

Efecto de la adición de compuestos tiol durante la maduración in vitro sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos de cabras prepúberes

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de la adición de compuestos tiol al medio de maduración ovocitario sobre la maduración, fecundación y desarrollo embrionario in vitro. El medio de maduración control consistió en TCM199 + piruvato sódico + L-glutamina + gentamicina + 10% suero bovino de macho castrado (SS) + 10 µg/ml LH + 10 µg/ml o-FSH y 1 µg/ml 17β-estradiol. Los 4 compuestos tiol evaluados, añadidos al medio control, fueron: 100 µM de cisteamina, 100 µM de β-mercaptoetanol, 0.57 mM de cisteína y 0.57 mM de cistina. Tras 27 h de MIV, los ovocitos se inseminaron con semen fresco (3.5×10^6 espermatozoides/ml) en medio TALP suplementado con 1 µg/ml de hipotaurina. A las 24 h postinseminación, los presuntos cigotos se cultivaron en medio SOFm y se mantuvieron 7 días en cultivo. Se analizaron los parámetros de maduración nuclear, fecundación y desarrollo embrionario in vitro. No se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos que lograron la maduración nuclear entre los grupos analizados (rango, 67.1-70.8%). Los porcentajes de penetración total, monoespermia y poliespermia fueron similares para todos los grupos evaluados. Sin embargo, los ovocitos madurados en presencia de cisteamina y β-mercaptoetanol mostraron mayor capacidad ($P < 0.01$) para formar el pronúcleo masculino tras la penetración espermática (88.0% y 97.1%, respectivamente) comparados con los ovocitos madurados en presencia de cistina (47.5%) y el grupo control (62.2%). Los porcentajes de fecundación normal fueron también superiores ($P < 0.05$) en los grupos de cisteamina (72.0%) y β-mercaptoetanol (77.1%) que en los grupos de cisteína (46.2%), cistina (42.5%) y control (37.8%). Por otro lado, la no descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos monoespérmicos se observó con menos frecuencia ($P < 0.01$) en los grupos de cisteamina (8.0%) y β-mercaptoetanol (2.9%) respecto a los de cistina (40.0%) y control (28.9%). En cuanto al desarrollo embrionario a los 8 días postinseminación, la adición de cisteamina al medio de MIV mejoró ($P < 0.05$) el porcentaje de embriones que alcanzaron los estadios de mórula y blastocisto respecto al grupo control (22.2% vs. 6.4%). Asimismo, la mayor tasa de formación de blastocistos expandidos se logró al tratar los ovocitos con cisteamina (13.0%), que no mostró diferencias con la tasa alcanzada en el grupo de β-mercaptoetanol (8.3%), pero fue superior ($P < 0.05$) a la lograda en los grupos de cisteína (0%), cistina (0%) y control (2.6%). Pese a no hallarse diferencias en el número medio de células de los embriones totales, se observó que en el tratamiento de cisteamina los blastocistos expandidos presentaron un número medio de células (86.8 ± 13.8) superior al de los blastocistos expandidos obtenidos en el tratamiento de β-mercaptoetanol (51.0 ± 8.8) y en el control (60.5 ± 0.7). La concentración de GSH intracelular (pmol/ovocito), evaluada mediante espectrofotometría, fue superior ($P < 0.05$) en los ovocitos que presentaron el primer corpúsculo polar a las 27 h de MIV en los tratamientos de cisteamina (10.16 ± 1.52), cisteína (13.5 ± 0.72), cistina (8.83 ± 0.72) y control (10.57 ± 2.92) comparado con los ovocitos inmaduros (4.15 ± 1.02). En conclusión, la adición de cisteamina y β-mercaptoetanol al medio de MIV mejora la capacidad de los ovocitos de cabras prepúberes para formar el pronúcleo masculino y desarrollarse hasta el estadio de blastocisto.

Palabras clave: GSH, tioles, cisteamina, β-mercaptoetanol, cisteína, cistina, cabra, prepúber, ovocito, MIV, FIV, pronúcleo

INTRODUCCIÓN

Una de las anomalías más frecuentes observadas tras la FIV de ovocitos de cabras prepúberes es la falta de descondensación de la cabeza del espermatozoide (Martino et al., 1995; Mogas et al., 1997). Se piensa que la elevada haploidía hallada en el análisis citogenético de embriones caprinos de 2-4 células deriva del desarrollo de dichos ovocitos (Villamediana et al., 2001), lo que explicaría los bajos porcentajes de formación de blastocistos logrados tras el cultivo embrionario in vitro (Izquierdo et al., 1999).

Se ha demostrado que el glutatión (GSH; γ-glutamilcisteinglicina) intracelular juega un papel importante en la descondensación de la cromatina del espermatozoide y el inicio de la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide en ovocitos de ratón (Calvin et al., 1986), hámster (Perreault et al., 1988; Perreault, 1990), cerdo (Yoshida et al., 1992, 1993a,b; Grupen et al., 1994, 1995) y vaca (Miyamura,

1995; De Matos et al., 1995, 1996, 1997). Otra de las funciones conocidas del GSH es la protección de las células contra el daño oxidativo (Meister y Anderson, 1983; Yu, 1994; Del Corso, 1994; Lafleur, 1994). Además, diversos investigadores han observado que niveles más elevados de GSH intracelular proporcionan una mayor producción de blastocistos en varias especies (bovino: Telford, 1990; Takahashi et al., 1993; De Matos et al., 1995, 1996; porcino: Abeydeera et al., 1998; ratón: Gardiner y Reed, 1995a,b).

Los ovocitos y la mayoría de células somáticas de mamíferos no poseen un sistema de transporte para importar GSH directamente al interior del citoplasma (De Felici et al., 1987; Meister, 1991; Anderson y Meister, 1995). Sin embargo, se ha descrito que las células de los túbulos proximales del riñón, los enterocitos del intestino delgado y las células tipo II alveolares son capaces de tomar GSH intacto (Smith et al., 1996). Por otro lado, el metabolismo extracelular o de membrana del GSH puede formar productos como la γ -glutamilcisteína, cisteinilglicina o cisteína, que pueden ser transportados dentro de las células y utilizados para la biosíntesis de GSH (Anderson y Meister, 1995). El contenido en glutatión aumenta durante el crecimiento y la maduración del ovocito en el ovario, a medida que el ovocito se aproxima al tiempo de ovulación (Perreault et al., 1988).

La disponibilidad de aminoácidos precursores es un factor regulador en la síntesis de GSH y es muy probable que, en las células de mamíferos, los aminoácidos suministrados desde fuera de la célula provean un punto de control (Bannai et al., 1986). El glutatión es un tripéptido derivado de la glicina, el glutamato y la cisteína, y se sintetiza por el ciclo α -glutamil, que es dependiente de la disponibilidad de cisteína en el medio (Meister y Tate, 1976; Chance et al., 1979; Meister, 1983). Fuera de la célula, la cisteína es inestable y, en esencia, no hay cisteína libre en el medio de maduración debido a la autooxidación a cistina (Sagara et al., 1993; Bannai, 1984). Es posible que esta cistina se convierta a cisteína por las células del cumulus y sea entonces incorporada a la síntesis de GSH durante la MIV (Yoshida, 1993; Takahashi et al., 1995; De Matos et al., 1996). De este modo, se ha demostrado que la adición de cisteína al medio de maduración estimula la síntesis de GSH en ovocitos bovinos (De Matos et al., 1996, 1997; De Matos y Furnus, 2000) y porcinos (Yoshida et al., 1993; Sawai et al., 1997), promueve la formación del pronúcleo masculino en ovocitos penetrados de hámster (Kito y Bavister, 1997) y cerdo (Yoshida et al., 1993; Sawai et al., 1997) y mejora el posterior desarrollo embrionario en bovino (De Matos y Furnus, 2000). Asimismo, se ha observado que la presencia de cistina en el medio de maduración de ovocitos de vaca provoca un incremento en el contenido intracelular de GSH y en la tasa de desarrollo embrionario (De Matos et al., 1996, 1997; De Matos y Furnus, 2000).

Issels et al. (1988) y Bannai (1984) hipotetizaron que compuestos tiol de bajo peso molecular, presentes en el medio de maduración, pueden reducir cistina a cisteína, aumentando la síntesis de GSH. Entre estos compuestos se encuentra el β -mercaptoetanol (BME), que además, es capaz de transportar cisteína, formando el conjugado BME-cisteína, y facilitar así la entrada de cisteína al interior de las células (Ishii et al., 1981; Ohmori y Yamamoto, 1983). En estudios realizados con ovocitos madurados en presencia de BME, se ha observado un aumento en la síntesis de GSH en bovino (De Matos et al., 1996, 1997; De Matos y Furnus, 2000), ovino (De Matos et al., 1999) y porcino (Abeydeera et al., 1998, 1999), y una mejora en el desarrollo embrionario en bovino (De Matos y Furnus, 2000) y porcino (Abeydeera et al., 1998, 1999). También ha sido evaluada la suplementación de cisteamina en el medio de maduración, lográndose un

incremento en el contenido de GSH intracelular en ovocitos bovinos (De Matos et al., 1995,1996,1997), ovinos (De Matos et al., 1999) y porcinos (Yamauchi y Nagai, 1999; Nagai et al., 1996), un aumento en la formación del pronúcleo masculino en porcino (Gruppen et al., 1995; Nagai et al., 1996) y hámster (Kito y Bavister, 1997), y una mejora en el desarrollo embrionario en bovino (De Matos et al., 1995, 1996), ovino (De Matos et al., 1999), porcino (Gruppen et al., 1995; Yamauchi y Nagai, 1999) y búfalo (Gasparrini et al., 2000).

No existen evidencias en la bibliografía acerca del uso de compuestos tiol en la MIV de ovocitos de cabras prepúberes, por lo que el objetivo de este estudio ha sido evaluar los efectos de la adición de compuestos tiol al medio de maduración sobre la maduración nuclear, la fecundación y el desarrollo embrionario in vitro de dichos ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los ovocitos

Se recogieron ovarios de cabras prepúberes de aproximadamente 2 meses de edad en un matadero comercial y se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico conteniendo solución salina tamponada fosfatada según Dulbecco (Dulbecco's phosphate-buffered saline; PBS, Sigma, P-4417) y 50 µg/ml de gentamicina a 37°C. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio de los ovarios fue siempre inferior a 2 horas. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces en PBS con 50 µg/ml gentamicina. Los ovocitos se obtuvieron mediante la técnica de slicing, consistente en la realización de cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí del nº 21 (Swann-Morton®) en la superficie del ovario para liberar el contenido folicular en una placa de cultivo de 60 mm conteniendo TCM199/HEPES (Sigma, B-2520), suplementado con 135 µg/ml de NaHCO₃, 11,1 µg/ml de heparina sódica (Sigma, H-3393, 170 USP/mg) y 50 µg/ml gentamicina (medio de recuperación de ovocitos).

Se observaron los complejos cumulus-ovocito (COCs) bajo una lupa binocular y se seleccionaron aquellos que presentaron una o más capas completas de células del cumulus no expandidas y un citoplasma ovocitario homogéneo. Tras la selección, los COCs se lavaron tres veces en medio de maduración de ovocitos mediante pases en placas de cultivo de 35x10 mm (Falcon®). Tras ello, los ovocitos fueron distribuidos aleatoriamente en los grupos de tratamiento. Todos los procedimientos de esta experiencia se realizaron en una campana de flujo laminar a 34-35°C.

Maduración in vitro (MIV) de los ovocitos

La maduración de los ovocitos se realizó en microgotas de 100 µl de medio TCM199 (Sigma, M-7528) suplementado con 2750 µg/ml de piruvato sódico, 146 µg/ml de L-glutamina, 10% (v/v) de suero bovino de macho castrado (SS; Donor Bovine Serum®, CanSera, Ontario, Canadá), 10 µg/ml de LH (suministrada por J.F. Beckers, IRSIA Research Unit, University of Liege, Belgium), 10 µg/ml de o-FSH (Ovagen®, Immuno Chemicals Products Ltd., Auckland, New Zealand), 1 µg/ml de 17β estradiol (Sigma, E-2257) y 50 µg/ml de gentamicina, cubiertas con aceite mineral (Sigma, M-3516) en placas de cultivo de 35x10 mm. La adición de

Se añadieron 700 μl de 0.33 mg/ml NADPH (Sigma, N-1630) en solución tampón stock, 100 μl de 6 mM 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DNTB; Sigma, D-8130) en solución tampón stock y 190 μl de agua. Se pipeteó el contenido en cada tubo y, tras 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 10 μl de 250 UI/ml de glutatión reductasa (Sigma, G-3664) para iniciar la reacción. Se siguió la formación de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de manera continuada con un espectrofotómetro Beckman DU-40 a 412 UV durante 2 min con una lectura cada 1 segundo. También se evaluaron los estándares (0.02 mM, 0.1 mM, 0.2 mM y 1 mM) de GSH (Sigma, G-6013) y una muestra blanco sin GSH (0 mM). La cantidad de GSH se determinó a partir de una curva estándar en la que los equivalentes de GSH presentes se compararon con la tasa de cambio de absorbancia a 412 nm.

Selección y capacitación de los espermatozoides

Se obtuvieron eyaculados frescos de 2 machos cabríos de raza Malagueña de probada fertilidad mediante el uso de vagina artificial y se transportaron al laboratorio en un recipiente isotérmico a 37°C en un tiempo inferior a 30 min. Una vez en el laboratorio, se valoró la motilidad masal bajo una lupa binocular.

Los espermatozoides se lavaron y seleccionaron mediante la técnica de swim-up: se colocaron 2 ml de medio mDM (Medio Definido descrito por Brackett and Oliphant (1975) y modificado por Younis et al. (1991)) en 3 tubos cónicos y se depositaron 70 μl de semen en el fondo de cada tubo. Se incubaron durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad. Transcurrido este periodo de tiempo, se recogieron aproximadamente 600 μl del sobrenadante de cada tubo y se mezclaron en un tubo estéril de centrifuga de 15 ml. Se tomó una muestra para calcular la concentración espermática con una cámara de recuento celular, y el resto se centrifugó a 200 x g durante 10 min. Tras ello, se eliminó el sobrenadante y el volumen restante de sedimento se mezcló con un volumen igual de medio de capacitación mDM suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ heparina, siendo la concentración final de esta suspensión de 84x10⁶ spz/ml aproximadamente. Esta suspensión se incubó durante 45-60 min a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Fecundación in vitro (FIV) de los ovocitos

Tras 27 horas de maduración, los ovocitos se lavaron en medio de fecundación. La FIV se realizó en microgotas de 100 μl de medio de fecundación TALP (medio Tyrode modificado, definido por Parrish et al., 1986), suplementado con 1 $\mu\text{g/ml}$ hipotaurina (Sigma, H-1384), cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm. Tras la capacitación, se evaluó la concentración espermática con una cámara de recuento celular. Se colocaron 20-25 COCs/microgota y se inseminaron con una alícuota (5 μl) de la suspensión de espermatozoides capacitados, con una concentración final de aproximadamente 3.5x10⁶ espermatozoides/ml). El co-cultivo se mantuvo durante 24 h a 38.5°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y saturada de humedad.

Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos

El estadio nuclear de los ovocitos tras la MIV y la FIV se evaluó mediante fijación y tinción con una solución de lacmoide (Sigma, L-7512) al 1%.

Tras 27 h de maduración, los ovocitos se separaron de las células del cumulus mecánicamente mediante continuado pipeteo y, una vez lavados, se fijaron en una solución de ácido acético 90% y etanol (1:3, v/v) a 4°C al menos durante 24 h. Posteriormente, se tiñeron con lacmoide en una solución de ácido acético al 45% y se observaron con un microscopio óptico Olympus BX50 a 400X. Los ovocitos se clasificaron en 5 categorías en función del estadio nuclear que presentaron:

- Vesícula germinativa (VG)
- GVBD (ruptura de la vesícula germinativa-prometáfase I)
- Metafase I (MI)
- Anafase-telofase I (An-Tel I)
- MII (Metafase II)

Se consideró un ovocito madurado nuclearmente cuando alcanzó el estadio de metafase II.

A las 20 h postinseminación, una muestra de los presuntos cigotos se separaron de los espermatozoides adheridos a su zona pelúcida mecánicamente mediante continuado pipeteo, y se procesaron de igual forma que los ovocitos tras la maduración.

Los presuntos cigotos se consideraron fecundados cuando presentaron en su citoplasma una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos ya formados con sus respectivas colas. Asimismo, se clasificaron como ovocitos con formación del pronúcleo masculino aquellos ovocitos fecundados que presentaron uno o más pronúcleos masculinos en su citoplasma.

En función del número de espermatozoides que penetraron los ovocitos, éstos se clasificaron en 2 categorías:

- Monoespermicos: ovocitos fecundados que presentaron en su citoplasma una sola cabeza no descondensada, parcialmente descondensada o un pronúcleo ya formado con su respectiva cola. Estos ovocitos fueron clasificados, a su vez, en: fecundados normalmente, cuando mostraron un pronúcleo femenino y un pronúcleo masculino ya formados, y en asincrónicos, cuando mostraron un pronúcleo femenino y una cabeza espermática sin descondensar.
- Poliespermicos: ovocitos fecundados que presentaron en su citoplasma más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado con sus respectivas colas.

Las cabezas de los espermatozoides que penetraron en los ovocitos se clasificaron morfológicamente en función de su grado de descondensación en 4 categorías, según el criterio establecido por Kikuchi et al. (1999):

- Cabeza condensada
- Cabeza hinchada
- Cromosomas en metafase
- Pronúcleo masculino

Cultivo embrionario in vitro (CIV)

A las 24 h postinseminación se separaron los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos mecánicamente mediante continuado pipeteo y se lavaron con el medio de cultivo de embriones. El CIV se realizó en microgotas de 20-25 μ l de Fluido Oviductal Sintético (SOF; Tervit et al. (1972), modificado por Takahashi y First (1992)) cubiertas con aceite mineral en placas de cultivo de 35x10 mm. Se colocaron 20-25 presuntos embriones/microgota y se mantuvieron en cultivo durante 7 días (8 días postinseminación) a 38.5°C en una atmósfera de 90% de N₂, 5% de CO₂ y 5% de O₂. A las 24 h del inicio del cultivo (es decir, a las 48 h postinseminación) se añadió a las microgotas un 10% (v/v) de SS (0.1 μ l de suero/embrión).

Valoración del desarrollo embrionario

A los 7 días del inicio del cultivo (8 días postinseminación) se valoró el desarrollo embrionario alcanzado mediante una tinción fluorescente para ADN (Hoechst 33342, Sigma, B-2261). Los presuntos embriones se depositaron sobre portaobjetos y, tras secarlos en una platina a 37°C, se fijaron en alcohol absoluto a 4°C durante 24-48h. Tras este periodo de tiempo, se secaron al aire y se tiñeron con 12 μ l de una solución de trabajo Hoechst, preparada el mismo día de su uso mezclando 0.99 ml de citrato sódico (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) al 2.3% (w/v) y 0.01 ml de la solución madre de Hoechst (1 mg Hoechst/1mg de citrato sódico 2.3%). Se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron las preparaciones para conservarlas a 4°C. Se examinaron con un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de 380-420 nm (400X) y se clasificaron según el número total de células embrionarias que presentaron en:

- Embriones totales: embriones con ≥ 2 células.
- Embriones ≥ 8 células: embriones con ≥ 8 células.
- Mórulas: embriones con ≥ 16 células.
- Blastocistos: embriones con ≥ 32 células.
- Blastocistos expandidos: blastocistos en los que el espesor de la zona pelúcida y de la capa de células del trofoblasto se redujo de forma considerable, motivado por el aumento de tamaño de la masa celular embrionaria.
- Blastocistos eclosionados: blastocistos en que se produjo la extrusión de un grupo o la totalidad de células de la masa celular embrionaria a través de la zona pelúcida, consiguiéndose o no la total expansión del blastocisto.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL AL MEDIO DE MIV SOBRE LA MIV, FIV Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

En el Experimento 1 se evaluó la capacidad de desarrollo de los ovocitos de cabras prepúberes tras la adición al medio de maduración de cisteamina (100 μ M), β -mercaptoetanol (100 μ M), cisteína (0.57 mM), cistina (0.57 mM) con respecto a un grupo control, en cuyo medio de maduración no se incluyeron compuestos tiol.

La capacidad de desarrollo ovocitario se evaluó mediante (i) el porcentaje de ovocitos que alcanzaron el estadio de MII tras 27 h de MIV, (ii) el porcentaje de fecundación normal tras 20 h de FIV, (iii) el porcentaje de embriones totales, embriones con ≥ 8 células, mórulas más blastocistos, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados alcanzado a los 8 días postinseminación y (iv) el número medio de células de dichos embriones.

Experimento 2

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL AL MEDIO DE MIV SOBRE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN INTRACELULAR

En el Experimento 2 se evaluó la capacidad de los ovocitos para sintetizar GSH intracelular durante la MIV en presencia o ausencia de compuestos tiol añadidos al medio de MIV. Para ello, se analizó el contenido de GSH intracelular en ovocitos inmaduros (0 h de MIV) y en ovocitos madurados con cisteamina, β -mercaptoetanol, cisteína, cistina y en el medio control (27 h de MIV).

Inmediatamente después de la recuperación de los ovocitos, se tomó una muestra de los ovocitos inmaduros seleccionados y se procesaron para el análisis de GSH intracelular según se describe en el apartado anterior de material y métodos.

A las 27 h de la MIV, los ovocitos se observaron bajo lupa binocular y distribuyeron en 2 grupos: ovocitos con 1º corpúsculo polar, cuando se observó la presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino, y ovocitos sin 1º corpúsculo polar, cuando éste no pudo ser observado. Los ovocitos se procesaron para el análisis de GSH intracelular del mismo modo que para los ovocitos inmaduros.

Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos de tratamiento se calcularon mediante el test de χ^2 o el test exacto de Fisher. Se calculó el χ^2 total y se halló significativo antes de realizarse el test exacto de Fisher para detectar las diferencias entre grupos de tratamiento. Se realizó un test Kruskal-Wallis con el post-test de Múltiples Comparaciones de Dunn para analizar las diferencias entre grupos en el número medio de espermatozoides por ovocito poliespérmico y en el número de células de los embriones. Las concentraciones de GSH intracelular se sometieron a una transformación logarítmica y se evaluaron mediante el test de t-Student. Se consideraron significativas las diferencias con un valor de probabilidad ≤ 0.05 . Para todos los análisis se empleó el paquete estadístico GraphPad InStat (versión 3.01 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA)

RESULTADOS

Experimento 1

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL AL MEDIO DE MIV SOBRE LA MIV, FIV Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO

Maduración nuclear

Los resultados obtenidos con relación a la maduración nuclear ovocitaria tras 27 h de cultivo se muestran en la Tabla 1.

Más del 90% de los ovocitos fueron capaces de reiniciar la meiosis en cada uno de los grupos evaluados. Los ovocitos que no alcanzaron el estadio de MII quedaron bloqueados en su mayor parte en estadio de MI (rango, 24.1-30.0%). No se hallaron diferencias significativas en los porcentajes de maduración nuclear alcanzados entre los diferentes tratamientos y el control (rango, 67.1-70.8 %).

Tabla 1. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre la maduración nuclear de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=6)

Tratamiento	Número total de ovocitos	VG n (%)	GVBD n (%)	MI n (%)	An-Tel I n (%)	MI I n (%)
Cisteamina	295	12 (4.1)	1 (0.3)	71 (24.1)	2 (0.7)	209 (70.8)
β -mercaptoetanol	189	9 (4.8)	1 (0.5)	47 (24.9)	0 (0)	132 (69.8)
Cisteína	221	7 (3.2)	0 (0)	56 (25.3)	2 (0.9)	156 (70.6)
Cistina	210	4 (1.9)	1 (0.5)	63 (30.0)	1 (0.5)	141 (67.1)
Control	326	16 (4.9)	0 (0)	84 (25.8)	1 (0.3)	225 (69.0)

VG: Vesícula Germinativa; GVBD: Ruptura de la Vesícula Germinativa; MI: Metafase I; An-Tel I: Anafase-Telofase I; MII: Metafase II.

Fecundación in vitro

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de fecundación obtenidos tras 20 h de FIV, calculados respecto al número total de ovocitos inseminados.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fecundación total en cada uno de los grupos evaluados, incluyendo el control (rango, 44.9%-59.7%). Sin embargo, los ovocitos madurados en presencia de cisteamina exhibieron un porcentaje de formación de los 2 pronúcleos más elevado (35.3%) que los ovocitos del grupo control (20.7%; $P < 0.05$). En cuanto a las anomalías analizadas, se observó un menor porcentaje de asincronía en el desarrollo del pronúcleo masculino en los grupos de cisteamina (3.9%) y β -mercaptoetanol (1.9%) comparado con los grupos cisteína (24.2%; $P < 0.05$), cistina (25.4%; $P < 0.001$) y control (20.7%; $P <$

0.01). Los porcentajes de fecundación poliespérmica fueron semejantes en todos los grupos (rango, 9.0-17.1%).

Tabla 2. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre la fecundación in vitro de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=6)

Tratamiento	Número total de ovocitos inseminados	Fecundación			
		Total n (%)	2 pronúcleos n (%)	Asincronía n (%)	Poliespermia n (%)
Cisteamina	102	50 (49.0)	36 (35.3) ^a	4 (3.9) ^b	10 (9.8)
β-mercaptoetanol	78	35 (44.9)	27 (34.6) ^{ab}	1 (1.3) ^b	7 (9.0)
Cisteína	99	52 (52.5)	24 (24.2) ^{ab}	13 (13.1) ^a	15 (15.2)
Cistina	67	40 (59.7)	17 (25.4) ^{ab}	16 (23.9) ^a	7 (10.4)
Control	82	45 (54.9)	17 (20.7) ^b	14 (17.1) ^a	14 (17.1)

Fecundación total: una o más cabezas espermáticas no descondensadas, parcialmente descondensadas y/o pronúcleos; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

En la Tabla 3 se exponen los parámetros de fecundación de los ovocitos calculados respecto al total de ovocitos fecundados. Más del 85% de los ovocitos madurados en presencia de cisteamina (88.0%) y β-mercaptoetanol (97.1%) fueron capaces de formar el pronúcleo masculino tras la penetración espermática. Estos porcentajes fueron significativamente superiores a los grupos de ovocitos madurados con cistina (47.5%; $P < 0.0001$) y el control (62.2%; $P < 0.01$). La presencia de cisteína proporcionó una menor tasa de descondensación de las cabezas espermáticas (73.1%) respecto al β-mercaptoetanol ($P < 0.01$). Además, la capacidad de formación del pronúcleo masculino en el grupo de cisteína fue significativamente superior al de la cistina ($P < 0.05$). A pesar de que la monoespermia fue similar en todos los grupos evaluados, los ovocitos tratados con cisteamina y β-mercaptoetanol presentaron mayores tasas de fecundación normal (72.0% y 77.1%, respectivamente) que los ovocitos tratados con cisteína (46.2%; $P < 0.05$), cistina (42.5%; $P < 0.01$) y el control (37.8%, $P < 0.01$). De esta forma, la presencia de cabezas espermáticas sin descondensar en los ovocitos monoespérmicos fue menos frecuente en los grupos de cisteamina (8.0%) y β-mercaptoetanol (2.9%) respecto a la cistina (40.0%; $P < 0.001$) y al control (28.9%, $P < 0.01$). Las tasas de poliespermia no se vieron afectadas por el tratamiento, situándose los porcentajes de esta anomalía entre el 17.5-31.1%.

Tabla 3. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre los parámetros de fecundación de ovocitos fecundados de cabras prepúberes (réplicas=6)

Tratamiento	Número total de ovocitos fecundados	PNM n (%)	Monospermia			Poliespermia	
			Total n (%)	2 pronúcleos n (%)	Asincronía n (%)	Total n (%)	Media spz/ov [*]
Cisteamina	50	44 (88.0) ^{ab}	40 (80.0)	36 (72.0) ^a	4 (8.0) ^b	10 (20.0)	2.3±0.7
β-mercaptoetanol	35	34 (97.1) ^a	28 (80.0)	27 (77.1) ^a	1 (2.9) ^b	7 (20.0)	2.3±0.6
Cisteína	52	38 (73.1) ^{bc}	37 (71.2)	24 (46.2) ^b	13 (11.5) ^{ab}	15 (28.8)	2.5±0.1
Cistina	40	19 (47.5) ^d	33 (82.5)	17 (42.5) ^b	16 (40.0) ^a	7 (17.5)	2.3±0.5
Control	45	28 (62.2) ^{cd}	31 (68.9)	17 (37.8) ^b	14 (28.9) ^a	14 (31.1)	2.1±0.1

PNM: uno o más pronúcleos masculinos; Monoespermia: una sola cabeza no descondensada, parcialmente descondensada o un pronúcleo; 2 pronúcleos: pronúcleo masculino y pronúcleo femenino; Asincronía: pronúcleo femenino y cabeza espermática sin formar pronúcleo; Poliespermia: más de una cabeza no descondensada, parcialmente descondensada y/o pronúcleo ya formado; Media spz/ov: número medio de espermatozoides por ovocito poliespérmico

a,b,c,d: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , P<0.05)

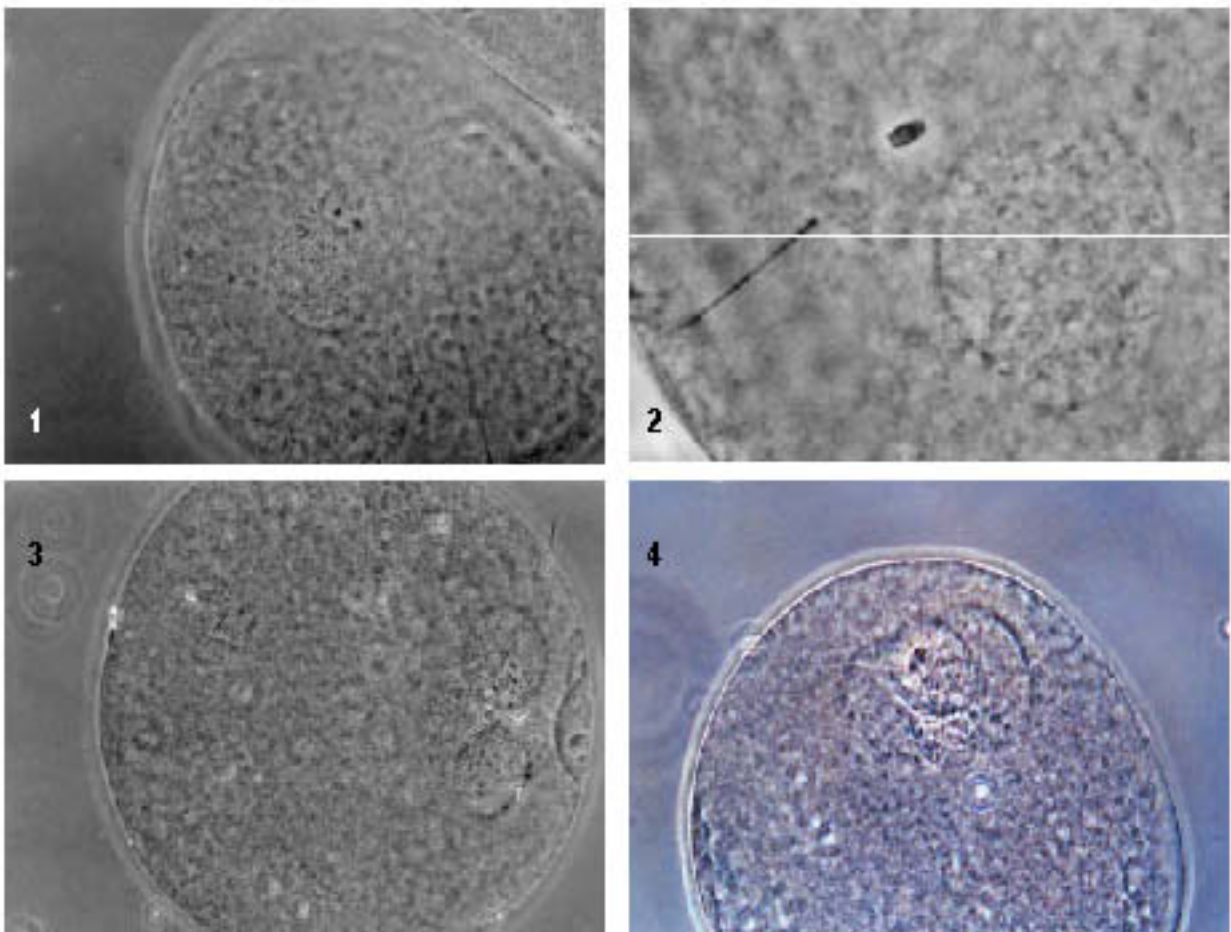


Figura 1. Fecundación normal: Pronúcleo masculino, pronúcleo femenino y cola del espermatozoide.
 Figura 2. Fecundación asincrónica: Pronúcleo femenino, cabeza del espermatozoide sin descondensar y cola.
 Figura 3. Fecundación poliespérmica: 2 pronúcleos, cabezas sin descondensar y varias colas de espermatozoide.
 Figura 4. Fecundación poliespérmica: 1 pronúcleo femenino y 2 pronúcleos masculinos.

La Tabla 4 detalla el grado de descondensación de la cabeza de los espermatozoides hallados en el citoplasma de los ovocitos clasificados como monoespérmicos. La mayor parte de los ovocitos madurados en presencia de cisteamina (90.0%) y β -mercaptoetanol (96.4%), penetrados por un solo espermatozoide, fueron capaces de formar el pronúcleo masculino, siendo estos porcentajes superiores ($P < 0.05$) a los mostrados por los ovocitos madurados en presencia de cisteína (64.9%), cistina (51.5%) y en el grupo control (54.8%). Se hallaron cabezas condensadas en menor proporción ($P < 0.05$) en los ovocitos madurados con cisteamina (7.5%) y β -mercaptoetanol (0%) que en los ovocitos madurados en presencia de cistina (30.3%) y en el grupo control (38.7%).

Tabla 4. Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos monoespérmicos (réplicas=6)

Tratamiento	Número total de ovocitos monoespérmicos	Pronúcleo masculino n (%)	Cromosomas metafásicos n (%)	Cabeza hinchada n (%)	Cabeza condensada n (%)
Cisteamina	40	36 (90.0) ^a	1 (2.5)	0 (0)	3 (7.5) ^{bc}
β -mercaptoetanol	28	27 (96.4) ^a	0 (0)	1 (3.6)	0 (0) ^c
Cisteína	37	24 (64.9) ^b	2 (5.4)	2 (5.4)	9 (24.3) ^{ab}
Cistina	33	17 (51.5) ^b	3 (9.1)	3 (9.1)	10 (30.3) ^a
Control	31	17 (54.8) ^b	2 (6.5)	0 (0)	12 (38.7) ^a

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

En la Tabla 5 se expone de manera detallada el grado de descondensación de las cabezas de los espermatozoides hallados en el citoplasma de los ovocitos clasificados como poliespérmicos. En este caso, el 100% y el 91.7% de los espermatozoides que penetraron en ovocitos madurados con β -mercaptoetanol y cisteína, respectivamente, desarrollaron pronúcleos masculinos. Esta tasa fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a la observada en espermatozoides que penetraron en ovocitos madurados en presencia de cisteamina (62.5%), cistina (50.0%) y en el control (40.0%). Asimismo, se hallaron menos cabezas condensadas ($P < 0.01$) en el grupo de ovocitos madurados con β -mercaptoetanol (0%) y cisteína (5.6%) que en el control (50.0%).

Tabla 5: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el grado de descondensación de la cabeza del espermatozoide en ovocitos poliespérmicos (réplicas=6)

Tratamiento	Número total de espermatozoides	Pronúcleo masculino n (%)	Cromosomas metafásicos n (%)	Cabeza hinchada n (%)	Cabeza condensada n (%)
Cisteamina	23	15 (62.5) ^b	2 (8.7)	1 (4.3)	5 (21.7) ^{ab}
β-mercaptoetanol	17	17 (100) ^a	0 (0)	0 (0)	0 (0) ^b
Cisteína	36	33 (91.7) ^a	1 (2.8)	0 (0)	2 (5.6) ^b
Cistina	18	9 (50.0) ^b	3 (16.7)	1 (5.6)	5 (27.8) ^{ab}
Control	30	12 (40.0) ^b	2 (6.7)	1 (3.3)	15 (50.0) ^a

^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

Desarrollo embrionario in vitro

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al desarrollo embrionario tras 7 días de cultivo. El porcentaje de división fue similar en todos los grupos evaluados, pero en el caso de los ovocitos tratados con β-mercaptoetanol, la proporción de embriones divididos (39.1%) fue significativamente superior ($P < 0.05$) a la del grupo de ovocitos tratados con cistina (28.2%). El porcentaje de embriones divididos que superó el bloqueo de las 8 células fue significativamente superior en el grupo de ovocitos madurados en presencia de cisteamina (38.9%) que en los grupos de β-mercaptoetanol (13.9%; $P < 0.01$), cisteína (13.3%; $P < 0.01$) y cistina (15.1%; $P < 0.05$), pero no difirió con el grupo control (26.9%). La formación de mórulas más blastocistos fue más elevada en el grupo de cisteamina (22.2%) que en los grupos de cistina (0%; $P < 0.001$) y control (6.4%; $P < 0.05$), pero semejante a la de los grupos β-mercaptoetanol (13.9%) y cisteína (13.0%). El grupo de ovocitos madurados con cistina no presentó desarrollo hasta los estadios de mórula y blastocisto. Respecto al porcentaje de formación de blastocistos expandidos, la mayor tasa se dio en el grupo de ovocitos madurados con cisteamina (13.0%), semejante al grupo de β-mercaptoetanol (8.3%), y que fue superior ($P < 0.05$) a los grupos de la cisteína, cistina y control (0%, 0% y 2.6%, respectivamente). Asimismo, la tasa de blastocistos expandidos fue superior ($P < 0.05$) en el grupo de β-mercaptoetanol que en los grupos de cisteína y cistina.

Todos los embriones que superaron el estadio de bloqueo a las 8 células en el grupo de β-mercaptoetanol prosiguieron su desarrollo hasta mórula y blastocisto, y un 60% alcanzó el estadio de blastocisto expandido. Estas tasas fueron superiores a las logradas en los tratamientos con cisteamina (57.1% y 33.3%, respectivamente) y en el control (28.6% y 9.5%, respectivamente). La tasa de blastocistos expandidos que eclosionó a los 8 d postinseminación fue similar en los grupos de maduración con cisteamina (28.6%) y β-mercaptoetanol (33.3%).

Tabla 6: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el desarrollo embrionario in vitro de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=6)

Tratamiento	Número total de ovocitos inseminados	Desarrollo embrionario a los 8 días postinseminación				
		Embriones totales n (%)	Embriones ≥ 8 células n (%)*	Mórulas + blastocistos n (%)*	Blastocistos expandidos n (%)*	Blastocistos eclosionados n (%)*
Cisteamina	160	54 (33.8) ^{ab}	21 (38.9) ^a	12 (22.2) ^a	7 (13.0) ^a	2 (3.7)
β -mercaptoetanol	184	72 (39.1) ^a	10 (13.9) ^b	10 (13.9) ^{ab}	6 (8.3) ^{ab}	2 (2.7)
Cisteína	185	60 (32.4) ^{ab}	8 (13.3) ^b	8 (13.0) ^{ab}	0 (0) ^c	0 (0)
Cistina	188	53 (28.2) ^b	8 (15.1) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^c	0 (0)
Control	210	78 (37.1) ^{ab}	21 (26.9) ^a	6 (6.4) ^{bc}	2 (2.6) ^{bc}	0 (0)

*: porcentajes calculados respecto al total de embriones

^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (χ^2 , $P < 0.05$)

En la Tabla 7 se representa el número medio de células del total de embriones divididos, del total de embriones en estadio de mórula y blastocisto y del total de embriones en estadio de blastocisto expandido para cada uno de los tratamientos evaluados. No se hallaron diferencias significativas en el número medio de células de los embriones totales. Sin embargo, el número medio de células de las mórulas y blastocistos obtenidos con el tratamiento de cisteamina (62.3 ± 38.3) fue superior ($P < 0.01$) al número medio logrado con el tratamiento de cisteína (19.3 ± 1.5).

Tabla 7: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el número medio de células de los embriones obtenidos a partir de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=6)

Tratamiento	Número medio de células					
	Embriones totales n	Nº de células	Mórulas + blastocistos n	Nº de células	Blastocistos expandidos n	Nº de células
Cisteamina	54	13.7 ± 26.5	12	62.3 ± 38.3^a	7	86.8 ± 13.8^a
β -mercaptoetanol	72	7.6 ± 14.4	10	41.6 ± 17.5^{ab}	6	51.0 ± 8.8^b
Cisteína	60	5.0 ± 5.1	8	19.3 ± 1.5^b	0	-
Cistina	53	4.5 ± 2.6	0	-	0	-
Control	78	6.8 ± 9.4	6	32.3 ± 24.1^{ab}	2	60.5 ± 0.7^b

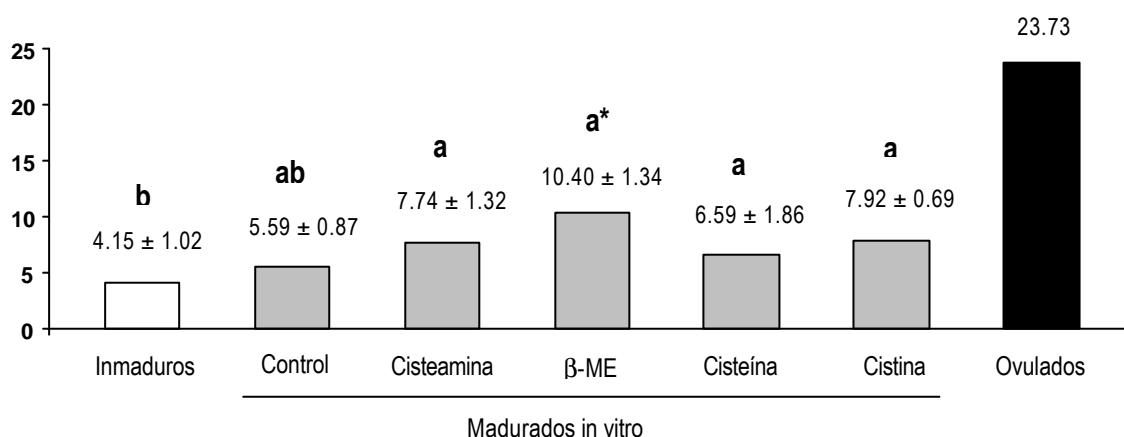
^{a,b}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (Kruskal-Wallis, $P < 0.01$)

Experimento 2

EFECTO DE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS TIOL AL MEDIO DE MIV SOBRE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN INTRACELULAR

En la Figura 5 se representan los niveles de GSH intracelular detectados en los ovocitos de cabras prepúberes inmaduros (hora 0 de la MIV), tras la maduración in vitro (27 h de la MIV) y en los ovocitos ovulados de cabras adultas. Los ovocitos madurados en presencia de tioles, en los tratamientos de cisteamina, β -mercaptoetanol, cisteína y cistina mostraron niveles superiores ($P < 0.05$) de GSH intracelular que los ovocitos inmaduros (7.74 ± 1.32 , 10.40 ± 1.34 , 6.59 ± 1.86 y 7.92 ± 0.69 vs. 4.15 ± 1.02 pmol/ovocito, respectivamente). También se observó una tendencia ($P = 0.0736$) a una mayor concentración de GSH en el tratamiento de β -mercaptoetanol comparado con el grupo control. Se analizó el contenido de GSH intracelular de una muestra de 21 ovocitos ovulados, detectándose 23.73 pmol/ovocito. Dicha muestra no se comparó estadísticamente al tratarse de una sola réplica.

Figura 5: Efecto de la adición de compuestos tiol en el medio de maduración in vitro sobre el contenido de GSH intracelular tras la MIV de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=3)



a,b: las columnas con diferentes superíndices difieren significativamente (t-Student, $P < 0.05$); *: tendencia respecto al grupo control ($P < 0.1$)

La Tabla 8 muestra el contenido de GSH intracelular de los ovocitos de cabras prepúberes en función de la presencia o no del primer corpúsculo polar (CP) tras 27 h de MIV, comparado con el contenido de GSH intracelular en los ovocitos inmaduros y de los ovocitos ovulados de cabras adultas. Los ovocitos que mostraron el CP en los tratamientos de cisteamina, cisteína, cistina y control presentaron una concentración superior ($P < 0.05$) de GSH intracelular (10.16 ± 1.52 , 13.5 ± 0.72 , 8.83 ± 0.72 y 10.57 ± 2.92 pmol/ovocito, respectivamente) comparados con los ovocitos inmaduros (4.15 ± 1.02 pmol/ovocito). En el tratamiento de β -mercaptoetanol, los ovocitos que exhibieron el CP mostraron una tendencia ($P = 0.0553$) a una mayor concentración de GSH (11.87 ± 5.71 pmol/ovocito) respecto a los ovocitos inmaduros, mientras que los

ovocitos que no exhibieron el CP mostraron un mayor contenido (9.67 ± 1.32 pmol/ovocito) respecto a los ovocitos inmaduros ($P < 0.05$). Por otro lado, los ovocitos madurados en presencia de cisteína y que mostraron el CP, presentaron un mayor contenido ($P < 0.05$) de GSH intracelular que los ovocitos madurados en el grupo control sin CP (3.56 ± 1.42 pmol/ovocito) y en el grupo cistina, tanto si mostraron (8.83 ± 0.72 pmol/ovocito) o no mostraron (7.01 ± 0.93 pmol/ovocito) el CP. Dentro del grupo control, los ovocitos que mostraron el CP exhibieron una tendencia ($P = 0.0868$) a poseer un mayor contenido de GSH intracelular (10.57 ± 2.92 pmol/ovocito) que los ovocitos que no lo mostraron (3.56 ± 1.42 pmol/ovocito).

Tabla 8: Efecto de la presencia o no de corpúsculo polar tras la MIV sobre el contenido de GSH intracelular de ovocitos de cabras prepúberes (réplicas=3)

Tratamiento	CP	Número total de ovocitos	pmol GSH/ovocito
Cisteamina	+	96	10.16 ± 1.52 ab
	-	97	5.74 ± 3.50 abc
β -mercaptoetanol	+	85	11.87 ± 5.71 abc *
	-	100	9.67 ± 1.32 ab
Cisteína	+	67	13.5 ± 0.72 a
	-	107	5.01 ± 4.77 abc
Cistina	+	70	8.83 ± 0.72 b
	-	103	7.01 ± 0.93 bc *
Control	+	68	10.57 ± 2.92 ab
	-	75	3.56 ± 1.42 bc
Inmaduros	Total	135	4.15 ± 1.02 c
Ovulados	Total	21	23.73

CP: corpúsculo polar; ^{a,b,c}: los valores en una misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (t-Student, $P < 0.05$); *: tendencia respecto a los ovocitos inmaduros ($P < 0.1$)

DISCUSIÓN

Síntesis de GSH intracelular

En el presente estudio, hemos comprobado que la presencia de cisteamina, β -mercaptoetanol, cisteína y cistina en el medio de MIV estimula la síntesis de GSH intracelular durante la MIV de ovocitos de cabras prepúberes. Este resultado corrobora estudios realizados con anterioridad, en los que se describe la síntesis de GSH durante la MIV de ovocitos bovinos, ovinos y porcinos en presencia de cisteamina (De Matos et al., 1995,1996,1997,1999; Nagai et al., 1996; Yamauchi y Nagai, 1999), β -mercaptoetanol (De Matos et al., 1996,1997, 1999; Abeydeera et al., 1998,1999; De Matos y Furnus, 2000), cisteína (De Matos et al., 1996, 1997; De Matos y Furnus, 2000; Yoshida et al., 1993; Sawai et al., 1997) y cistina (De Matos et al., 1996,1997; De Matos y Furnus, 2000). Sin embargo, el nivel de GSH intracelular en ovocitos de cabras prepúberes no se modificó tras la MIV en un medio libre de tioles, al contrario de lo observado durante la MIV en ausencia de compuestos tiol de ovocitos de ratón (Calvin et al., 1986), hámster (Perreault et al., 1988), cerdo (Yoshida et al., 1993) y vaca (Miyamura et al., 1995; De Matos, 1996).

Tras analizar los resultados anteriores, se podría pensar que los ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro únicamente son capaces de sintetizar GSH intracelular al ser madurados en presencia de compuestos tiol. Sin embargo, cabe resaltar que no todos los ovocitos cultivados alcanzan el estadio de MII tras la MIV. Así, se comprobó que los ovocitos de cabras prepúberes que maduraron nuclearmente (evaluado por la presencia del primer corpúsculo polar), incluso en ausencia de compuestos tiol, fueron capaces de sintetizar GSH, hecho demostrado por el incremento en el contenido de GSH intracelular de los ovocitos en estadio de MII tras la MIV respecto a los ovocitos inmaduros. Por tanto, podemos afirmar que los ovocitos de cabras prepúberes son capaces de sintetizar GSH a medida que progresan hacia el estadio de MII y que realmente existe una correlación entre la maduración nuclear y la síntesis de GSH, puesto que los ovocitos que no presentaron el primer corpúsculo polar no mostraron un incremento en el contenido de GSH intracelular tras la MIV. Este resultado corrobora el hallazgo de Perreault et al. (1988), quienes describieron que el nivel de GSH intracelular aumentaba durante el desarrollo y la maduración del ovocito de hámster en el ovario, a medida que el ovocito se aproxima al tiempo de ovulación. De este modo, los ovocitos de hámster ovulados, en estadio de MII, capaces de descondensar los núcleos de los espermatozoides, contenían más GSH, y además poseían más poder reductor que los ovocitos en vesícula germinal o en estadio pronuclear. En ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro sucede lo mismo, ya que el nivel de GSH intracelular es superior en los ovocitos en estadio de MII que en los ovocitos recuperados directamente del folículo, en estadio de VG.

Presencia del primer corpúsculo polar

Por otro lado, en el presente trabajo se intentó comparar el nivel de GSH intracelular entre los ovocitos que exhibieron el primer corpúsculo polar, y que por tanto se hallaban en estadio de MII, y los ovocitos que no lo exhibieron, es decir, que teóricamente no habían alcanzado el estadio de MII. La ausencia de diferencias en los niveles de GSH entre los dos grupos se debería a que los ovocitos que no presentaron corpúsculo polar no se hallarían únicamente en estadio de VG (probabilidad muy reducida, si tenemos en cuenta que este porcentaje fue inferior al 5% en todos los grupos), sino en estadios más avanzados de maduración, por lo que ya habrían comenzado la síntesis de GSH. Por tanto, en este grupo de ovocitos se encontrarían aquellos en

estadio de VG, GVBD, MI y An-Tel I, pero también aquellos ovocitos en MII a los que no se pudo observar el corpúsculo polar. De hecho, las tasas de maduración nuclear en este experimento, evaluadas por la presencia de corpúsculo polar bajo lupa binocular resultaron inferiores al 50%, mientras que las tasas de MII en el experimento anterior, evaluadas con tinción nuclear, fueron superiores al 65%, por lo que se confirmaría la presencia de ovocitos en MII en el grupo clasificado sin corpúsculo polar. Todos estos hallazgos conducen a la idea de que, para evaluar la capacidad de un compuesto para estimular la síntesis de GSH durante la MIV de los ovocitos de cabras prepúberes, deberíamos seleccionar únicamente los ovocitos en estadio de MII. La visualización de la presencia del corpúsculo polar bajo lupa binocular es un proceso lento y, tal y como hemos mencionado anteriormente, no es un método 100% fiable. Por tanto, una posibilidad sería que, antes de congelar los ovocitos para el análisis del nivel de GSH intracelular, evaluáramos su estadio de maduración nuclear mediante tinción de los ovocitos con Hoechst (Velilla et al., 1999).

Madurados in vitro versus ovulados

Los ovocitos ovulados de cabras adultas mostraron un mayor contenido de GSH intracelular respecto a los ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro. No tenemos conocimiento de estudios realizados en otras especies en los que se compare el contenido de dicho tripéptido entre ovocitos de animales adultos y prepúberes. Sin embargo, sí que se ha demostrado una mayor concentración de GSH en ovocitos ovulados comparado con los ovocitos madurados in vitro en hámster (Perreault et al., 1988) y cerdo (Yoshida et al., 1993). También se ha descrito una concentración más baja de GSH en embriones de ratón obtenidos tras FIV que fecundados in vivo (Gardiner y Reed, 1994). Por tanto, sería posible que estos niveles de GSH intracelular en los ovocitos caprinos madurados in vitro fueran inferiores a los obtenidos en ovocitos madurados in vivo, lo que explicaría, en parte, las bajas tasas de desarrollo observadas en este tipo de ovocitos. En el presente trabajo, aunque es destacable el elevado nivel de GSH detectado en los ovocitos ovulados de cabra adulta, no podemos concluir nada en este aspecto, ya que únicamente se evaluó una muestra con 21 ovocitos. Sin embargo, es posible que la concentración de GSH en los ovocitos inmaduros aumente al aproximarse a la pubertad, y sea superior en los ovarios de hembras adultas. Comparativamente, se ha demostrado que la concentración de GSH en el testículo de rata aumenta aproximadamente 3 veces entre los días 8 y 26 del desarrollo postnatal, coincidiendo con el inicio de la espermatogénesis, y se mantienen a un elevado nivel durante el posterior desarrollo testicular (Calvin y Turner, 1982). Por otro lado, el ambiente hormonal influye en la síntesis y la modulación de GSH en diversos tejidos. Así, se ha observado que las hormonas esteroideas de las gónadas regulan enzimas importantes en el mantenimiento del estatus y función del GSH, como la GSH-S-transferasa, γ -glutamyltranspeptidasa y GSH peroxidasa (Das et al., 1982; Igarashi et al., 1984) y el metabolismo hepato-renal del GSH (Hiramyana et al., 1987). También se ha mostrado que el estatus de glutatión en los hepatocitos de rata está regulado por varias hormonas (Lu et al., 1990) y que los estrógenos aumentan los niveles de GSH en el tejido expuesto (Suojanen et al., 1980). Además, la regulación del GSH en las células epiteliales del oviducto posiblemente depende del ambiente hormonal, y el estadio reproductivo influencia la síntesis de GSH y la regulación de la cisteína (McNutt-Scott y Harris, 1998). Toda esta información aporta evidencias sobre la importancia del ambiente hormonal en que se maduran los ovocitos, la edad y el estado reproductivo de las hembras de las que proceden los ovocitos, por lo que podrían explicarse

las diferencias en el contenido de GSH halladas en ovocitos de la misma especie entre diferentes estudios y entre ovocitos madurados in vitro y ovulados en un mismo estudio.

Las diferencias entre especies en los niveles de GSH ovocitario parecen estar correlacionadas con diferencias en la estabilidad de la cromatina espermática, en función del tipo de protamina presente. Según Perreault (1988) las especies que contienen protaminas 1 y 2 (p.ej., el ratón y el hámster) descondensan más rápido tras la microinyección dentro del ovocito que las que solamente contienen protamina 1 (por ejemplo, el toro). El semen de cerdo se parece al de toro en que sólo contiene la protamina 1, y probablemente es más estable y, por tanto, requiere más GSH para la descondensación (Yoshida et al., 1993). Posiblemente, el espermatozoide de macho cabrío contenga protaminas estables, por lo que los ovocitos caprinos necesitarían un elevado contenido de GSH para descondensar la cromatina, explicándose así los niveles de GSH detectados en los ovocitos inmaduros de cabras prepúberes, similares a los descritos en ovocitos bovinos inmaduros (Miyamura et al., 1995).

Formación del pronúcleo masculino

La formación del pronúcleo masculino depende de la activación del ovocito (Yanagimachi y Noda, 1970; Iwamatsu y Chang, 1975; Usui y Yanagimachi, 1976; Perreault et al., 1984). Además, se ha descrito que la síntesis de GSH durante la maduración ovocitaria es un prerrequisito para la descondensación de la cromatina del espermatozoide y el inicio de la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide en ovocitos de ratón (Calvin et al., 1986), hámster (Perreault et al., 1988; Perreault, 1990) cerdo (Yoshida et al. 1992, 1993; Yoshida, 1993; Grupen et al., 1994, 1995) y vaca (Miyamura et al., 1995; de Matos, 1995, 1996, 1997).

La descondensación espermática debe tener lugar más lentamente o de forma incompleta en ovocitos que contienen menor nivel de GSH de lo normal (insuficiente poder reductor), y esto debe resultar en el desarrollo asincrónico de los núcleos del ovocitos y del espermatozoide (Yoshida, 1993). Podríamos pensar, por tanto, que las reducidas tasas de formación del pronúcleo masculino y la elevada tasa de cabezas espermáticas sin descondensar detectadas en los ovocitos madurados in vitro de cabras prepúberes (Martino et al., 1995; Mogas et al., 1997) podrían deberse a que estos ovocitos poseen un nivel de GSH inferior a lo normal. Esta hipótesis se apoyaría en los elevados niveles de GSH detectados en ovocitos ovulados de cabras adultas, mencionados anteriormente, comparados con los ovocitos de cabras prepúberes madurados in vitro.

Cisteamina y β -mercaptoetanol

Maduración nuclear

La adición de tioles de bajo peso molecular como la cisteamina y el β -mercaptoetanol no mejoró la maduración nuclear hasta el estadio de MII. Tampoco Yamauchi y Nagai (1999) en porcino ni Gasparrini et al. (2000) en búfalo hallaron efecto de la cisteamina sobre el aumento de la maduración meiótica. Sin embargo, Nagai et al. (2000) observaron que, aunque en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de FSH la cisteamina no ejercía ningún efecto positivo sobre la maduración nuclear, en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de FSH, estimulaba la GVBD y mostraba una tendencia a aumentar la formación de MII. Años antes, en otro tipo de estudios, se había descrito que compuestos tiol de bajo peso molecular como β -mercaptoetanol y cisteamina promovían la viabilidad celular y

aumentaban varias reacciones celulares en linfocitos (Fanger et al., 1970) y en células de carcinoma embrionario (Rizzino y Sato, 1978; Oshima, 1978). En el presente estudio, podemos pensar que los efectos positivos observados para otros tipos celulares no se manifiestan como promotores de la maduración nuclear en los ovocitos.

Fecundación in vitro

La adición de cisteamina y de β -mercaptoetanol al medio de MIV de los ovocitos mejoró la formación de los 2 pronúcleos tras la FIV y, por tanto, disminuyó el porcentaje de ovocitos que no descondensaron la cabeza del espermatozoide. Es interesante el hecho de que el porcentaje de embriones totales formados a partir de los ovocitos madurados en dichos tratamientos coincide con el porcentaje de ovocitos que formaron ambos pronúcleos. Sin embargo, en el grupo control, la tasa de embriones totales es superior a la tasa de ovocitos que formaron los 2 pronúcleos. La diferencia se explicaría por la división anómala de ovocitos que no descondensaron la cabeza espermática, ya que el porcentaje de embriones totales corresponde en este caso a la suma de los ovocitos fecundados con 2 pronúcleos y los ovocitos que no formaron el pronúcleo masculino. Este dato concuerda con los resultados hallados por Villamediana et al. (2001), quienes hallaron que los ovocitos madurados en este mismo medio control proporcionaban un elevado porcentaje de embriones de 2-4 células con dotación cromosómica haploide. Por tanto, podemos afirmar que la maduración de ovocitos de cabras prepúberes en presencia de cisteamina y β -mercaptoetanol estimula la formación sincrónica de los pronúcleos tras la FIV y que, en consecuencia, disminuye el porcentaje de embriones haploides.

Se ha demostrado que la capacidad para formar el pronúcleo masculino en ovocitos de cerdo está correlacionado positivamente con las concentraciones intracelulares de GSH (Yoshida, 1993; Funahashi et al., 1994). En el presente trabajo, no hubo correlación entre estos parámetros, ya que la adición de cisteamina y β -mercaptoetanol al medio de MIV promovió la capacidad de los ovocitos de cabras prepúberes para descondensar la cabeza del espermatozoide y ser fecundados de forma normal, disminuyendo la asincronía o retraso en la formación del pronúcleo masculino, mientras que la adición de cisteína y cistina mostraron concentraciones similares de GSH intracelular sin estimular la formación del pronúcleo masculino. Este hallazgo podría resultar contradictorio. Sin embargo, es posible que compuestos tiol de bajo peso molecular como la cisteamina y el β -mercaptoetanol estén implicados directamente en la reducción de las uniones disulfido de las protaminas en la cromatina del núcleo del espermatozoide, un requisito para la formación del pronúcleo masculino (Mattioli et al., 1988). Perreault et al. (1984) sugirieron que la descondensación de la cabeza del espermatozoide requería la reducción de las uniones disulfido, pero no era suficiente para la formación del pronúcleo. Es importante señalar que la cantidad de GSH absoluta en el ovocito no es probablemente el único factor determinante en la capacidad descondensante, aunque sea aparentemente un factor limitante (Perreault et al., 1984). Además, existen estudios en los que indican que la descondensación de la cabeza del espermatozoide en el ovocito es tiempo y temperatura dependiente, sugestivo de un requerimiento enzimático (Perreault y Zirkin, 1983; Perreault et al., 1987). Anteriormente, Mahi y Yanagimachi (1975) habían propuesto que el GSH podría jugar un papel en la descondensación del núcleo del espermatozoide bien por reducción de los enlaces disulfido de las protaminas o bien por activación de un enzima sulfhidril que segmentara los enlaces disulfido. Además, Weisel y Schultz (1981) demostraron la

actividad de la glutatión reductasa en los ovocitos de ratón, la cual fluctuaba con el estado de maduración del ovocito y probablemente era importante para el mantenimiento del poder reductor de disulfidos del ovocito.

También se ha descrito un aumento en la formación del pronúcleo masculino y la formación sincrónica de los pronúcleos en porcino (Gruppen et al., 1995; Nagai et al., 1996) con la adición de cisteamina al medio de maduración. Gruppen et al. (1995) consideran que la adición de cisteamina al medio de cultivo es probablemente importante no sólo para la síntesis de GSH, sino también para la inhibición de la reducción espontánea de GSH durante la maduración in vitro de los ovocitos, ya que el contenido de GSH de los ovocitos desnudos cultivados sin cisteamina fue menor que en los ovocitos cultivados con BSO en un medio suplementado con cisteamina. Posiblemente, este sea otro de los factores que hace que la cisteamina y el β -mercaptoetanol mejoren la formación del pronúcleo masculino a pesar de exhibir la misma concentración de GSH que los ovocitos tratados con cisteína y cistina. En hámster, Kito y Bavister (1997) hallaron que la adición de cisteína o cisteamina al medio de MIV mejoraba la formación del pronúcleo masculino, pero únicamente con la utilización de cisteamina se alcanzaron valores similares a los de ovocitos madurados in vivo.

Desarrollo embrionario in vitro

Aparte del papel extracelular del GSH en la prevención de la peroxidación lipídica de membranas celulares (Thomas et al., 1988; Avissar et al., 1989; Del Corso, 1994), el GSH juega un papel muy importante como antioxidante celular (Meister y Anderson, 1983; Lafleur, 1994; Yu, 1994; Gaubin et al., 2000). Estudios previos han indicado que el desarrollo embrionario mejora con el aumento de los niveles de GSH intracelular en los ovocitos (De Matos et al., 1996; Abeydeera et al., 1998; De Matos y Furnus, 2000). En diversas especies se ha observado un aumento en la producción de embriones al aportar al medio de MIV compuestos tiol como cisteamina (De Matos et al., 1995, 1996, 1999; Gruppen et al., 1995; Yamauchi y Nagai, 1999; Gasparrini et al., 2000), β -mercaptoetanol (Abeydeera et al., 1998, 1999; De Matos y Furnus, 2000), cisteína (De Matos y Furnus, 2000) y cistina (De Matos et al., 1996, 1997; De Matos y Furnus, 2000). En el presente estudio, de los citados compuestos tiol evaluados, únicamente la cisteamina produjo un aumento en la producción in vitro de blastocistos. En ovinos, la cisteamina y el β -mercaptoetanol en el medio de MIV también estimularon la síntesis de GSH, pero solamente la cisteamina mejoró el desarrollo embrionario (De Matos et al., 1999), hallazgo que apoya nuestros resultados.

En nuestro trabajo, esta mejora en la producción de blastocistos por adición de cisteamina no se debe a la protección contra el daño oxidativo provocado por un aumento en la síntesis de GSH, como se ha descrito en otros estudios (bovino: De Matos et al., 1995, 1996; ovino: De Matos et al., 1999; porcino: Yamauchi y Nagai, 1999), ya que este aumento fue similar al resto de tratamientos evaluados. Por consiguiente, parte del mayor desarrollo hasta el estadio de desarrollo debe estar causado, entre otras causas, por un aumento en la formación de los 2 pronúcleos tras la FIV. En porcino, Gruppen et al. (1995) asumen que la mejora total en el desarrollo al añadir 500 μ m de cisteamina al medio de MIV puede ser atribuida en parte a una incidencia aumentada de la formación pronuclear sincrónica tras la fecundación. Sin embargo, el hecho de que la adición de 50 ó 500 μ m de cisteamina al medio de MIV aumentara la formación pronuclear sincrónica, mientras que solamente la concentración más alta estimulara de manera significativa el desarrollo embrionario, se explicaría por el hallazgo de que niveles aumentados de compuestos tiol en el citoplasma, acumulados durante la

maduración, pueden persistir en los embriones en división y ayudar a la división celular mitótica (Chance et al., 1979). Por consiguiente, quizás en nuestro estudio, la presencia de 100 μm de cisteamina permita una acumulación adecuada de tioles citoplasmáticos. Por otro lado, Lim et al. (1996) sugieren que el GSH, además de su papel como antioxidante, debe jugar un importante papel intracelular en estadios específicos del desarrollo embrionario bovino. En el ratón, el glutatión estaría involucrado en varios eventos embrionarios, incluyendo la proliferación celular y la diferenciación en estadios preimplantacionales más tardíos, y participaría en el metabolismo generador de energía como constituyente de co-enzimas. Además, este tripéptido también juega un papel importante en la termotolerancia de los embriones murinos preimplantacionales (Arechiga et al., 1995). En embriones de ratón, los blastocistos tienen la capacidad para sintetizar glutatión, pero los embriones que se desarrollan desde el estadio de 2 células hasta el estadio de mórula tienen una capacidad limitada para sintetizar glutatión (Gardiner y Reed, 1995). El GSH se acumula en el ovocito durante su desarrollo en el ovario, protegiendo al ovocito en estadios posteriores de la fecundación, por lo que los embriones en estadio temprano acumulan grandes cantidades de GSH originado en los ovocitos (Telford et al., 1990; Gardiner y Reed, 1995a,b). Así, el incremento del contenido en GSH proporciona a los ovocitos madurados *in vitro* grandes cantidades de GSH adecuadas para la protección de los embriones hasta el estadio de blastocisto, mejorando la eficiencia de la producción *in vitro* de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros (De Matos et al., 1995,1996). En el estudio de Takahashi et al. (1993), los embriones con bajas concentraciones de GSH podrían haber estado sujetos a daños oxidativos que resultaron en una baja tasa de desarrollo. Como hemos comentado anteriormente, la cisteamina es importante no sólo para la síntesis de GSH, sino también para la inhibición de la reducción espontánea de GSH en los ovocitos. Quizás los ovocitos madurados en presencia de cisteamina en nuestro estudio podrían haber acumulado dicho compuesto en el citoplasma, por lo que serían capaces de mantener un mayor contenido de GSH intracelular, mediante reducción del glutatión oxidado, en fases posteriores a la fecundación, lo cual mejoraría el desarrollo embrionario.

La cisteamina es un precursor de la hipotaurina, ya que *in vitro* se convierte a hipotaurina mediante oxidación (Huxtable, 1992). Se ha descrito el efecto positivo de la hipotaurina y la taurina (una hipotaurina oxidada) sobre el desarrollo embrionario (Reed et al., 1992; Dumoulin et al., 1992). Estos datos hicieron postular a Takahashi et al. (1993) que podría haber alguna contribución de la cisteamina con relación al efecto de la hipotaurina sobre el desarrollo de los embriones en sus experimentos. Quizás parte de la cisteamina que no contribuye a la síntesis de GSH durante la MIV se acumule en los ovocitos y se oxide a hipotaurina, provocando una mejora en el desarrollo posterior. Guyader et al. (1998) no mejoraron las tasas de división y desarrollo embrionario *in vitro* con la adición de 50, 100 o 250 μM de cisteamina en el medio de MIV de ovocitos bovinos, pero la adición de 0.5-1 mM de hipotaurina al medio de cultivo embrionario mejoró la producción y la calidad de los blastocistos. Además, la cisteína, aunque es esencial para la síntesis de GSH, también se requiere para el propio desarrollo del embrión preimplantacional (McNutt-Scott y Harris, 1998). Se ha observado que la cisteína es beneficiosa para el desarrollo del embrión preimplantacional en algunas especies. En el conejo, la cisteína es uno de los aminoácidos requeridos para la división al segundo estadio (Thibault, 1972). Sin embargo, se ha demostrado en hámster que 0.5 mM de cisteína son inhibitorios para el desarrollo embrionario de una célula hasta el estadio de blastocisto, y una concentración menor, 0.05 mM, mantiene el desarrollo normal (Bavister y

McKiernan, 1993). Quizás, la cisteína captada gracias a la cisteamina, y que no se emplea en la síntesis de GSH, sea utilizada posteriormente por el embrión en nuestro experimento.

Pese al aumento de la síntesis de GSH intracelular y la mejora en las tasas de formación del pronúcleo masculino y de desarrollo embrionario con la inclusión de cisteamina en el medio, los porcentajes de blastocistos logrados son reducidos. Esto podría deberse a que el GSH sintetizado durante la MIV sea insuficiente para estimular el posterior desarrollo o a que las vías metabólicas de biosíntesis del GSH tienen una actividad disminuida en ovocitos de cabras prepúberes. No obstante, existe la posibilidad de que no todo el GSH sintetizado sea detectado mediante el análisis espectrofotométrico. El GSH puede conjugarse con compuestos electrofílicos mediante el enzima glutatión-S-transferasa (revisado por Den Boer et al., 1989; Gaubin et al., 2000) y puede usarse como fuente intracelular de cisteína para la incorporación dentro de las proteínas (Meister y Anderson, 1983). Otro proceso puede implicar la salida de las células de compuestos relacionados con el GSH, incluyendo el glutatión oxidado (GSSG), disulfidos mixtos de GSH y conjugados de GSH (Meister y Anderson, 1983). En espermátides y espermatoцитos aislados de hámster, se observa una disminución gradual en el contenido de GSH durante una incubación prolongada, pero sin ser concomitante con una pérdida de viabilidad celular, ya que el contenido de ATP celular se mantiene (Den Boer et al., 1989). Las células del epitelio oviductal también pueden regular las reservas de GSH, que se puede perder mediante turnover, detoxificación y reacciones oxidativas (revisado por McNutt-Scott y Harris, 1998). Por tanto, quizás la síntesis de GSH sea correcta en los ovocitos de cabras prepúberes y el GSH sintetizado se desvíe hacia otras rutas metabólicas. En tal caso, el reducido porcentaje de blastocistos obtenidos en este tipo de ovocitos no estaría relacionado con la síntesis de GSH intracelular. De hecho, Boquest et al. (1998) opinan que la mayor producción de blastocistos producida con la adición de GSH al medio en su estudio no parece ser resultado de un aumento de GSH intracelular dentro del ovocito.

Cisteína y cistina

Maduración nuclear

En el presente estudio, la adición de cisteína y cistina no mejoró la maduración nuclear hasta MII, resultado que coincide con otro trabajo realizado en cabras prepúberes por Mayor et al. (2001) en nuestro laboratorio, en el cual tampoco se halló ningún beneficio sobre la adquisición de la competencia meiótica al madurar con diferentes concentraciones de cisteína. Sin embargo, la adición de L-cisteína mejoró significativamente las tasas de maduración en la MIV de ovocitos de gato doméstico (Luvoni et al., 1995), el único documento bibliográfico en que hemos observado un efecto positivo sobre la maduración nuclear.

Fecundación y desarrollo embrionario in vitro

La cisteína y la cistina, como suplementos del medio de maduración, tampoco aportaron ningún efecto positivo a la fecundación y el desarrollo embrionario in vitro, al contrario de lo observado en ovocitos de otras especies. Así, la adición de cisteína promovió la formación del pronúcleo masculino en ovocitos de hámster (Kito y Bavister, 1997) y cerdo (Yoshida et al., 1993; Sawai et al., 1997), y la presencia de cisteína (De Matos y Furnus, 2000) y cistina (De Matos et al., 1996, 1997; De Matos y Furnus, 2000) mejoró el posterior desarrollo embrionario en bovino. La cisteína no solamente participa en la síntesis de GSH, sino que también tiene otras

funciones. En el metabolismo in vivo de la cisteína se forman taurina, sulfatos y GSH (Weinstein et al., 1988; Coloso y Stipanuk, 1989; Stipanuk et al., 1990; Coloso et al., 1990; Malmeza et al., 1998). En el presente estudio, quizás parte de la cisteína que penetra en el ovocito se desvíe a otras vías metabólicas que no intervienen en la formación del pronúcleo masculino, lo que explicaría la falta de acción sobre la sincronía de los pronúcleos a pesar de mostrar niveles similares de GSH intracelular que los exhibidos tras madurar en presencia de cisteamina y β -mercaptoetanol. Por ejemplo, en el retículo endoplasmático, el plegamiento de las proteínas a menudo implica la formación de uniones disulfido, y las condiciones oxidantes requeridas en este orgánulo son mantenidas mediante pequeños tioles, principalmente cisteína y GSH (Carelli et al., 1997).

Sin duda, los tioles evaluados en el presente estudio (cisteamina, β -mercaptoetanol, cisteína, cistina) han actuado sobre la síntesis de GSH, por la cual cosa podemos manifestar que se produjo la entrada de dichos compuestos al interior del ovocito. El TCM199 contiene una cantidad muy pequeña de GSH (0.05 mg/l) y de su precursor, la cisteína (0.11 mg/ml), por lo que Luvoni et al. (1996) sugieren que la presencia de GSH, incluso en el grupo control, podría ser suficiente para proteger a los ovocitos del estrés oxidativo, y que la cisteína podría aportar un buen nivel de síntesis de GSH durante la MIV. Sin embargo, en nuestro caso hemos comprobado que la maduración en dicho medio, sin suplementos tiólicos, es insuficiente para promover la síntesis de GSH, la formación de los pronúcleos y el desarrollo embrionario. De hecho, previos hallazgos describen que la cisteína se metaboliza rápidamente (Meister, 1983) y que concentraciones tan bajas de cisteína no estimulan la síntesis de GSH (Yoshida et al., 1993) ni la formación del pronúcleo masculino (Yoshida et al., 1992). Estos hallazgos hacen ignorar el contenido original de cisteína al discutir los resultados a Sawai et al. (1997).

Como hemos comentado anteriormente, la síntesis de GSH depende de la disponibilidad de cisteína en el medio. La concentración de cisteína en el medio TCM199 utilizado en el presente estudio es muy baja (0.11 mg/ml) comparada con la de cistina (26 mg/ml). Fuera de la célula, en condiciones acuosas, la cisteína es inestable y, por tanto, no hay cisteína libre en el medio de maduración TCM199 debido a la autooxidación a cistina (Sagara et al., 1993; Bannai, 1984). Así, en condiciones fisiológicas, solamente un 10-20% de la cisteína libre total está presente en forma reducida (Bannai, 1984; Meier y Issels, 1995). En estudios realizados en linfocitos, se ha demostrado que la cisteína presente en el medio se oxida fácilmente, bajo condiciones normales de cultivo, para formar rápidamente cistina (Toohey, 1975; Mohindru et al., 1985) y se inhibe altamente la síntesis de GSH intracelular porque los linfocitos no pueden utilizar cistina para la síntesis de glutatión (Ishii et al., 1991). Tras la entrada a la célula, se supone una rápida reducción de la cistina a cisteína. En ovocitos, se ha postulado que la cistina se convierte a cisteína mediante las células del cumulus y entonces se incorpora a la síntesis de GSH durante la MIV (Yoshida, 1993; Takahashi et al., 1995; De Matos et al., 1996).

La incapacidad de los ovocitos porcinos para sintetizar suficiente GSH durante la MIV reduce su capacidad para formar el pronúcleo masculino tras la fecundación, por lo que la adición de cisteína al medio de maduración está asociado con un incremento en la síntesis de GSH, resultando en niveles de GSH comparables a los hallados en los ovocitos madurados in vivo (Yoshida et al., 1993). Además, el hallazgo de que las concentraciones de GSH se reducen cuando la cisteína no está presente en el medio de cultivo, sugiere que la cisteína es un sustrato externo que se requiere para la síntesis de GSH en los ovocitos de cerdo

que están madurando (Yoshida et al., 1993). También De Matos et al. (1996) observaron que la adición de cisteína al medio de maduración de ovocitos bovinos estimulaba la síntesis de GSH y argumentaron esta síntesis fue estimulada por la cantidad de cisteína libre presente en el medio de maduración en su estudio (0.6 mM), superior a la cisteína presente en el TCM-199 (0.6 μ M).

La biosíntesis de GSH se limita a la disponibilidad de cisteína, y bajo condiciones en las que el suministro de cisteína celular es insuficiente, como en el caso de la maduración en medio TCM199, se supone que la promoción de la captación de cisteína por otros compuestos incrementaría los niveles de GSH. Para la promoción de la captación de cisteína, los sistemas de transporte celular son de importancia crítica. La cistina y la cisteína se captan por diferentes sistemas de transporte, sin que se hayan demostrado interacciones entre los sistemas. En general, los sistemas de transporte varían de forma considerable entre tejidos. La cisteína se transporta al interior de las células por el sistema de transporte ASC (alanina, serina, cisteína), que transporta aminoácidos neutros, es Na⁺-dependiente y se distribuye de manera ubicuitaria entre los tipos celulares (Christensen, 1990). También la glutamina comparte este sistema de transporte (Bannai e Ishii, 1982). La acción estimulante de la cisteína sobre el incremento en el nivel de GSH intracelular en los ovocitos desnudos sugirió a De Matos et al. (1997) que dicho sistema de transporte debe estar presente y activo en los ovocitos bovinos, aunque este efecto de la cisteína mejoraba cuando los ovocitos estaban rodeados por células del cumulus. Posteriormente, Furnus et al. (1998) sugirieron que el sistema de transporte ASC para cisteína también debía estar presente en las células del cumulus, ya que observaron un bajo nivel de GSH tanto en los ovocitos como en las células del cumulus al añadir al medio glutamina a elevadas concentraciones. En porcino, Funahashi y Day (1995) observaron que el contenido en GSH no se vio afectado por la presencia de cisteína, pero que era inferior en los ovocitos desnudos respecto a los COCs, por lo que indicaron que para aumentar el contenido de GSH de los ovocitos era necesaria la presencia de células del cumulus, ya que durante la maduración, dichas células transportan a los ovocitos GSH o la capacidad para sintetizarlo. La captación de cistina está mediada por el sistema de transporte Xc⁻ en intercambio con el glutamato y es Na⁺-independiente (Makowske y Christensen, 1982). Algunas células expresan una alta actividad para este transporte de intercambio aniónico (ej.: los fibroblastos), en otras células es fuertemente inducible (ej.: macrófagos), mientras que otros tipos celulares, como los linfocitos, carecen de este transporte (Watanabe y Bannai, 1987; Ishii et al., 1992). La utilización de cistina marcada radioactivamente del medio para la biosíntesis de GSH demuestra que más del 90% de la radioactividad de la 35S en la fracción soluble de las células lisadas podrían recogerse en el pico de GSH, demostrándose que el GSH sintetizado de nuevo deriva del pool extracelular de cistina (Issels et al., 1988). En nuestro estudio, la presencia de cisteína y cistina durante la MIV proporcionó un incremento del contenido de GSH, lo que significa que, probablemente, uno de los sistemas de transporte ASC y Xc⁻, o bien ambos, están presentes y activos en los ovocitos de cabras prepúberes.

La adición de cisteamina y β -mercaptoetanol probablemente ayude a captar la cisteína y/o cistina presentes en el medio que no entran en la célula por sí solas, lo que explicaría en parte los beneficios aportados con su presencia en el medio. Las células de ovario de hámster chino (células CHO) se han utilizado como sistema modelo para el estudio de la promoción de cistina/cisteína in vitro en las células de mamífero, y tienen una capacidad limitada para utilizar la cistina extracelular (Issels et al., 1988). Se ha demostrado que la adición de tioles extracelulares al medio influyen los niveles de GSH intracelular de las células CHO (Issels et al.,

1988). En concreto, la cisteamina incrementa el GSH intracelular en las células de linfoma de ratón (Ishii et al., 1981; Zmuda y Friedenson, 1983) y en las células CHO (Issels et al., 1988). La adición de cisteamina al medio de cultivo provoca un incremento pronunciado de consumo de [35S]cistina en las células CHO (Issels et al., 1988; Meier y Issels, 1995) y en las células LAK comparado con las células control no tratadas. Los compuestos tiol de bajo peso molecular como β -mercaptoetanol y cisteamina reducen cistina a cisteína y promueven la captación de cisteína que aumenta la síntesis de GSH, por lo que la adición de estos compuestos podría prevenir la completa oxidación de cisteína a cistina (Ishii et al., 1981; Bannai, 1984; Issels et al., 1988; Ishii et al., 1981). La captación promovida por cisteamina ocurre en mayor parte probablemente en forma de cisteína, que se transporta principalmente mediante el sistema ASC en la mayoría de tipos celulares. La cisteína extracelular también puede reaccionar espontáneamente con otros compuestos tiol para formar disulfidos mixtos bajo ciertas condiciones, y aparte del sistema ASC, también es probable la captación de disulfidos mixtos cisteína-cisteamina mediante el sistema L, que es Na^+ -independiente (Christensen, 1990; Meier y Issels, 1995). Ishii et al. (1981) describieron que el tratamiento de las células L-1210 de ratón con linfoma aumentaba el movimiento del sulfuro a través de la membrana plasmática, y ocurría en forma de disulfido mixto hidroxil-terminal mediante el sistema L. Estos compuestos transportan cisteína mediante la formación de conjugados, ya que reaccionarían con la cisteína y posiblemente reaccionarían con la cistina por intercambio sulfhidril-disulfido para formar disulfidos mixtos cisteína-cisteamina y cisteína- β -mercaptoetanol, por lo que el aumento de transporte de membrana ocurriría por un sistema diferente del empleado normalmente por la cistina (Ishii et al., 1981). También se ha mostrado que las células de mamífero captan disulfidos mixtos similares mediante un transportador de leucinas y se separan dentro de la célula para disponer de una fuente de cisteína (Ishii et al., 1981). En conclusión, la promoción de la captación de cisteína inducida por tioles extracelulares en las células CHO necesita 2 pasos diferentes: primero, la formación de cisteína y disulfidos de cisteína mixtos por reacción de los tioles añadidos con la cistina extracelular y, segundo, la captación de cisteína y/o los disulfidos mixtos mediante los sistemas de transporte celulares. Por tanto, en el presente estudio, hipotetizamos que los compuestos de bajo peso molecular (cisteamina y β -mercaptoetanol) podrían haber facilitado la captación de la cisteína de 2 formas: reduciendo la cistina a cisteína y facilitando la captación de ésta vía sistema ASC, o formando conjugados mixtos, y entrando vía sistema L. De este modo, se produciría una mayor eficiencia en la entrada de cisteína en el ovocito respecto a la adición de cisteína o cistina solo. Una vez disgregados los conjugados dentro del ovocito, los compuestos resultantes podrían participar en las diferentes funciones celulares promotoras de la formación del pronúcleo masculino y el desarrollo embrionario.

Los resultados de este estudio, evaluados conjuntamente, reflejan que el nivel de GSH intracelular en los ovocitos de cabras prepúberes no es un marcador útil para predecir la eficacia de los compuestos añadidos al medio de MIV para estimular la maduración citoplasmática. Basamos esta deducción en el hecho de que la inclusión de cisteamina o β -mercaptoetanol en el medio de MIV, a pesar de mejorar el desarrollo tras la FIV, no proporcionó niveles superiores de GSH intracelular que el resto de tratamientos. Por tanto, el contenido de GSH intracelular no estaría correlacionado con la competencia de los ovocitos de cabras prepúberes para soportar el desarrollo embrionario in vitro. Este dato contrasta con los estudios realizados en porcino, ya que se ha sugerido que la concentración de GSH intracelular puede ser un marcador valioso para valorar la competencia de desarrollo de los ovocitos tras la FIV (Abeydeera et al., 1998). Anteriormente, Funahashi y

Day (1994) habían sugerido que el contenido de GSH intracelular de los ovocitos porcinos al final de la MIV parecería reflejar el grado de maduración citoplasmática.

En conclusión, la presencia de cisteamina en el medio de maduración in vitro estimula la maduración citoplasmática de los ovocitos de cabras prepúberes, ya que promueve la formación del pronúcleo masculino y el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Prather R, Day B (1998) Presence of b-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 50:747-756

Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Prather R, Day B (1999) Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote* 7:203-210

Anderson M (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzimol* 113:548-555

Arechiga C, Eary A, Hansen P (1995) Evidence that glutathione is involved in thermotolerance of preimplantation murine embryos. *Biol Reprod* 52:1296-1301

Avissar N, Whitin J, Allen P, Wagner D, Liegey P, Cohen H (1989) Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 264:15850-15855

Bannai S, Ishii T (1982) Transport of cystine and cysteine and cell growth in cultured human diploid fibroblasts: effect of glutamate and homocysteate. *J Cell Physiol* 122:265-272

Bannai S (1984) Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 779:289-306

Bannai S, Takada A, Kasuga H, Tateishi N (1986) Induction of cystine transport activity in isolated rat hepatocytes by sulfobromophthalein and other electrophilic agents. *Hepatology* 6:1361-1368

Brackett B, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 12:260-274

Calvin, HI and Turner, SI. High levels of glutathione attained during postnatal development of rat testis. *J Exp Zool* 219, 389-393. 1982.

Calvin H, Grosshans K, Blake E (1986) Estimulation and manipulation of glutathione levels in prepubertal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gam Res* 14:265-275

Carelli S, Ceriotti A, Cabibbo A, Fassina G, Ruvo M, Sitia R (1997) Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. *Science* 277:1681-1684

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Phys Rev* 59:527-605

Christensen H (1990) Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Phys Rev* 70:43-77

Coloso R, Stipanuk M (1989) Metabolism of cyst(e)ine in rat enterocytes. *J Nutr* 119:1914-1924

Coloso R, Drake M, Stipanuk M (1990) Effect of bathocuproine disulfonate, a copper chelator, on cyst(e)ine metabolism by freshly isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 259:E433-E450

Das M, Agarwal A, Seth P (1982) Regulation of brain and hepatic glutathione-S-transferase by sex hormones in rats. *Biochem Pharmacol* 31:3927-3930

De Felici M, Dolci S, Siracusa G (1987) Involvement of thiol-disulfide groups in the sensitivity of fully grown mouse oocytes to calcium-free medium. *J Exp Zool* 243:283-287

De Matos D, Furnus C, Moses D, Baldassarre H (1995) Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Rep Dev* 42:432-436

De Matos D, Furnus C, Moses D, Matkovic M (1996) Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Rep Dev* 45:451-457

- De Matos D, Furnus C, Moses D (1997) Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57:1420-1425
- De Matos D, Gasparini B, Furnus C, Thompson J (1999) Glutathione synthesis during in vitro maturation of ovine oocytes: effect of cysteamine and b-mercaptoethanol. *Theriogenology* 51:368
- De Matos D, Furnus C (2000) The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of b-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53:761-771
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U (1994) Thiol dependent oxidation of enzymes: The last chance against oxidative stress. *Int J Biochem* 26:745-750
- Den Boer P, Mackenback P, Grootegoed J (1989) Glutathione metabolism in cultured Sertoli cells and spermatogenic cells from hamsters. *J Reprod Fert* 87:391-400
- Dumoulin J, Evers J, Bras M, Pieters M, Geraedts J (1992) Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* 94:373-380
- Fanger M, Hart D, Wells J (1970) Enhancement by reducing agent of the transformation of human and rabbit peripheral lymphocytes. *J Immunol* 105:1043-1045
- Funahashi H, Cantley T, Stumpf T, Terlouw S, Day B (1994) Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 51:633-639
- Funahashi H, Day B (1995) Effects of cumulus cells on glutathione content of porcine oocytes during in vitro maturation. *J Anim Sci* 73 (Suppl):90
- Furnus C, De Matos D, Moses D (1998) Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Rep Dev* 51:76-83
- Gardiner C, Reed D (1994) Status of glutathione during oxidant-induced stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 51:1307-1314
- Gardiner C, Reed D (1995) Glutathione redox cycle-driven recovery of reduced glutathione after oxidation by tertiary-butyl hydroperoxide in preimplantation mouse embryos. *Arch Biochem Biophys* 321:6-12
- Gardiner C, Reed D (1995) Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys* 318:30-36
- Gasparini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L (2000). Effect of cysteamine during IVM on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54:1537-1542
- Gruppen C, Nagashima H, Nottle M (1994) Cysteamine enhances synchronous pronuclear formation in porcine oocyte matured and fertilized in vitro. *Proc 26th An Confer Austr Soc Reprod Biol, Brisbane, Australia* 26-28
- Gruppen C, Nagashima H, Nottle M (1995) Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod* 53:173-178
- Guyader-Joly C, Guerin P, Renard J, Guillaud J, Ponchon S, Menezo Y (1998) Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. *Amino Acids* 15:27-42
- Hiramyana K, Yasutake A, Inoue M (1987) Effect of sex hormones on the fate of methylmercury and on glutathione metabolism in mice. *Biochem Pharmacol* 36:1919-1924
- Huxtable R (1992) Physiological actions of taurine. *Phys Rev* 72:101-163
- Igarashi T, Satoh T, Ono S, Iwashita K, Hosokawa M, Ueno K, Kitagawa H (1984) Effect of steroidal sex hormones on the sex-related differences in the hepatic activities of gamma-glutamyltranspeptidase, glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 45:225-232
- Ishii T, Bannai S, Sugita Y (1981) Mechanism of growth stimulation of L1210 cell by 2-mercaptoethanol in vitro. *J Biol Chem* 256:12387-12392
- Ishii T, Hishimura I, Bannai S, Sugita Y (1981) Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *J Cell Physiol* 107:283-293
- Issels R, Nagele A, Eckert K, Wilmanns W (1988) Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetyl-cysteine. *Biochem Pharmacol* 37:881-888
- Iwamatsu T, Chang M (1972) Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various time during maturation. *J Reprod Fert* 31:237-247

- Izquierdo D, Villamediana P, Paramio M (1999) Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 52:847-861
- Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J, Izaike Y (1999) Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J Reprod Fert* 116:143-156
- Kito S, Bavister B (1997) Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fert* 110:35-46
- Laffleur M, Hoorweg J, Joenje H, Westmijze E, Retel J (1994) The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against single oxygen. *Free Radical Res* 21:9-17
- Lim J, Liou S, Hansel W (1996) Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of b-mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 46:429-439
- Lu S, Garcia-Ruiz C, Kuhlenkamp J, Ookhtens M, Salas-Prato M, Kaplowitz N (1990) Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem* 265:16088-16095
- Luvoni G, Colombo G (1995) Effect of L-cysteine on in vitro maturation of domestic cat oocytes. In: Enne G, Greppi GF, Lauria, A (Eds), *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy*, Elsevier Paris 403-404
- Luvoni G, Kenkistepe L, Brackett B (1996) Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Rep Dev* 43:437-443
- Mahi C, Yanagimachi R (1975) Induction of nuclear descondensation of mammalian spermatozoa in vitro. *J Reprod Fert* 44:293-296
- Makowske M, Christensen H (1982) Contrasts in transport systems for anionic amino acids in hepatocytes and a hepatoma cell line HTC. *J Biol Chem* 257:5663-5670
- Malmezat T, Breuillé D, Pouyet C, Patureau Mirand P, Obled C (1998) Metabolism of cysteine is modified during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr* 128:97-105
- Martino A, Mogas T, Palomo M, Paramio M (1995) In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43:473-485
- Mayor P, López-Béjar M, Rodríguez-González E, Velilla E, Fenech M, Paramio, MT (2001) Effects of the addition of glutathione during maturation on in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 55
- McNutt-Scott T, Harris C (1998) Modulation of intracellular glutathione and cysteine metabolism in bovine oviduct epithelial cells cultured in vitro. *Biol Reprod* 59:314-320
- Meier T, Issels R (1995) Promotion of cyst(e)ine uptake. *Methods Enzymol* 252:103-112
- Meister A, Anderson M (1983) Glutathione. *An Rev Biochem* 52:711-760
- Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220:472-477
- Meister A (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; application in search and therapy. *Pharm Therap* 51:155-194
- Meister A, Tate S (1976) Glutathione and the related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *An Rev Biochem* 45:559-604
- Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M (1995) Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 43:282
- Mogas T, Palomo M, Izquierdo D, Paramio M (1997) Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 48:815-829
- Mohindru A, Fisher J (1985) Endogenous copper is cytotoxic to a lymphoma in primary culture which requires thiols for growth. *Experientia* 41:1064-1066
- Nagai T, Geshi M, Yonai M, Yamauchi N (1996) Effects of cysteamine and cumulus cells on maturation and male pronucleus formation in porcine oocytes. *Theriogenology* 47:196
- Ohmori H, Yamamoto I (1983) Mechanism of augmentation of the antibody response in vitro by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. *Cell Immunol* 79:173-185
- Oshima R (1978) Stimulation of the clonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cells by beta-mercaptoethanol. *Differentiation* 11:149-155

- Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge M, Crister E, Eyeston W, First N (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600
- Perreault S, Zirkin B (1983) Mechanisms of sperm nuclear decondensation in mammalian oocytes. *J Cell Biol* 97:26A
- Perreault S, Wolff R, Zirkin B (1984) The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Develop Biol* 101:160-167
- Perreault S, Naish S, Zirkin B (1987) The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol Reprod* 36:239-244
- Perreault S, Barbee R, Slott V (1988) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Develop Biol* 125:181-186
- Perreault S (1990) Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. In *Fertilization in mammals*. Eds BD Bavister, J Cummins and ERS Roldan. Serono Symposia, Norwell, MA 285-296
- Reed M, Illera M, Petters R (1992) In vitro culture of pig embryos. *Theriogenology* 37:95-109
- Rizzino A, Sato G (1978) Growth of embryonal carcinoma cells in serum-free medium. *Proc Natl Aca Sci USA* 75:1844-1848
- Sagara J, Miura K, Bannai S (1993) Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* 61:1667-1671
- Sawai K, Funahashi H, Niwa K (1997) Stage-specific requirement of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis is associated with male pronuclear formation. *Biol Reprod* 57:1-6
- Smith C, Jones D, Guenther T, Lash L, Lauterburg B (1996) Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:1-12
- Stipanuk M, De La Rosa J, Hirschberger L (1990) Catabolism of cyst(e)ine by rat renal cortical tubules. *J Nutr* 120:450-458
- Suojanen J, Gay R, Hilf R (1980) Influence of estrogen on glutathione levels and glutathione-metabolizing enzymes in uteri and R3230AC mammary tumors in rat. *Biochim Biophys Acta* 630:485-496
- 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 embryos. *Biol Reprod* 49:228-232
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Okano A (1995) Effect of co-culture cells on the uptake of cystine into bovine embryos. *Theriogenology* 43:332
- Takahashi Y, First N (1992) In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963-978
- Telford N, Watson A, Schultz G (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Rep Dev* 26:90-100
- Tervit H, Whittingham D, Rowson L (1972) Successful culture of in vitro sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 30:493-497
- Thibault C (1972) Final stages of mammalian oocyte maturation. In *Oogenesis*. Eds JD Biggers and AW Schuetz. University Park Press, Baltimore, Butterworth, London 397-411
- Thomas E, Learn D, Jefferson M, Weathered W (1988) Superoxide-dependent oxidation of extracellular reducing agents by isolated neutrophils. *J Biol Chem* 263:2178-2186
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27:502-522
- Toohy J (1975) Sulfhydryl dependence in primary explant hematopoietic cells. Inhibition of growth in vitro and vitamin B12 compounds. *Proc Natl Aca Sci USA* 72:73-77
- Usui N, Yanagimachi R (1976) Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J Ultrastruct Res* 57:276-288
- Velilla E, López-Béjar M, Rodríguez-González E, Vidal F, Paramio, MT (1999). Viability of prepubertal goat oocytes after Hoechst staining and U_v exposition. *Proc 15th AETE Meeting, Lyon:236*
- Villamediana P, Vidal F, Paramio MT (2001) Cytogenetic analysis of caprine 2- to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* 9:(en prensa)
- Weinstein C, Haschemeyer R, Griffith O (1988) In vivo studies of cysteine metabolism. Use of D-cysteinesulfinate, a novel cysteinesulfinate decarboxylase inhibitor, to probe taurine and pyruvate synthesis. *J Biol Chem* 263:16568-16579

- Wiesel S, Schultz G (1981) Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gam Res* 4:25-34
- Yamauchi N, Nagai T (1999) Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 61:828-833
- Yanagimachi R, Noda Y (1970) Electron microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg. *Am J Anat* 128:429-462
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel V (1992) Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Rep Dev* 31:68-71
- Yoshida M (1993) Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Rep Dev* 35:76-81
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel V (1993) Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance of the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 49:89-94
- Younis A, Zuelke K, Harper K, Oliveira M, Brackett B (1991) In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 44:1177-1182
- Yu B (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Phys Rev* 74:139-162
- Zmuda J, Friedenson B (1983) Changes in intracellular glutathione levels and unstimulated lymphocytes in the presence of 2-mercaptoethanol or cysteine. *M Immunol* 130:362-364