* 2009; 81:784–794.
95. Fortune JE, Yang MY, Muruvi W. The earliest stages of follicular development: follicle formation and activation. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2010; 67:203-16.
96. Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem* 1999; 264(10):5598 – 605.
97. Fulka J Jr, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(1): 41-9.
98. Fulka J Jr, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1991; 29(4):379-84.



99. Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:76 –83.
100. Furnus CC, de Matos DG, Picco S, García PP, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 109(1-4):88 –99.
101. Gabrielli BG, Roy LM, Maller JL. Requirement of cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *Science*. 1993; 259(5102):1766-1769.
102. Gadea J, Gumbao D, Cánovas S, García-Vázquez FA, Grullón LA, Gardón JC. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione Int J improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Androl*. 2008; 31(1):40-9.
103. Gambling L, Andersen HS, McArdle HJ Iron and copper, and their interactions during development. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36(Pt 6):1258-61
104. Gambling L, McArdle HJ. Iron, copper and fetal development. *Proc Nutr Soc*. 2004; 63(4):553-62.
105. Gao G, Yi J, Zhang M, Xiong J, Geng L, Mu C, Yang L. Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, and apoptosis of blastocysts in vitro. *J Reprod Dev*. 2007; 53(4): 777-84.

106. Gao G, Yi J, Zhang M, Xiong J, Geng L, Mu Ch, Yang L. Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, apoptosis of blastocysts in vitro. *J Reprod Dev* 2007; 53:777– 84.
107. Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. *Biol Reprod*. 1994; 50:390-400.
108. Garrel C, Fowler PA, Al-Gubory KH. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J Endocrinol* 2010; 205(1):107–16.
109. Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in bovine granulosa cells. *Growth Factors*. 1993; 8(2):109–117.
110. Ge L, Han D, Lan GC, Zhou P, Liu Y, Zhang X, Sui HS, Tan JH. Factors affecting the in vitro action of cumulus cells on the maturing mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2008; 75(1):136-42.
111. Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW, Brown TT. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. *Journal of Animal Science*. 1997; 75(4):1112-18.

112. George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*. 2008; 69(5):612-23.
113. Gerard N, Loiseau S, Duchamp G, Seguin F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance. *Reproduction*. 2002; 124:241-248.
114. Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. In. *Vet*. 2006; (6):183-204.
115. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*. 2008; 14(2):159–177.
116. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82-83:431-46.
117. Glander HJ y Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5(2):109 – 115.
118. Godin I, Wylie C. TGF  $\beta$ 1 inhibits proliferation and has a chemostactic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development*. 1991; 113(4):1451-1457.
119. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med*. 1993; 15(1):69-75.
120. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells

- and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum. Reprod.* 1998; 13(6): 1638-1644.
121. Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L262–8.
  122. Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod* 1997; 57(5):947–957.
  123. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001; 7(2):175-89.
  124. Guérin P, Guillaud J, Ménézo Y. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. *Hum Reprod.* 1995; 10(4):866-72.
  125. Gupta SK, Bhandari B. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl.* 2011; 13(1): 97-105.
  126. Gybina AA, Prohaska JR. Augmented cerebellar lactate in copper deficient rat pups originates from both blood and cerebellum. *Metab Brain Dis.* 2009; 24(2):299-310.
  127. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd edn. Oxford, Oxford University Press, 1989.
  128. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997; 414 (3):552-556.

129. Han H, Archibeque SL, Engle TE. Characterization and identification of hepatic mRNA related to copper metabolism and homeostasis in cattle. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 129(1-3):130-6.
130. Han SJ, Conti M. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle.* 2006; 5(3):227-31.
131. Hansen SL, Schlegel P, Legleiter LR, Lloyd KE, Spears JW. Bioavailability of copper from copper glycinate in steers fed high dietary sulfur and molybdenum. *J Anim Sci.* 2008; 86(1):173-9.
132. Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2000; 20:291-310.
133. Hartshorne GM. In vitro culture of ovarian follicles. *Rev Reprod.* 1997; 2(2):94-104.
134. Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod.* 2002; 66(6):1696-701.
135. Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1998; 49(8):1451-1463.
136. Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J Reprod Dev.* 2009; 55(1):1 - 10.

137. Hawk SN, Lanoue L, Keen CL, Kwik-Urbe CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Copper-deficient rat embryos are characterized by low superoxide dismutase activity and elevated superoxide anions. *Biol Reprod.* 2003; 68(3):896-903.
138. Hawk SN, Uriu-Hare JY, Daston GP, Jankowski MA, Kwik-Urbe C, Rucker RB, Keen CL. Rat embryos cultured under copper-deficient conditions develop abnormally and are characterized by an impaired oxidant defense system. *Teratology.* 1998; 57(6):310-20.
139. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm.* 2007; 114(6):777-81.
140. Hendricks KE, Hansen PJ. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. *Aust Vet J.* 2010; 88(8):307-10.
141. Herbert M, Levasseur M, Homer H, Yallop K, Murdoch A, McDougall A. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biology.* 2003; 5(11):1023–1025.
142. Hilario MO, Amancio OM, dos Santos BR, Naspitz CK. Effects of nutritional copper deficiency on adult non-pregnant and pregnant rats and their newborns. *Arch Latinoam Nutr.* 1991; 41(4):555-68.
143. Hill GM, Link JE. Transporters in the absorption and utilization of zinc and copper. *J Anim Sci.* 2009; 87(14 Suppl):E85-9.
144. Hill JL, Wade MG, Nancarrow CD, Kelleher DL, Boland MP. Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and ovine oestrus-associated glycoprotein on

- development and viability of bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47(2):164-169.
145. Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod.* 1991; 44(6):1157–1162.
146. Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(10):7114-62.
147. Hoogeveen RC, Reaves SK, Reid PM, Reid BL, Lei KY. Copper deficiency shifts energy substrate utilization from carbohydrate to fat and reduces fat mass in rats. *J Nutr.* 1994; 124(9):1660-6.
148. Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2002; 77:511–515.
149. Hughes FJ, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology.* 1991; 129:2415–2422.
150. Hunter AG, Moor RM. Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci.* 1987; 70(8):1646-51.
151. Igarza L, Agostini M, Becuvillalobos D, Auza N. Effects of molibdenosis on luteinizing-hormone, follicle-stimulating and estradiol hormones in rats. *Arch Vet* 1996; 28:101-6.

152. Ikeda S, Imai H, Yamada M. Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction* 2003; 125(3):369-76.
153. Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikanthakumar A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. *J Dairy Sci.* 1987; 70(1):167-80.
154. Jenkins KJ, Hidioglou M. Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. *J Dairy Sci.* 1989; 72(1):150-6.
155. Jiménez I, Speisky H. Effects of copper ions on the free radical scavenging properties of reduced glutathione: implications of a complex formation. *J Trace Elem Med Biol* 2000; 14(3):161–7.
156. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature.* 2004; 428(6979):145–150.
157. Johnson WT, Thomas AC. Copper deprivation potentiates oxidative stress in HL-60 cell mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221(2):147–52.
158. Kambe T, Weaver BP, Andrews GK. The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis* 2008; 46(4):214 –28.
159. Kang YJ. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.* 2011; 129(3):321-31.
160. Kappel LC, Ingraham RH, Morgan EB, Babcock DK. Plasma copper concentration and packed cell volume and their relationships to fertility and milk production in Holstein cows. *Am J Vet Res.* 1984; 45(2):346-50.



161. Kasprzak K. Oxidative DNA damage in metal-induced carcinogenesis. In: Chang LW, editor. *Toxicology of Metals 2002*. CRC Press Inc, Boca Raton FL, 2002, pp. 299–320.
162. Keen CL, Jant Y, Uriu-Hare, Hawk SN, Jankowaski MA, Daston GP, Catherine L, Kwik-Urbe, Rucker RB (1998). Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *An. J. Clin. Nutr.* 67(5suppl):1003s-1011s.
163. Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci.* 1998; 18(2):687-97.
164. Kendall NR, Marsters P, Guo L, Scaramuzzi RJ, Campbell BK. Effect of copper and thiomolybdates on bovine theca cell differentiation in vitro. *J Endocrinol.* 2006; 189(3):455-63.
165. Kendall NR, Marsters P, Scaramuzzi RJ, Campbell BK. Expression of lysyl oxidase and effect of copper chloride and ammonium tetrathiomolybdate on bovine ovarian follicle granulosa cells cultured in serum-free media. *Reproduction.* 2003; 125(5):657-65.
166. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 26(4):239–257.

167. Kim SK, Minami N, Yamada M, Utsumi K. Functional role of cumulus cells during maturation in development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1996; 45:278.
168. Kimura F, Bonomi LM, Schneyer AL. Follistatin regulates germ cell nest breakdown and primordial follicle formation. *Endocrinology*. 2011; 152(2):697-706.
169. Kincaid RL. Assessment of trace mineral status of ruminants: a review. *Proc Am Soc Anim Sci*. 1999;1–10.
170. Kleczkowski M, Kluciński W, Sikora J, Zdanowicz M. Role of antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--trace elements and enzymatic mechanisms (Part 3). *Pol J Vet Sci*. 2004; 7(3):233-40.
171. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*. 1998; 49(1):103-114.
172. Krzymowski T, Stefańczyk-Krzybowska S. The role of the endometrium in endocrine regulation of the animal oestrous cycle. *Reprod Domest Anim*. 2008; 43(1):80-91.
173. La Fontaine S, Leigh Ackland M, Mercer JFB. Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B: Emerging roles *Int J of Biochem Cell Biol* 2010; 42(2):206 –9.
174. Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ, Retel J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against single oxygen. *Free radical Res*. 1994; 21(1):9 - 17.

175. Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval IV. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci.* 2009; 14:4878-903.
176. Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003; 68(4):1157–64.
177. Larsen WJ, Wert SE. Role of cell junctions in gametogenesis and in early embryonic development. *Tissue & Cell* 1988; 20(6):809-848.
178. Larsen WJ. Mechanisms of gap junction modulation. En: Sperelakis N, Cole WC *Cell Interactions and Gap Junctions*. Vol. I. Boca Raton, FL, CRC Press; 1989, p. 3-27.
179. Laven RA, Livesey CT. An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood. *Vet J.* 2006; 171(2):295-300.
180. Ledan E, Polanski Z, Terret M-E, Maro B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology* 2001; 232:400–413.
181. Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(12):6842-7.
182. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cell apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18(9):490–8.

183. Leigh LC. Changes in the ultrastructure of cardiac muscle in steers deprived of copper. *Res Vet Sci.* 1975; 18(3):282-7.
184. Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol.* 2007; 21(9):2037-55.
185. Lim KT, Jang G, Ko KH, Lee WW, Park HJ, Kim JJ, Kang SK, Lee BC. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Anim Reprod Sci.* 2008; 103(3-4):239-48.
186. Liu N, Lo LS, Askary SH, Jones L, Kidane TZ, Trang T, Nguyen M, Goforth J, Chu YH, Vivas E, Tsai M, Westbrook T, Linder MC. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(9):597-608.
187. Lodde V, Modina S, Galbusera C, Franciosi F, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Molecular Reproduction and Development* 2007; 74:740–749.
188. Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev.* 2003; 66(3):297-305.
189. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1994; 37:48-53.

190. Lönnerdal B. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(3):846S-50S.
191. Løvstad RA. A kinetic study on the distribution of Cu(II)-ions between albumin and transferrin. *Biometals.* 2004; 17(2):111-3.
192. Lowndes SA, Sheldon HV, Cai S, Taylor JM, Harris AL. Copper chelator ATN-224 inhibits endothelial function by multiple mechanisms. *Microvasc Res.* 2009; 77(3):314-26.
193. Lu KH, Gordon I, Chen HB, McGovern H. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *Proceedings of the Third Scientific Meeting of the European Embryo Transfer association, 1987, p 70, Lyon, France.*
194. Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol.* 2005; 5(1):5-17.
195. Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modena S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71(3):389-97.
196. Luciano AM, Modena S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT. Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor *Biology of Reproduction.* 2000; 63:1580– 1585

197. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci.* 1992; 70(11):3615-26.
198. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev.* 2007; 87(3):1011-46.
199. Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 2007-b; 463(2):134-48.
200. Maas J. (1987). Relationship between nutrition and reproduction in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1987; 3(3):633-46.
201. Madison V, Avery B, Greve T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 27:1-11.
202. Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod.* 2002; 67:1197–1203.
203. Marangos P, Carroll J. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction.* 2004; 128(2):153-62.
204. Martin HL, Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2009; 23(10):3263-72.
205. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity.* 2005; 22(3): 355-370.

206. Mattson BA, Albertini DF. Oogenesis: Chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev.* 1990; 25(4):374-384.
207. Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science.* 2002; 296(5576): 2178–2180.
208. McDowell LR. Mineral in Animal and Human Nutrition. Academic Press, NY, USA; 1992.
209. Medeiros DM, Jennings D. Role of copper in mitochondrial biogenesis via interaction with ATP synthase and cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr.* 2002; 34(5):389-95.
210. Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(5):2266-76.
211. Menino AR Jr, Damron WS, Henry TE, O'Claray JL. The influence of dietary copper on reproduction, growth and the cardiovascular system in Swiss-Webster female mice. *Lab Anim Sci.* 1986 Apr; 36(2):164-7.
212. Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem.* 2001; 276(39):36857-61.
213. Mills, C.F. (1983). The physiological and pathological basis of trace element deficiency disease: Trace elements in animal production and veterinary practice. Suttle, N.F.; Gunn, R.G.; Allen, W.M.; Linklater, K.A. Wiener, G. (Eds). 1.1: 1-10

214. Minatel L, Carfagnini JC. Evaluation of the diagnostic value of plasma copper levels in cattle. *Prev Vet Med.* 2002; 53(1-2):1-5.
215. Minervino AH, Barrêto Júnior RA, Queiroz GF, Headley SA, Ortolani EL. Predictive values of aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase for the hepatic accumulation of copper in cattle and buffalo. *J Vet Diagn Invest.* 2008; 20(6):791-5.
216. Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Arch Anim Nutr.* 2010; 64(2):98-110.
217. Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MPB, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, Matsui M, Acosta TJ. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic Animal Endocrinology.* 2005; 29(2): 329–339.
218. Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology.* 1995; 43(1):282.
219. Modina S, Luciano AM, Vassena R, Baraldi-Scesi L, Lauria A, Gandolfi F. Oocyte developmental competence after in vitro maturation depends on the persistence of cumulus–oocyte communications which are linked to the intracellular concentration of cAMP. *Italian Journal of Anatomy and Embryology.* 2001; 106: 241–248.



220. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R.. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 2003; 130(18):4279–4286.
221. Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *J Reprod Dev*. 2010; 56(6):559-66.
222. Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update*. 1998; 4(3):223-236.
223. Moor RM, Smith MW, Dawson MC. Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp Cell Res* 1980; 126(1):15-29.
224. Mori T, Amano T, Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biol Reprod*. 2000; 62(4):913–919.
225. Motta AB, Estevez A, Franchi A, Perez-Martinez S, Farina M, Ribeiro ML, Lasserre A, Gimeno MF.Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF2a during luteal regression in rats. *Reproduction*. 2001; 121(4):631–637.
226. Mullis LA, Spears JW, McCraw BL. Effects of breed (Angus vs Simmental) and copper and zinc source on mineral status of steers fed high dietary iron. *J Anim Sci*. 2003; 81(1):318-22
227. Nabenishi H, Ohta H, Nishimoto T, Morita T, Ashizawa K, Tsuzuki Y. The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence,

- ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*. 2012; 20(3):249-59.
228. Nagao Y1, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology*. 1994; 41(3):681-7.
229. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Sakai N, Tezuka N, Hiroi M and Watanabe H. Incidence of apoptotic bodies in membrane granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*. 1997b; 67:302–308
230. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T and Hiroi M. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertility and Sterility*. 1997a; 68:312–317
231. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev*. 1991; 28(4):356-60.
232. Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. 2004, 23 (16):2797 - 2808.
233. Nose Y, Wood LK, Kim BE, Prohaska JR, Fry RS, Spears JW, Thiele DJ. Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability. *J Biol Chem*. 2010; 285(42):32385-92.

234. NRC - National Research Council, Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001.
235. Nurse O. Universal control of mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 1990; 334(6266):503-508.
236. Oktem O, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2008. 1127, 20–26.
237. Okuda K, Miyamoto Y, Skarzynski DJ. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest Anim Endocrinol*. 2002; 23(1-2):255-64.
238. Olive PL, Durand RE, Jackson SM, Le Riche JC, Luo C, Ma R, McLaren DB, Aquino-Parsons C, Thomson TA, Trotter T. The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol* 1999; 38(7):839 –44.
239. Olive PL, Durand RE, Le Riche J, Olivotto IA, Jackson SM. Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res*. 1993; 53(4):733–736.
240. Olson SE, Seidel GE Jr. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod*. 2000; 62(2):248-52.
241. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2004; 71(6):1828 – 1837.

242. Pal DT, Gowda NK, Prasad CS, Amarnath R, Bharadwaj U, Suresh Babu G, Sampath KT. Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. *Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(2):89-94.
243. Palma G. 2001. Producción in vitro de embriones bovinos. En: Palma G. *Biología de la reproducción*. Balcarce, Argentina: Ed. Reprobiofec. P 257-259.
244. Pan YJ, Loo G. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:824 –30.
245. Park SH, Cho HS, Yu IJ. Effect of bovine follicular fluid on reactive oxygen species and glutathione in oocytes, apoptosis and apoptosis-related gene expression of in vitro-produced blastocysts. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49(3):370-7.
246. Parrish JJ, Parrish JL, First NL. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1984; 32(1): 112.
247. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1986; 38(5):1171 - 1180.
248. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 2003; 333(1): 19–39.
249. Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development.* 1998; 125(17):3323-3328.

250. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol.* 1988; 125 (1): 181-6 (Abstract).
251. Perry AC, Verlhac MH. Second meiotic arrest and exit in frogs and mice. *EMBO Rep.* 2008; 9(3):246-51.
252. Petrak J, Vyoral D. Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(6):1173-8.
253. Picco SJ, Abba MC, Mattioli GA, Fazio LE, Rosa D, De Luca JC, Dulout FN. Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. *Mutagenesis* 2004; 19:453– 6.
254. Picco SJ, Anchordoquy JM, de Matos DG, Anchordoquy JP, Seoane A, Mattioli GA, Errecalde AL, Furnus CC. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology.* 2010; 74(7):1141-8.
255. Poul JM, Huet S, Godard T, Sanders P. Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42(2):209–215.
256. Prakash M, Upadhya S, Prabhu R. Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uremia. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64(6):599 –604.
257. Prather RS, Robl JM. Cloning by Nuclear Transfer and Embryo Splitting in Laboratory and Domestic Animals, *Animal Applications of Research in Mammalian Development.* 1991; 4:205-232.

258. Prohaska JR, Wells WW. Copper deficiency in the developing rat brain: evidence for abnormal mitochondria. *J Neurochem.* 1975; 25(3):221-8.
259. Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(3):826S-9S.
260. Quinn P, Lydic ML, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody SA. Confirmation of the  
261. Fertil Steril. 1998; 69(3):399-402.
262. Racowsky C, Satterlie RA. Metabolic, fluorescent dye and electrical coupling between hamster oocytes and cumulus cells during meiotic maturation in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 1985; 108(1):191-202.
263. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288:481-7.
264. Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol 1. Academic Press, USA, 2006, p. 383-424.
265. Ramírez CE, Mattioli GA, Tittarelli CM, Giuliadori MJ, Yano H. Cattle hypocuprosis in Argentina associated with periodically flooded soils. *Livestock Production Science* 1998; 55: 47-52.
266. Ramírez, C.E., Tittarelli, C.M., Mattioli, G.A., Giuliadori, M.J. y Puchuri, M.C. Hipocupremia bovina en 5 partidos de la provincia de Buenos Aires. Argentina. 1997; *Vet. Arg.* Vol. XIV. N° 131: 12-17.

267. Rana SVS. Metals and apoptosis: Recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2008; 22:262 – 284.
268. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5):981-90.
269. Reeves PG, DeMars LC. Copper deficiency reduces iron absorption and biological half-life in male rats. *J Nutr*. 2004; 134(8):1953-7.
270. Ricciardino, M.Z., Medus, P.D., Gomez, M. y Rucksan, B.E. Deficiencia de cobre y selenio en vaquillonas sobre pastura natural. 1. Causas y efectos inherentes a la pastura. INTA EEA C. del Uruguay. *Prod. Anim*. 1991-a; IT N°3: 213-221.
271. Ricciardino, M.Z.; Medus, P.D.; Tantin, H. Deficiencia de cobre y selenio en vaquillonas sobre pasto natural. 1. Efectos sobre la ganancia de peso y parámetros bioquímicos. INTA EEA C. Del Uruguay. *Prod. Anim*. 1991-b; IT N° 3: 222-229.
272. Roberts EA, Sarkar B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88(3):851S-4S.
273. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod*. 2010; 82(6):1021-9.
274. Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ, Imthurn B. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod*. 1996; 2(8):607-12.

275. Roychoudhury S, Bulla J, Sirotkin AV, Kolesarova A. In vitro changes in porcine ovarian granulosa cells induced by copper. *J Environm Sci Health*. 2014; 49(6): 625-633.
276. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, Keen CL. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(5 Suppl):996S-1002S.
277. Rutter B, Russo AF. *Fundamentos de la Fisiología de la Gestación y el Parto de los Animales Domésticos*. Buenos Aires, Argentina. Ed Eudeba. ISBN : 9502312473. P 247. 2002
278. Salustri A, Siracusa G. Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured in vitro in the presence of FSH or dcAMP, or stimulated in vivo by hCG. *J. Reprod. Fertil*. 1983; 68:335-341.
279. Sarkar A, Dash S, Barik BK, Muttigi MS, Kedage V, Shetty JK, Prakash M. Copper and ceruloplasmin levels in relation to total thiols and GST in type 2 diabetes mellitus patients. *Ind J Clin Biochem* 2010; 25(1):74 –6.
280. Schrantz N, Blanchard DA, Mitenne F, Auffredou MT, Vazquez A, Leca G. Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by Bcl-2. *Cell Death and Differentiation*. 1999; 6(5):445 – 453.
281. Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*. 1988; 30(3):489-496.



282. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10):916–21.
283. Simon M, Jílek F, Fulka J Jr. Effect of cycloheximide upon maturation of bovine oocytes. *Reprod Nutr Dev*. 1989; 29(5):533-40.
284. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1):184 - 191.
285. Sinkó I, Mórocz M, Zádori J, Kokavszky K, Raskó I. Effect of cigarette smoking on DNA damage of human cumulus cells analyzed by comet assay. *Reprod Toxicol*. 2005; 20(1):65-71.
286. Skarzynski DJ, Jaroszewski JJ, Okuda K. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 2005; 29(2):340–346.
287. Smitz JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 2002; 123(2):185–202.
288. Solc P, Schultz RM, Motlik J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16(9):654-64.
289. Soltan MH, Jenkins DM. (1983). Plasma copper and zinc concentrations and infertility. *Br J Obstet Gynaecol*. 1983; 90(5):457-9.
290. Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E. Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr*. 2009; 139(9):1626 -1631.

291. Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr.* 2003; 133(5 Suppl 1):1506S-9S.
292. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 2003; 25(3-4):207-18.
293. Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life.* 2012; 64(5):362-9.
294. Stiburek L, Hansikova H, Tesarova M, Cerna L, Zeman J. Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res.* 2006; 55 Suppl 2:S27-41.
295. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64:904–909.
296. Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and Fertilization. *Reproduction.* 2006; 131(2):193–205.
297. Suttle NF. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec* 1986; 119(7):148-152.
298. Suttle, N. F. (1983). The nutritional basis for trace element deficiencies in ruminant livestock. In *Trace elements in animal productions and veterinary practice*. Occ. publication N° 7 - British Society of Animal Production. Edit: Suttle, N. F., Gunn, R. G., Allen, W. M., Linklater, K. A. and Wiener G. 2.1: 19-25.

299. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003; 9(1):35-48.
300. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1410(2):103-23.
301. Tajima K, Orisaka M, Yata H, Goto K, Hosokawa K, Kotsuji F. Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation. *Microsc Res Tech*. 2006; 69(6):450-8.
302. Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*. 2000; 54(1):137-45.
303. Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod*. 1993; 49(2): 228-232.
304. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of Mammalian embryos. *J Reprod Dev*. 2012; 58(1):1-9.
305. Takahashi Y, Kako K, Kashiwabara S, Takehara A, Inada Y, Arai H, Nakada K, Kodama H, Hayashi J, Baba T, Munekata E. Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome C oxidase and embryonic development. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(21):7614-21.

306. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev.* 2002; 61(3):414–424.
307. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(9):399-411.
308. Tatsuta T, Hosono M, Ogawa Y, Inage K, Sugawara S, Nitta K. Downregulation of Hsp70 inhibits apoptosis induced by sialic acid-binding lectin (lectzyme). *Oncol Rep.* 2014; 31(1):13-8.
309. Tchapanian EH, Uriu-Adams JY, Keen CL, Mitchell AE, Rucker RB. Lysyl oxidase and P-ATPase-7A expression during embryonic development in the rat. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 379(1):71-7.
310. Terret ME, Wassmann K, Waizenegger I, Maro B, Peters JM, Verlhac MH. The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. *Current Biology.* 2003; 13(20):1797–1802.
311. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful cultura in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil.* 1972; 30(3):493 - 497.
312. Tessaro I, Luciano AM, Franciosi F, Lodde V, Corbani D, Modina SC. The endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low mid-antral follicle count ovaries. *J Anim Sci.* 2011; 89(8):2389-96.

313. Tiboni GM, Giampietro F, Di Giulio C. The nitric oxide synthesis inhibitor N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes limb defects in mouse fetuses: protective effect of acute hyperoxia. *Pediatr Res* 2003; 54:69–76.
314. Tice RR, Strauss GH. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*. 1995; Suppl 1:207 – 214.
315. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh A. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*. 1991; 129(5): 2799–2801.
316. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15(12):795-803.
317. Torre PM, Harmon RJ, Sordillo LM, Boissonneault GA, Hemken RW, Trammell DS, Clark TW. (1995). Modulation of bovine mononuclear cell proliferation and cytokine production by dietary copper insufficiency. *J Nutr Immunol*. 3:3-20.
318. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*. 2000; 62(6):1866-74.
319. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121(1):51-75.
320. Turnlund JR, Keyes WR, Kim SK, Domek JM. Long-term high copper intake: effects on copper absorption, retention, and homeostasis in men. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(4):822-8.

321. Turski ML, Thiele DJ. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J Biol Chem.* 2009; 284(2):717-21.
322. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(suppl.): 952S–9S.
323. Underwood EJ, Suttle NF. *The Mineral Nutrition of Livestock.* CABI Publishing. London. UK; 1999.
324. Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(4-5):268-98.
325. Uriu-Adams JY, Scherr RE, Lanoue L, Keen CL. Influence of copper on early development: prenatal and postnatal considerations. *Biofactors.* 2010; 36(2):136-52.
326. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
327. Van Blerkom J, Davis PW. Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Tech.* 1994; 27(2):165-93.
328. van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 2005; 63(6):1717-51.
329. Wang JYJ. DNA damage and apoptosis. *Cell Death and Differentiation.* 2001, 8(11):1047 – 1048.

330. Ward JD, Gengelbach GP, Spears JW. The effects of copper deficiency with or without high dietary iron or molybdenum on immune function of cattle. *J Anim Sci.* 1997; 75(5):1400-8.
331. Watanabe N, Hunt T, Ikawa Y, Sagata. Independent inactivation of MPF and cytostatic factor (MOS) upon fertilization on *Xenopus* eggs. *Nature.* 1991; 352(6332):247-249.
332. Weiss KH, Lozoya JC, Tuma S, Gotthardt D, Reichert J, Eehalt R, Stremmel W, Füllekrug J. Copper-induced translocation of the Wilson disease protein ATP7B independent of Murr1/COMMD1 and Rab7. *Am J Pathol.* 2008; 173(6):1783-94.
333. White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K, Petris MJ. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem.* 2009; 284(49):33949-56.
334. Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase. Characteristic in growing mouse oocytes. *Dev Biol.* 1991; 143(1):162-172.
335. Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL, Schutzkus VR. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *J Dairy Sci.* 2005; 88(2):776-82.
336. Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Ooki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M, Otoi T. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2005; 40(2):166–170.

337. Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*. 2007; 68 Suppl 1: S77-83.
338. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*. 1998; 13(4):998-1002.
339. Yang MY, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod*. 2008; 78(6):1153-61.
340. Yang SJ, Keen CL, Lanoue L, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Low nitric oxide: a key factor underlying copper-deficiency teratogenicity. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(12):1639-48.
341. Yang SJ, Keen CL, Lanoue L, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Low nitric oxide: a key factor underlying copper-deficiency teratogenicity. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(12):1639-48.
342. Yang SJ, Uriu-Adams JY, Keen CL, Rucker RB, Lanoue L. Effects of copper deficiency on mouse yolk sac vasculature and expression of angiogenic mediators. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2006; 77(5):445-54.
343. Yokoyama I, Negita M, Liu DG, Nagasaka T, Kobayashi T, Hayakawa A, Hayashi S, Nakao A. Prevention of free-radical induced apoptosis by induction of human recombinant Cu, Zn-SOD in pig endothelial cells. *Transpl. Int*. 2002; 15(5):220-225.
344. Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocyte in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1992; 31(1): 68-71.



345. Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1993; 35(1):76-81.
346. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010; 140(4):489-504.
347. Zeleznik AJ. Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. *Endocrinology.* 1981; 2:352 - 355.
348. Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod.* 2001; 65(3):967-977.
349. Zhou XL, Al Naib A, Sun DW, Lonergan P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology.* 2010; 61(1):66-72.
350. Zhuang S, Simon G. Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C341-51.
351. Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biology of Reproduction.* 1997; 57(6):1413-1420.

## Anexos

### 7.1 Medios y soluciones

#### 7.1.1 Soluciones Stock para la preparación de medios de cultivo

##### Stock H (250 mM HEPES)

Hepes ácido	15,00 g
Hepes sódico	16,25 g
Rojo fenol	50 mg
Agua destilada	500 ml
pH	7,4 – 7,5
Osmolaridad	384 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada 30 días.	

##### Stock 2 X TCM199

Disolver 1 sobre de TCM199 (Medio de cultivo 199) en 500 ml de H <sub>2</sub> O destilada para obtener una solución 2X y agregar:	
Sulfato de kanamicina	50 mg
Penicilina G	59 mg
Estreptomicina	100 mg
Rojo fenol	20 mg
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

## Stock S2

NaCl	6,294 g
KCl	0,534 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,162 g
Penicilina	0,060 g
Estreptomina	0,050 g
Agua destilada	100 ml
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

## Stock TL 10X

NaCl	6,662 g
KCl	0,238 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,062 g
Penicilina	0,060 g
Agua destilada	100 ml
Osmolaridad (Solución 1X)	235 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

## Stock 10 X

NaCl	4,675 g
KCl	0,230 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,045 g
Penicilina	0,060 g
Hepes ácido	1,192 g
Hepes sódico	1,302 g
Lactato de sodio	3,680 ml
Agua destilada	100 ml
pH	7,3
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

#### Stock de Heparina (10 mg/ml de Heparina)

Heparina (sulfato)	20 mg
Solución salina (0,9%) estéril	2 ml
No filtrar y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

#### Stock de Hipotaurina

Hipotaurina	2,182 g
Agua destilada	10 ml
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

## SPAD 100 X

Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	0,3080 g
ClMg.7H <sub>2</sub> O (Solución 4M)	0,0915 µl
Agua destilada	10 ml
Osmolaridad (Solución 50X)	369,15 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

## H-199 (Hepes-199: TCM 199 con 15 mM de HEPES y 5 mM de Bicarbonato de sodio)

2 X TCM199	300 ml
Hepes ácido	1,44 g
Hepes sódico	1,56 g
Bicarbonato de sodio	0,25 g
Agua destilada	600 ml
Osmolaridad	280 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana	

## Bi-199 (Bicarbonato 199: TCM 199 con bicarbonato)

2X TCM199	50 ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,2101 g
Piruvato de sodio	2,16 mg
Agua destilada	100 ml

Osmolaridad ajustar a 280 mOsm con agua ultrapura.
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.

Stock sulfato de Manganeso ( $\text{CuSO}_4$ )

Solución Trabajo:

Estándar de Cu 1000 ppm Merck, Japón Cat. 25824-2B 10 $\mu$ l	
Agua 9,99 ml	destilada

Agregar 10 $\mu$ l, 20 $\mu$ l y 30 $\mu$ l de la solución Trabajo a 5 ml del medio de maduración para obtener una concentración final de 2  $\mu$ g/ml; 4  $\mu$ g/ml y 6  $\mu$ g/ml de Cu respectivamente.

### 7.1.2 Medios de cultivo

Solución Fisiológica para el mantenimiento de los ovarios

NaCl	9 g
Penicilina	59 mg
Estreptomicina	100 mg
Kanamicina	50 mg
Agua destilada	1000 ml
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C	

## Medio de aspiración de ovocitos

PBS (Solución buffer fosfato)	100 ml
Stock de heparina	0,5 ml
SFB (Suero Fetal Bovino)	1 ml
Penicilina	5,9 mg
Estreptomicina	10 mg
Kanamicina	5 mg
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

## Medio de mantenimiento de ovocitos

SFB (Suero Fetal Bovino)	10 ml
H-199	90 ml
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

## Medio para lavado de las gametas (HEPES-TALP)

10 X TL	10 ml
NaHCO <sub>3</sub>	6,8 mg
Stock H	6 ml
CaCl <sub>2</sub>	30 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (4M)	12,3 $\mu$ l
Lactato de sodio	141 $\mu$ l

Piruvato de sodio	88 mg
MEM-neaas (aminoácidos no esenciales)	1 ml
BME-eaas (aminoácidos esenciales)	2 ml
ASB-FAF (Albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos)	300 mg
Agua destilada	100 ml
Osmolaridad	270-290 mOsm
pH	7,4
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada 2 semanas.	

#### Medio para lavado de embriones (HEPES-SOF)

Stock S2	11 ml
NaHCO <sub>3</sub>	16,8 mg
Stock H	6 ml
Piruvato de sodio	3,6 mg
Cl <sub>2</sub> Ca	25,2 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 mg
Lactato de sodio (60%)	0,047 ml
Glucosa	10,8 mg
BME-eaas	2 ml
MEM-neaas	1 ml
ASB-FAF	300 mg
Agua destilada	100 ml



Osmolaridad	270-285 mOsm
pH	7,4
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C Preparar cada 2 semanas	

Medio de maduración *in vitro*

Preparar 10 ml (Volumen final) en el momento de utilizar	
Bi-199	9,5 ml
SFB	0,5 ml
Stock LH V)	10 $\mu$ g (1 $\mu$ g/ml, Lutropin-
Stock FSH Folltropin-V)	1 $\mu$ g (100 ng/ml,

Soluciones de Percoll para separación de espermatozoides

SPTL 1 X

SPTL 10 X	2,5 ml
SPAD	0,2 ml
Agua estéril	17,3 ml
Osmolaridad	280-300 mOsm
pH	7,3

PERCOLL 90%

Para 30 ml:	
Percoll	26,5 ml
SPTL 10 X	2,95 ml
SPAD 100 X	0,295 ml
NaHCO <sub>3</sub>	6,2 mg
Osmolaridad	280-300 mOsm
pH	7,3

PERCOLL 45%

Percoll 90%	2 ml
SPTL 1 X	2 ml

Medio para fecundación *in vitro* (Fert-TALP, Parrish y col., 1986).

TL 10 X	5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,101 mg
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	15 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (4M)	6,15 µl
Lactato de sodio	70,5 µl
Piruvato de sodio	1,44 ml
MEM-neaas	0,5 ml
BME-eaas	1 ml
ASB-FAF	300 mg

Agua destilada	50 ml
Osmolaridad	280-300 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada 2 semanas	

*En el día de la fecundación:*

Fert-TALP	9,9 ml
Stock penicilamina	50 $\mu$ l
Stock hipotaurina	50 $\mu$ l
Stock heparina	10 $\mu$ l

Medio para cultivo de embriones *in vitro* (SOFm, Tervit y col., 1972; Gardner y col., 1994)

Stock S2	2 ml
NaHCO <sub>3</sub>	42 mg
Piruvato de sodio	0,72 ml
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (4M)	2,46 $\mu$ l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,04 mg
Lactato de sodio	9,40 $\mu$ l
Glucosa*	5,4 mg
Glutamina	2,92 ml
MEM-neaas	0,2 ml
BME-eaas	0,4 ml
ASB-FAF	160 mg

Agua destilada	20 ml
pH	7,2-7,4 (en atmósfera gaseada)
Osmolaridad	265-275 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 $\mu$ m) y guardar a 4°C. Preparar cada semana	

\*La glucosa fué reemplazada por agua destilada para preparar el medio SOFm utilizado el primer día de cultivo.