

- and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 80, 295-300.
- SAS, 2003. SAS and STAT Users Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
  - Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.

## Premio Biogénesis Bagó, versión 2013

### Segunda Mención del Premio Biogénesis Bagó 2013

#### **Consecuencias reproductivas de la hipocuprosis bovina: un avance hacia su diagnóstico y prevención en rodeos de Argentina**

Rosa, DE<sup>1</sup>.; Fazzio LE<sup>1</sup>; Mattioli GA<sup>1</sup>; Picco SJ.<sup>1,2</sup>; Furnus CC. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Nutrición Mineral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, La Plata 1900, Bs As, Argentina. <sup>2</sup>CCT-CONICET. La Plata.

Palabras clave: cobre, reproducción, rodeos de cría.

Keywords: copper, reproduction, cow-calf operation

#### RESUMEN

La deficiencia de cobre o hipocuprosis bovina genera pérdidas productivas por fallas inmunológicas y/o reproductivas. Su diagnóstico se realiza por análisis de cupremia, cuando las deficiencias son severas (< 30 µg/dL) aparecen las menores ganancias de peso. Sin embargo, no se conoce qué valores de cupremia podrían afectar la reproducción, con qué consecuencias y a través de qué mecanismos. Con el objetivo general de poder predecir y comprender las fallas reproductivas por hipocuprosis, se generaron objetivos particulares que fueron: 1. evaluar la asociación entre cupremias y niveles de cobre en licor folicular; 2. evaluar los niveles indicativos de carencia en el licor folicular con técnicas de fertilidad in vitro, como maduración in vitro de ovocitos, fertilización in vitro y

desarrollo embrionario; y 3. evaluar en las células germinales y en los embriones en desarrollo la existencia de alteraciones asociadas a la falta de cobre. La asociación entre cupremias y concentración de cobre en licor folicular evidenció valores menores que en plasma y asociados a los mismos, por lo cual los valores de carencia en plasma implicaron niveles de carencia en el entorno del complejo-ovocito- cumulus. Para el segundo objetivo se prepararon medios de maduración in vitro con 0, 20, 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , indicativos de diferentes estatus de cobre. Los dos primeros generaron fallas en la maduración in vitro y en el desarrollo embrionario, demostrando las consecuencias de la carencia. Para evaluar las causas de estas fallas se realizaron técnicas que indicaron la existencia de daño oxidativo con aumento de daño en el ADN y disminución en la concentración de glutatión en ovocitos y células del cumulus. Con estos resultados se sugiere el diagnóstico mediante análisis de cupremias, y evitar que las hembras que ingresen en etapa reproductiva se encuentren en carencia severa.

## SUMMARY

Copper deficiency causes production losses by immunological and/or reproductive failure. The diagnosis is made by analyzing cupraemia, when deficiencies are severe ( $<30 \text{ mg / dL}$ ) lower weight gains appear. However, the specific range of cupraemia could affect reproduction, with the consequences and mechanisms remain unknown. With the general objective of being able to predict and understand the reproductive failures by hypocuprosis, particular objectives were generated: 1. association of copper concentrations in plasma and follicular fluid from cattle ovaries; 2. the effects of supplemental copper during in vitro maturation on DNA damage of cumulus cells and glutathione content in oocytes and cumulus cells; and 3. supplementary copper during in vitro maturation on subsequent embryo development. The association between cupraemias and copper concentration in follicular fluid evidenced lower values in plasma and associated with them, so the values implied deficiency in plasma levels of deprivation in the environment of complex-ovocito- cumulus. For the second objective, in vitro maturation media prepared with 0, 20, 40 and 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , were indicative of different copper status. The 0 and 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  generated failures in vitro maturation and embryonic development, demonstrating

the consequences of the lack. To assess the causes of these failures techniques indicated the existence of oxidative damage with increased DNA damage and decreased concentration of glutathione in oocytes and cumulus cells were performed. These results suggest the diagnosis in a cow-calf operation by analyzing cupremias, and supplemented if necessary in the third period of gestation.

## INTRODUCCIÓN

La carencia de cobre (Cu) o hipocuprosis es la segunda deficiencia mineral más frecuente a nivel mundial en bovinos en pastoreos; y presenta una incidencia endémica en Argentina (Ramirez y col 1997, Fazzio 2006). Esta carencia provoca pérdidas productivas por menores ganancias diarias de peso, fallas inmunológicas y alteraciones reproductivas (Underwood y Suttle, 1999). El diagnóstico rutinario del estatus de Cu en los rodeos se basa en sus concentraciones en plasma o cupremia. En este sentido cupremias iguales o mayores a 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  se consideran normales (normocupremia), entre 30 y 59  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (hipocupremia moderada) y por debajo de 30  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (hipocupremia severa) momento en que aparecen las consecuencias de la enfermedad (Ramirez et al., 1998). Trabajos realizados en Argentina confirman esta teoría, al menos cuando se evalúan las menores ganancias de peso en terneros de cría (Soltan et al., 1983; Fazzio et al. et al., 2010). Sin embargo, la asociación entre cupremias y fallas reproductivas no ha sido esclarecida, generando una gran incertidumbre con respecto a la prevención de las mismas.

Los primeros estudios que relacionaron a las alteraciones reproductivas con la deficiencia de Cu en bovinos se basaron en ensayos de tipo "dosis-respuesta", en los cuales la suplementación con Cu mejoró los parámetros reproductivos (Soltan et al., 1983; Ingraham et al., 1987), pero con los cuales no fue posible establecer ni su asociación con las cupremias ni el origen de dichas alteraciones. Desde entonces se ha avanzado mucho en modelos de experimentación, que relacionan un inadecuado aporte de Cu con numerosas alteraciones de la reproducción, siendo un factor común en estos casos la existencia de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se asocia con la carencia de Cu debido a que la falla

de cuproenzimas aumentan la producción de especies activas de oxígeno (EAO) y baja la actividad de enzimas que las inactivan, algunas de las cuales poseen Cu en su estructura, como la Cu-Zn superóxido dismutasa (CuZnSOD) y la ceruloplasmina (CP). Otras, en cambio, dependen del Cu para su normal expresión, como la glutatión peroxidasa (GSH). Estas fallas han sido claramente demostradas en animales de experimentación y se sabe que conducen a daño oxidativo del ADN, lípidos y proteínas (Hawk et al. 1998; Keen et al. 1998). Recientemente se ha demostrado en Argentina que el daño oxidativo del ADN de leucocitos circulantes, evaluado por electroforesis de células aisladas (ensayo cometa), aumenta al profundizarse la hipocupremia en bovinos (Picco et al., 2004). Esta técnica no ha sido aún evaluada en células germinales de bovinos con hipocupremia.

Teniendo en cuenta que el objetivo sanitario y productivo en Argentina es predecir y evitar las consecuencias reproductivas de la hipocuprosis en los bovinos, la profundización en modelos experimentales con animales de laboratorio genera dos desviaciones fundamentales: no contemplan las diferencias entre especies y no asocian las consecuencias evaluadas in vitro con el estatus evaluable a nivel productivo por mediciones de cupremia.

El objetivo general de este trabajo fue asociar los rangos de cupremia en bovinos, usados como herramienta de rutina en el diagnóstico del estatus de Cu, con las consecuencias en la fertilidad de las hembras expuestas a la carencia. Para ello se establecieron cuatro objetivos particulares:

- 1) Evaluar la asociación entre los rangos de cupremia y los niveles de Cu en licor folicular (LF), estableciendo los niveles de Cu disponibles para el ovocito bovino.
- 2) Evaluar niveles crecientes de Cu del licor folicular, indicativos del estatus de Cu en la hembra bovina, en técnicas de fertilidad in vitro (FIV), maduración in vitro de los ovocitos (MIV) y desarrollo embrionario (DE).
- 3) Evaluar en las células del complejo ovocito cúmulus (COC) la asociación entre niveles de Cu durante la MIV y la incidencia de indicadores de daño oxidativo, registrando específicamente el daño en el ADN y los niveles de glutatión (GSH).

4) Analizar la importancia de la suplementación estratégica con Cu para evitar fallas reproductivas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las técnicas realizadas para evaluar las concentraciones de Cu en plasma y licor folicular (LF) para la obtención de ovocitos para maduración in vitro (MIV), la electroforesis de células aisladas (Ensayo cometa), la actividad glutatión (GSH), la fecundación in vitro (FIV), el cultivo in vitro (CIV) y la tinción de blastocistos para conteo celular fueron detalladas en las correspondientes publicaciones (Tervit et al., 1972, Singh et al., 1988, Furnus et al., 1998, Tice et al. 1999, Olive et al. 1999, Collins 2004).

### Diseño experimental

#### Efecto del Cu sobre la integridad de las células del cúmulus

El efecto del Cu sobre el nivel de daño en el ADN de células del cúmulus fue evaluada por ensayo cometa luego de la adición de 0, 20, 40, y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  al medio de MIV. Los COC fueron madurados por 24 h y evaluados por esta técnica según se describió previamente. Para este propósito, 800 COC en cuatro réplicas de diferentes días (200 COC por replicación, 50 COC por tratamiento) fueron madurados con las diferentes concentraciones de Cu. Cada batch de 50 COC fue procesado para preparar un portaobjetos y analizar al menos 250 células simples por tratamiento mediante el ensayo cometa.

#### Efecto de la suplementación con Cu sobre los niveles de glutatión

Se evaluó el efecto de la suplementación con 0, 20, 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  sobre los niveles de glutatión en células del COC, luego de una maduración de 24 h y con la técnica descrita previamente. Con esta finalidad, 800 COC fueron madurados en cuatro repeticiones, donde 200 COC fueron distribuidos en grupos de 50 COC por tratamiento.

Efecto de la suplementación con Cu sobre la MIV, el subsecuente desarrollo embrionario y la calidad embrionaria

Se evaluó el efecto de la suplementación al medio de MIV con 0, 20, 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Para este propósito, 1265 COC fueron madurados en 6 repeticiones. El índice de clivaje fue evaluado 48 h después de la inseminación. Se estableció el desarrollo hasta el estadio de blastocisto. El porcentaje de clivaje y desarrollo embrionario fue expresado como promedio  $\pm$  SEM.

### Análisis estadístico

Un análisis de Chi-cuadrado con corrección de Yates fue usado para comparar, entre grupos, los niveles del daño en el ADN por ensayo cometa. Las diferencias en las concentraciones de glutatión en células del COC fueron evaluadas por ANOVA y Student-Newman-Keuls Multiple Comparison post-test, luego de la transformación logarítmica de los datos. El porcentaje de clivaje y desarrollo embrionario fue también analizado por ANOVA y Student-Newman-Keuls Multiple Comparison post-test, luego de una transformación angular de los datos (CSS: Statistica, module C, Statsoft, Tulsa, UK). Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  SEM.

## RESULTADOS

### Concentraciones de cobre en plasma y licor folicular (LF)

La regresión entre Cu en plasma y en folículos grandes estableció una ordenada al origen de  $-1,84 \pm 5,54$  ( $P = 0,74$ ) y una pendiente de  $0,76 \pm 0,05$  ( $P < 0,001$ ), mientras que entre plasma y folículos pequeños la ordenada al origen fue de  $3,53 \pm 6,41$  ( $P = 0,55$ ), con una pendiente de  $0,69 \pm 0,06$  ( $P = < 0,001$ ). La correlación ( $r$ ) entre Cu plasmático y folículos grandes fue de  $0,88$  ( $P < 0,001$ ), y entre plasma y folículos pequeños de  $0,78$  ( $P < 0,001$ ) (ver figura 1).

En 43 de los 115 animales muestreados se logró obtener LF de folículos grandes y pequeños (Tabla 1). Los valores de Cu son levemente superiores en plasma que en LF, sin diferencias por el tamaño del

folículo.

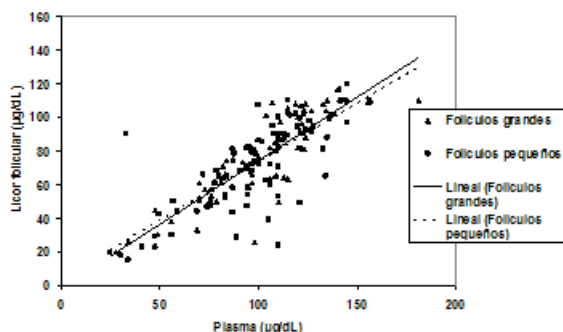


Figura 1. Regresión entre concentraciones de Cu en plasma y folículos grandes (< 10 mm) y pequeños (< 10 mm) en vaquillonas.

	Plasma	Folículos mayores a 10 mm	Folículos menores a 10 mm
Concentraciones de Cu (promedio ± SEM)	99 (± 4,4) <sup>a</sup>	74 (± 4,0) <sup>b</sup>	69 (± 4,2) <sup>b</sup>

**Tabla 1. Concentraciones de Cu en plasma y licor folicular de folículos grandes y pequeños en 43 muestras de vaquillonas obtenidas en frigorífico.** Letras diferentes por fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Efecto de los niveles de Cu en medio de MIV sobre el daño del ADN de las células del cúmulus

Las células que se desarrollaron en medios suplementados con 40 y 60 µg/dL presentaron un menor nivel de daño en su ADN, siendo sus índices de daño de  $200,00 \pm 27,63$ ;  $127,63 \pm 5,95$ ;  $46,41 \pm 4,85$  y  $51,06 \pm 6,02$ , para los medios suplementados con 0, 20, 40, y 60 µg/dL, respectivamente. El porcentaje de células sin daño en el ADN (Grado 0) aumentó con la suplementación de 40 o 60 µg/dL de Cu, pero no se diferenció entre los

medios adicionados con 0 y 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  (Tabla 2).

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

Las concentraciones de GSH aumentaron con la adición de 40 y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , sin diferenciarse entre ellos ( $P < 0,01$ ; Tabla 3). No hubo diferencias en el número de células del cúmulus ni antes ni después de la MIV en todas las suplementaciones con Cu evaluadas (antes de la MIV:  $15200 \pm 1200$  y después de la MIV:  $15233 \pm 1280$  (0  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu),  $15287 \pm 1197$  (20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu),  $15354 \pm 277$  (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y  $15599 \pm 1230$  (60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu) células del cúmulus/COC). En todos los experimentos realizados, ni el número de células por COC, ni el porcentaje de maduración nuclear variaron significativamente entre tratamientos (0  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu:  $83 \pm 4,1\%$ ; 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu:  $84 \pm 4,7\%$ ; 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu:  $83 \pm 3,2\%$  y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu:  $85 \pm 4\%$ ; evaluado con Hoechst 33342).

COC bovinos fueron incubados en medios de MIV carente de Cu (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cu) y adicionado con 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu, 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$  y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu. Todos los valores están expresados como el promedio  $\pm$  SEM (800 COC en cuatro repeticiones, 200 COC por replicación, 50 COC por tratamiento para GSH).

Tratamiento $\mu\text{g}/\text{dL}$	Grado de daño (SEM)				
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
0	37,37 (3,7)a	17,39 (1,9)a	12,34 (1,1)a	11,21 (1,6)a	11,02 (4,5)a
20	38,94 (3,6)a	24,97 (3,8)a	18,03 (1,0)a	7,94 (0,8)a	10,09 (2,9)a
40	72,73(2,9)b	13,04(2,1)b	10,94(2,3)b	1,61 (0,6)b	1,66 (0,3)b
60	66,17 (2,0)b	19,53 (0,6)b	7,21 (1,7)b	0,90 (0,4)b	0,57 (0,2)b

**Tabla 2: Daño en el ADN de células del cúmulus maduradas *in vitro* con diferentes concentraciones de Cu en el medio.** Letras diferentes en la misma columna indica diferencias significativas  $P < 0.01$ . COC fueron incubados en medios de MIV carente de Cu (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cu) y adicionado con 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu, 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$  y 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu. Células contadas: 0  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cu = 1200; Cu 20  $\mu\text{g}/\text{dL}$  = 1200; Cu 40  $\mu\text{g}/\text{dL}$  = 1200 y Cu 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  = 1200. Los valores en los grados de daño están expresados en promedio  $\pm$  (SEM). (800 COC en cuatro repeticiones para ensayo cometa). Tomado de Picco y col 2012. *Theriogenology* 77:373-381.



GSH	0 µg/dL	20 µg/dL	40 µg/dL	60 µg/dL
Ovocitos (pmol/ovocitos)	3,0±0,9a	3,2±0,5a	4,7±0,4b	5,0±0,5b
Cúmulus (nmol/10 <sup>6</sup> cel.)	0,3±0,05a	0,3±0,02a	0,4±0,04b	0,5±0,04b

**Tabla 3: Concentración intracelular de glutatión en ovocitos bovinos y en células del cúmulus maduradas en concentraciones crecientes de Cu.** Letras diferentes en la misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). Tomado de Picco y col 2012. Theriogenology 77:373-381.

Efecto de la suplementación con Cu durante la MIV y el subsecuente desarrollo embrionario

En 6 repeticiones, 1265 ovocitos fueron madurados y fertilizados in vitro. No hubo diferencias en la tasa de clivaje (0 vs 20 vs 40 vs 60 µg/dL Cu) entre tratamientos ( $P \geq 0,05$ ). La adición de Cu aumentó la tasa de blastocistos (blastocistos/ovocitos) cuando los ovocitos fueron madurados con 20, 40 y 60 µg/dL de Cu ( $P < 0,01$ ), aunque la diferencia fue aún más alta cuando se adicionaron 60 µg/dL de Cu ( $p < 0,001$ ; Tabla 4).

	0 µg/dL Cu	20 µg/dL Cu	40 µg/dL Cu	60 µg/dL Cu
Nº de ovocitos	313	339	309	304
Clivaje (%)	65,08±2,01a	66,64±1,64a	71,98±2,06a	70,69±2,13a
Blastocistos/ovocitos	18,69±0,62a	26,45±0,03b	29,04±1,70b	33,24±1,64c
Blastocistos/clivaje	29,33±1,11a	36,39±2,18b	40,46±2,76b	46,99±1,46c

**Tabla 4. Capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados en diferentes concentraciones de Cu.** Letras diferentes en la misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). COC bovinos fueron incubados con 0, 20, 40 y 60 µg/dL Cu. La tasa de clivaje fue evaluada con 48 h. de incubación. Los blastocistos informados incluyen embriones que avanzaron a estadios de expansión o eclosión luego de 8 días de cultivo. Todos los valores de tasas de clivaje y de desarrollo están expresados como promedio  $\pm$  SEM (1200 COC en seis repeticiones en diferentes días). Tomado de Picco y col 2012. Theriogenology 77:373-381.

	0 µg/dL Cu	20 µg/dL Cu	40 µg/dL Cu	60 µg/dL Cu
Nº	35	39	32	40

Células/blastocisto 102,3±5,0a 107,2±5,5a 127,4±6,7b 129,0±5,0b

**Tabla 5. Promedio de células en blastocistos de 8 días de desarrollo provenientes de ovocitos bovinos madurados en diferentes concentraciones de Cu.** Letras diferentes en la misma fila indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). COC bovinos fueron incubados en medios de MIV carente de Cu ( $0 \mu\text{g/mL Cu}$ ) y adicionado con  $20 \mu\text{g/dL Cu}$ ,  $40 \mu\text{g/dL}$  y  $60 \mu\text{g/dL Cu}$ . Los blastocistos fueron teñidos con Hoechst 33342. Los valores son expresados como promedio de células/blastocisto  $\pm$  SEM. Tomado de Picco y col 2012. Theriogenolgy 77:373-381.

De manera similar, la adición de Cu aumentó el porcentaje de blastocistos a partir de embriones clivados ( $P < 0,01$ ). El promedio del número de células por blastocisto aumentó ( $P < 0,05$ ) cuando los ovocitos fueron madurados en medios con  $40$  y  $60 \mu\text{g/dL}$  de Cu en el medio de MIV (Tabla 5).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio las concentraciones de Cu en plasma, utilizadas para el diagnóstico de rutina en rodeos expuestos a la carencia, se asocian claramente con las concentraciones de Cu en LF, las cuales son incluso un poco inferiores (Figura 1 y Tabla 1). Trabajos previos realizados en Argentina, demuestran que las menores ganancias de peso en terneros, una consecuencia subclínica de enorme costo productivo, ocurren con cupremias menores a  $30 \mu\text{g/dL}$  (Fazzio 2006, Fazzio y col 2010).

Esto significa que las consecuencias de la carencia sobre las células somáticas serían similares a aquellas que sufren las células germinales. Esto coincide con el aumento en el nivel de daño del ADN de células de cúmulus, las cuales presentan un menor índice de daño cuando crecen en medios con concentraciones de  $40$  y  $60 \mu\text{g/dL Cu}$ , especialmente por un aumento en el porcentaje de células con daño grado 0 (Tabla 2). Este hallazgo coincide con el aumento en el daño en el ADN observado en leucocitos circulantes de bovinos con hipocupremia (Picco, 2004). Estos trabajos sugieren que el daño en el ADN es de origen oxidativo. Esta posibilidad coincide con el comportamiento de la concentración de glutatión (GSH) en el presente ensayo. La falta de Cu intracelular causa

una disminución de GSH, perdiéndose capacidad antioxidante (Chardejian et al., 2005; Prakash et al., 2004, Sarkar et al., 2010). Por otro lado, los ovocitos acumulan GSH durante su maduración, para lograr una buena expansión in vitro del cúmulus y el posterior desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Takahashi et al., 1993; de Matos et al., 1995; Furnus et al., 1998). En el mismo sentido, altas concentraciones de GSH durante la MIV mejoran la calidad del desarrollo embrionario, produciendo más embriones que llegan al estadio de blastocistos, aumentando su capacidad para la criopreservación (de Matos 1996; Furnus et al., 2008).

La suplementación con Cu en los medios de MIV no aumentó la tasa de clivaje de las células de cúmulus, pero si mejoraron claramente el desarrollo posterior del embrión (Tablas 4 y 5). El primer dato coincide con informes previos (Gao et al., 2007), pero nuestros resultados coinciden en resaltar la importancia de la suplementación con Cu en el medio de maduración.

Teniendo en cuenta que el presente trabajo permite asociar los niveles de cupremia con aquellos del LF, el cual a su vez posee efectos evidentes sobre el desarrollo embrionario, resulta interesante reevaluar el valor diagnóstico de las cupremias como indicadores de riesgo. En este sentido, existen dos alternativas aceptadas a nivel internacional. Por un lado, Underwood y Suttle (1999) proponen que las consecuencias sobrevienen por debajo de los 30 µg/dL, mientras que Kincaid (1999) propone que este rango se encuentra por debajo de los 50 µg/dL. Teniendo en cuenta que los parámetros evaluados en el presente ensayo, como daño en el ADN, concentración de glutatión y desarrollo embrionario, fueron negativos con 0 y 20 µg/dL y mejoraron significativamente con adiciones de 40 y 60 µg/dL, la clasificación de Underwood y Suttle (1999) parecería mejor adaptada a las condiciones de producción de Argentina. Esto coincide con las menores ganancias de peso encontradas en terneros de cría con carencia severa (< 30 µg/dL), pero no con carencia moderada (30 – 60 µg/dL) (Fazzio 2006).

En Argentina se recomienda en rodeos de cría la suplementación parenteral con Cu a las madres en el último tercio de gestación, de modo de mejorar el aporte de Cu al ternero y evitar que se agote su reserva hepática en forma precoz en la vida post natal. De los resultados del presente trabajo se desprende la importancia de asegurar también un

normal estatus de Cu previo a la etapa de servicio. Los resultados del presente ensayo ratifican esa indicación y alertan del riesgo reproductivo cuando los animales presentan hipocupremia severa ( $< 30 \mu\text{g/dL}$ ).

## CONCLUSIONES

Los niveles de Cu en plasma usados para el diagnóstico de rutina se asocian con las concentraciones de Cu en el licor folicular, las cuales tienden a ser aún inferiores.

Concentraciones bajas de Cu en plasma y en licor folicular se asocian con fallas en la maduración in vitro de ovocitos, la fecundación in vitro y el posterior desarrollo embrionario.

Posiblemente las fallas reproductivas evaluadas se deban a daño oxidativo.

Estas fallas se corresponden con los valores de hipocupremia severa, la cual podría ser considerada como indicativa de riesgo reproductivo en rodeos de Argentina.

Es recomendable la evaluación de la hembra al final de la gestación y en pre-servicio por análisis de cupremia.

En países como Argentina, con incidencia endémica de hipocuprosis, se deben suplementar las hembras en la etapa de servicio, sea este natural o artificial, garantizando un estatus de Cu que optimice la performance reproductiva.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chaderjian, W.B., Chin, E.T., Harris, R.J., Etcheverry, T.M. 2005. 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. *Biotechnology Progress* 2, 550-553.
- Cunningham, J., Leffell, M., Mearkle, P., Harmatz, P. 1995. Elevated plasma ceruloplasmin in insulin dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism* 8, 996-999.

- Collins, A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Fazzio, L.E. 2006. Caracterización de terneros de cría con hipocuprosis. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Fazzio, L.E., Mattioli, G.A., Picco, S.J., Rosa, D.E., Minatel, L., Gimeno, E.J. 2010. Diagnostic value of copper parameters to predict growth of suckling calves grazing native range in Argentina. *Pesquisa Veterinaria* 10, 827-832.
- Furnus, C.C., de Matos, D.G., Moses, D.F. 1998. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Molecular Reproduction and Development* 51, 76-83.
- Furnus, C.C., de Matos, D.G., Picco, S., García, P.P., Inda, A.M., Mattioli, G., Errecalde, A.L. 2008. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science* 109, 88-99.
- Gao, G., Yi, J., Zhang, M., Xiong, J., Geng, L., Mu, Ch., Yang, L. 2007. Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, apoptosis of blastocysts in vitro. *Journal Reproduction Development* 53,777-784.
- Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P.A. 1994. 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 stimulate development. *Biology of Reproduction* 50, 390-400.
- Hawk, S.N., Uriu-Hare, J.Y., Daston, G.P., Jankowski, M.A., Kwik-Urbe, C., Rucker, R.B., Keen, C.L. 1998. Rat embryos cultured under copper-deficient conditions develop abnormally and are characterized by an impaired oxidant defense system. *Teratology* 6, 310-320.
- Hawk, S.N., Lanoue, L., Keen, C.L., Kwik-Urbe, C.L., Rucker, R.B., Uriu-Adams, J.Y. 2003. Copper-deficient rat embryos are characterized by low superoxide dismutase activity and elevated superoxide anions. *Biology of Reproduction* 3, 896-903.
- Ingraham, R.H., Kappel, L.C., Morgan, E.B., Srikrnakumar, A. 1987. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. *Journal of Dairy Science* 1, 167-180.

- Jiménez, I., Speisky, H. 2000. Effects of copper ions on the free radical-scavenging properties reduced glutathione: implications of a complex formation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 3, 161-167.
- Keen, C.L., Jant, Y., Uriu-Hare, Hawk, S.N., Jankowaski, M.A., Daston, G.P., Catherine, L., Kwik-Urbe, Rucker, R.B. 1998. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *Animal Journal Clinical Nutrition* 67, 1003-1011.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 37, 48-53.
- Lequarre, A.S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbiès-Tran, R., Callesen, H., Mermillod, P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63, 841-59.
- Maas, J. 1987. Relationship between nutrition and reproduction in beef cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 3, 633-646.
- de Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Baldassarre, H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 42, 432-436.
- de Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Martinez, A.G., Matkovic, M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molecular Reproduction and Development* 45, 451-457.
- Olive, P.L., Durand, R.E., Jackson, S.M., Le Riche, J.C., Luo, C., Ma, R., McLaren, D.B., Aquino Parsons, C., Thomson, T.A., Trotter, T. 1999. The comet assay in clinical practice. *Acta Oncologica* 8, 839-844.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., First, N.F. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- Picco, S.J. 2004. Consecuencias genotóxicas y clastogénicas en bovinos hipocuprémicos. Tesis doctoral, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Picco, S.J., Mattioli, G.A., Fazio, L.E., Rosa, D., De Luca, J.C., Dulout, F.N. 2004. Association Between Copper Plasma Level and DNA Damage In

Cattle. *Mutagenesis* 6, 453-456.

- Prakash, M., Upadhyaya, S., Prabhu, R. 2004. Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uremia. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 64, 599-604.
- Ramírez, C.E., Tittarelli, C.M., Mattioli, G.A., Giuliadori, M. y Puchuri, M. C. 1997. Hipocupremia Bovina en 5 Partidos de la Provincia de Buenos Aires. Argentina. *Veterinaria Argentina* 14, 12-17.
- Ramirez, C.E., Mattioli, G.A., Tittarelli, C.M., Giuliadori, M.J., Yano, H. 1998. Cattle hypocuprosis in Argentina associated with periodically flooded soils. *Livestock Production Science* 55, 47-52.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Soltan, M.H., Jenkins, D.M. 1983. Plasma copper and zinc concentrations and infertility. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 5, 457-459.
- Tervit, H.R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E.A. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of reproduction and fertility* 30, 493-497.
- Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., Okano, A. 1993. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryo. *Biology of Reproduction* 49, 228-232.
- Tice, R.R., Strauss, G.H. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 1, 207-214.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F. 1999. *The mineral nutrition of livestock.* CABI Publishing. London UK.