

Caracterización transcriptómica y celular de la competencia ovocitaria en alpaca (*Vicugna pacos*)

Juana Quispe^{ab}, Zeze Bravo^{ab}, Luz Toribio^{ab}, Samuel Cusiwallpa^a, Gloria Lévano^{ab}, Martha Valdivia^{ab}

FILIACIONES

a. Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, Instituto de Investigación “Antonio Raimondi,” Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru
b. Grupo de investigación Biotecnología Reproductiva para la conservación y mejora genética animal (BIOTRA)

CORREOS DE AUTORES

juanalady.quispe@unmsm.edu.pe
zbravog@unmsm.edu.pe
mvaldiviac@unmsm.edu.pe
luzandrea.toribio@unmsm.edu.pe
samuelcc.2505@gmail.com
gloria.levano1@unmsm.edu.pe
mvaldiviac@unmsm.edu.pe

CONTENIDO

La identificación de ovocitos con alta competencia de desarrollo sigue siendo un desafío importante para la producción de embriones *in vitro* en alpaca. Aunque la prueba con azul de cresilo brillante (BCB) ha permitido clasificar los ovocitos de alpaca según su potencial de desarrollo, evidenciando que los ovocitos BCB positivos presentan mayores tasas de maduración y desarrollo embrionario en comparación con los BCB negativos [1], los procesos biológicos que subyacen a esta clasificación aún no han sido caracterizados en esta especie. En este estudio, se realizó una caracterización integral de la competencia ovocitaria mediante la integración de análisis transcriptómicos a nivel de célula individual y evaluación celular por microscopía confocal en ovocitos en estadio de vesícula germinal, clasificados como BCB positivos (BCB+) y BCB negativos (BCB-).

Para ello, los ovocitos de alpaca fueron recuperados de ovarios obtenidos post mortem (24 h) y clasificados mediante tinción con 26 μ M de azul de cresilo brillante (BCB) (Figura 1). Posteriormente, los complejos cúmulo-ovocito (COCs) fueron evaluados mediante microscopía confocal láser de barrido para determinar el tamaño ovocitario (diámetro), los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) (6 experimentos independientes; $n = 87$ BCB- y $n = 61$ BCB+) y la configuración de la cromatina mediante tinción con Hoechst ($n = 20$). Para el análisis transcriptómico, los ovocitos fueron denudados, liberados de la zona pelúcida y procesados individualmente para RNA-seq ($n = 4$ por grupo). Las lecturas de secuenciación fueron alineadas al genoma de referencia de alpaca utilizando STAR, y el análisis de expresión diferencial se realizó con DESeq2 ($|\log_2 \text{fold change}| > 1$; valor ajustado de $p < 0.05$).

A nivel celular, los ovocitos BCB+ presentaron un mayor diámetro en comparación con los BCB- ($p < 0.05$). Se identificaron distintos patrones de organización de la cromatina, desde configuraciones difusas hasta



Figura 1. Clasificación de ovocitos mediante tinción BCB. BCB+ (flecha roja), BCB- (flecha azul)

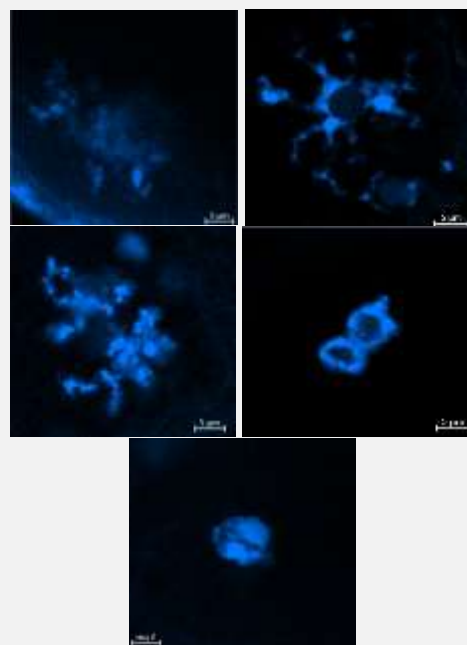


Figura 2. Patrones de organización de la cromatina en ovocitos inmaduros. Grado de compactación (C0 – C4)

altamente compactas (C0–C4) (Figura 2). Las configuraciones más compactas (C3–C4) fueron predominantes en ovocitos BCB+ e incluyeron patrones compatibles con estados avanzados de organización nuclear (tipo SN y ED-like), caracterizados por alta compactación de la cromatina y ausencia de nucléolo visible [2]. En cuanto al estado redox, no se observaron diferencias en los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre grupos (BCB+: 60.88 ± 15.23 ; BCB–: 62.28 ± 20.77). A nivel molecular, el análisis transcriptómico unicelular reveló una clara separación entre grupos (PC1 = 64.8% de la varianza) (Figura 3) y la identificación de 2,978 genes expresados diferencialmente (Figura 4). Los ovocitos BCB+ mostraron una mayor expresión de genes asociados a metabolismo del DNA, progresión del ciclo celular y actividad mitocondrial, incluyendo reguladores clave como CDK1, CCNB2, MAD2L1 y AURKB, así como genes implicados en biogénesis mitocondrial (TFAM, PPARGC1A/B) y cadena respiratoria (NDUFA9, UQCRC2, ATP5F1A). Este perfil se acompañó de cambios en la regulación redox, evidenciados por la sobreexpresión de PRDX2 y la disminución de FOXO1. Por el contrario, los ovocitos BCB– presentaron enriquecimiento en procesos relacionados con biosíntesis de RNA y regulación de la expresión génica y estabilidad del mRNA [3].

En conjunto, estos resultados indican que la competencia ovocitaria en alpaca está asociada a un estado coordinado que integra mayor tamaño celular, mayor grado de organización de la cromatina (resultados preliminares) y un programa transcriptómico orientado a la preparación meiótica y la función mitocondrial, acompañado de cambios en la regulación redox que permiten mantener niveles estables de ROS. Esta aproximación integrativa aporta una visión más completa del estado funcional del ovocito y contribuye a la comprensión de los mecanismos asociados a su competencia de desarrollo.

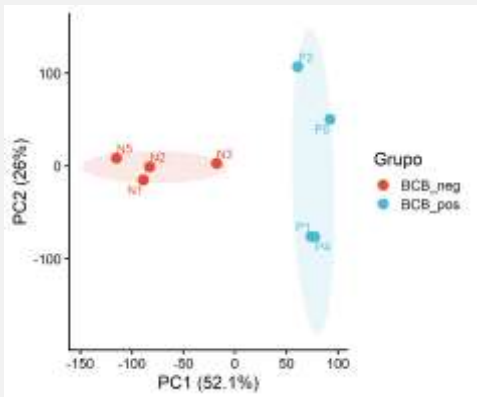


Figura 3. PCA del transcriptoma de ovocitos BCB+ y BCB–

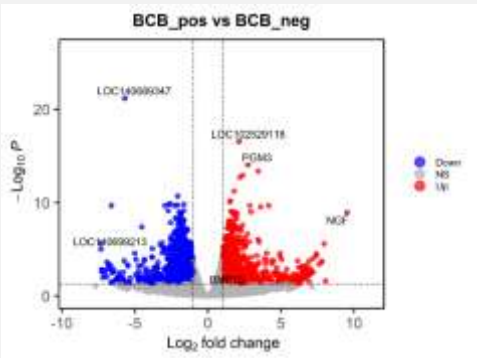


Figura 4. Análisis de expresión diferencial (volcano plot) entre ovocitos BCB+ y BCB–

REFERENCIAS

[1] Vargas-Donayre, D. et al. Effect of Brilliant cresyl blue (BCB) staining in oocyte’s maturation and parthenogenetic activation in alpaca (*Vicugna pacos*) oocytes. *Small Ruminant Research*, 231, 107175 (2024)

[2] Liu-Zhu, P. et al. A new classification of the germinal vesicle chromatin configurations in pig oocytes, *Biology of Reproduction*, Volume 99, Issue 6 (2018).

[3] Liu, X. et al. Single-cell transcriptome sequencing reveals that cell division cycle 5-like protein is essential for porcine oocyte maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(5), 1767–1780 (2018)

PALABRAS CLAVES	Ovocitos de alpaca	Azul de cresilo brillante	Transcriptómica	Microscopía confocal
-----------------	--------------------	---------------------------	-----------------	----------------------