



Universidad Científica del Sur

Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“DESCRIPCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN Y ACTIVIDAD  
MITOCONDRIAL EN OVOCITOS INMADUROS DE ALPACA”

Tesis para Optar el Título Profesional de:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PAULA LUCÍA QUIJANO SAAVEDRA

BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LIMA – PERÚ

2019

## Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 17:00 horas del 10 de Diciembre de 2018, en el Aula L - 105 del Campus Villa II, bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 104-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2018**, presidido por el Dr. Alexei Santiani Acosta, Mg. Boris Lira Mejía, Mg. Jorge Luis Vilela Velarde y la Mg. Shirley Evangelista Vargas como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis **“DESCRIPCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN OVOCITOS INMADUROS DE ALPACA”**.

El presidente concedió el uso de la palabra a la Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Quijano Saavedra Paulà Lucía**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, la bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... *Dieciocho* ..... (18)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 18:00hrs.



.....  
**Dr. Alexei Santiani Acosta**  
Presidente



.....  
**Mg. Boris Lira Mejía**  
Miembro



.....  
**Mg. Jorge Luis Vilela Velarde**  
Miembro



.....  
**Mg. Shirley Evangelista Vargas**  
Director - Observador

022-2018

T // (51) 610 6400  
opción 2  
[www.cientifica.edu.pe](http://www.cientifica.edu.pe)

Campus  
Panamericana Sur  
km 19 - Lima 42

A mi mamá Vilma, por el  
esfuerzo y sacrificio día  
a día estos años. Eres  
la mejor, te amo.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por un día más de vida.

A mi familia por su paciencia incondicional durante toda mi vida universitaria.

A mi directora de tesis Mg. Shirley Evangelista Vargas, mi guía y amiga, por enseñarme y aconsejarme en todo el desarrollo de la tesis y sustentación.

Al Dr. Alexei Santiani Acosta, por haberme apoyado en el proceso de realización de mi tesis, su apoyo complementario y consejos fueron vitales.

A mis compañeros tesisistas de laboratorio, especialmente a Bruna y Alejandra por haberme apoyado con el procesamiento de las muestras.

A Diego, por la paciencia de acompañarme y apoyarme en todo el proceso del desarrollo de la tesis.

## ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	14
2.1 Ovogénesis	14
2.2 Relación del desarrollo folicular y la fecundación	15
2.3 Clasificación de ovocitos inmaduros	16
2.4 Características de la mitocondria en el ovocito	17
2.4.1 Estructura mitocondrial	19
2.5 Distribución mitocondrial	20
2.5.1 Distribución citoplasmática	21
2.5.2 Agregados mitocondriales	22
2.6 Actividad mitocondrial	23
2.6.1 Potencial de membrana mitocondrial	24
2.7 Empleo de Fluorocromos para evaluación mitocondrial	24
2.7.1 Fluorocromos para localización de mitocondrias	25
2.7.1.1 MitoTracker Green FM	25
2.7.2 Fluorocromos para medir actividad mitocondrial	25
2.7.2.1 Tetramethylrhodamine, ethyl ester y methyl ester	26
2.7.2.2 Mitochondrial Membrane Potential Probe (JC-1 y JC-9)	26
2.7.2.3 MitoTracker Orange y MitoTracker Red	26
2.7.2.4 MitoTracker Red CMXRos	27
2.8 Evaluación mitocondrial como herramienta para las biotecnologías reproductivas	29

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1 Lugar de estudio	32
3.2 Obtención de las muestras	32
3.3 Manejo de las muestras	33
3.4 Evaluación de la actividad mitocondrial	36
3.5 Evaluación de resultados mediante microscopia de fluorescencia	37
3.5.1 Controles de fluorescencia	37
3.6 Análisis de resultados	39
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>VI. CONCLUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Categorías de COCs bovinos.	17
<b>Figura 2.</b> Fosforilación oxidativa.	20
<b>Figura 3.</b> Ingreso del Fluorocromo MitoTracker Red CMXRos a la mitocondria	28
<b>Figura 4.</b> Ovarios con folículos (alpaca).	33
<b>Figura 5.</b> Retiro de tejido conectivo de ovarios de alpaca.	34
<b>Figura 6.</b> Aspiración de folículos.	34
<b>Figura 7.</b> Calidades de ovocitos de alpaca.	35
<b>Figura 8.</b> Desnudamiento de ovocitos.	36
<b>Figura 9.</b> Comparación de emisión de fluorescencia.	42
<b>Figura 10.</b> Patrones de distribución mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca.	45

**ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Categorías de clasificación COCs.	35
<b>Cuadro 2.</b> Control de fluorescencia en ovocitos de alpaca usando MitoTracker Red CMXRos	38
<b>Cuadro 3.</b> Medidas de tendencia central y dispersión para actividad mitocondrial por calidades y población total de ovocitos inmaduros de alpaca.	40
<b>Cuadro 4.</b> Cuadro de cajas y bigotes para calidades de ovocitos de alpaca.	41
<b>Cuadro 5.</b> Porcentajes de actividad mitocondrial por calidades de ovocitos de alpaca.	42
<b>Cuadro 6.</b> Porcentajes de distribución citoplasmática por calidad de ovocitos de alpaca.	43
<b>Cuadro 7.</b> Porcentajes de agregados mitocondriales por calidades de ovocitos de alpaca.	44
<b>Cuadro 8.</b> Interacción de parámetros de distribución mitocondrial para la población total de ovocitos inmaduros de alpaca	44



## RESUMEN

La mitocondria cumple un papel vital en el metabolismo energético del ovocito, dentro del cual la actividad y distribución mitocondrial son dos parámetros válidos e importantes para decir que un ovocito es competente. El objetivo de este estudio fue describir los diferentes patrones de distribución y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca empleando el fluorocromo MitoTracker Red CMXRos. Se trabajó con ovarios obtenidos del Camal Municipal de Huancavelica, los cuales fueron remitidos a Lima en suero fisiológico a 4°C en las siguientes 10 a 16 horas, para procesarse en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas y Celulares de la Universidad Científica del Sur (UCSUR). Una vez en el laboratorio, se realizó la aspiración de folículos con diámetro entre 3-4 mm, utilizándose el sedimento para la búsqueda de ovocitos en un estereoscopio a 40X. En total se trabajaron con 132 ovocitos inmaduros, los cuales una vez clasificados en base a su calidad fueron desnudados por medio de pipeteo suave, a fin de ser incubados con el MitoTracker. Para ello se colocó en una lámina portaobjeto 100 µl de PBS y 0.5 µl de MitoTracker Red CMXRos (1mM) para llegar a una concentración final de 100 nM, luego se incubó en oscuridad a 28°C por 20 minutos. La actividad mitocondrial, se determinó en base a la emisión de fluorescencia (alta 79-126 píxeles, media 50-78.9 píxeles y baja 6-49.9 píxeles), la distribución mitocondrial a través del patrón de distribución citoplasmática (homogéneo y heterogéneo) y agregados mitocondriales (liso y granuloso) por cada calidad de ovocito. En función a eso encontramos que la emisión de fluorescencia en la calidad I fue: alta 72.72%, media 18.18%, baja 9.09%; calidad II: alta 24.24%, media 36.36%, baja 39.39%; calidad III: alta 18.18%, media 42.42%, baja 39.39%; calidad IV:

alta 18.80%, media 36.36%, baja 45.45% y la distribución mitocondrial (distribución citoplasmática) calidad I: homogéneo 66.60%, heterogéneo 33.30%; calidad II: homogéneo 39.30%, heterogéneo 60.60%; calidad III: homogéneo 66.60%, heterogéneo 33.30%; calidad IV: homogéneo 60.60%, heterogéneo 39.30%; (agregados mitocondriales) calidad I: liso 42.40%, granuloso 57.50%; calidad II: liso 6.0%, granuloso 93.90%; calidad III: liso 48.40%, granuloso 51.50%; calidad IV: liso 45.40%, granuloso 54.50%. Los resultados mostraron que se puede describir rangos de emisión de fluorescencia (actividad mitocondrial) y patrones de distribución mitocondrial para ovocitos inmaduros en alpaca, generando información de potencial importancia para futuros trabajos relacionados a evaluación y maduración ovocitaria.

Palabras clave: Alpaca, ovocito, actividad mitocondrial, distribución mitocondrial, MitoTracker Red CMXRos, microscopia de fluorescencia.

## ABSTRACT

Mitochondria plays a vital role in the energetic metabolism of the oocyte, within which mitochondrial activity and distribution are two valid and important parameters to indicate that an oocyte is competent. The objective of this study was to describe the different distribution patterns and mitochondrial activity in immature alpaca oocytes using MitoTracker Red CMXRos fluorochrome. We worked with ovaries obtained from the Camal Municipal de Huancavelica, which were sent to Lima in physiological serum at 4°C in the next 10-16h, samples were processed in the Laboratory of Reproductive and Cellular Biotechnologies of the Universidad Científica del Sur (UCSUR). Once in the laboratory, follicle aspiration with a diameter between 3-4 mm was performed, sediment was used to search for oocytes under stereoscope at 40X. A total of 132 immature oocytes were worked on, they were classified according to cumulus morphology, then the cumulus cells were mechanically removed from the oocytes by repeated pipetting, in order to be incubated with MitoTracker. For this, 100 µl of PBS was placed on a slide and 0.5 µl of MitoTracker Red CMXRos (1 mM) to reach a final concentration of 100 nM, then incubated in the dark at 28°C for 20 minutes. Mitochondrial activity was determined based on the emission of fluorescence (high 79-126 pixels, medium 50-78.9 pixels and low 6-49.9 pixels), mitochondrial distribution through a cytoplasmic distribution pattern (homogeneous and heterogeneous) and mitochondrial aggregates (smooth and granulated). Based on this we found that emission of fluorescence in quality I was: high 72.72%, mean 18.18%, low 9.09%; quality II: high 24.24%, average 36.36%, low 39.39%; quality III: high 18.18%, average 42.42%, low 39.39%; quality IV: high 18.80%, average 36.36%, low 45.45% and

mitochondrial distribution (cytoplasmic distribution) quality I: homogeneous 66.60%, heterogeneous 33.30%; quality II: homogeneous 39.30%, heterogeneous 60.60%; quality III: homogeneous 66.60%, heterogeneous 33.30%; quality IV: homogeneous 60.60%, heterogeneous 39.30%; (mitochondrial aggregates) quality I: smooth 42.40%, granulated 57.50%; quality II: smooth 6.0%, granulated 93.90%; quality III: smooth 48.40%, granulated 51.50%; IV quality: smooth 45.40%, granulated 54.50%. The results showed that it is possible to describe fluorescence emission ranges (mitochondrial activity) and mitochondrial distribution patterns for immature alpaca oocytes, generating potentially important information for future works related to oocyte evaluation and maturation.

Keywords: Alpaca, oocyte, mitochondrial activity, mitochondrial distribution, MitoTracker Red CMXRos, fluorescence microscopy.

## I. INTRODUCCIÓN

Los Camélidos Sudamericanos son una especie sumamente importante para el Perú, especialmente la alpaca, animal representativo del País. Muchas provincias, comunidades y familias viven de los subproductos que estos puedan generar, lo que contribuye a que se investiguen e implementen nuevas biotecnologías reproductivas para aumentar la población alpaquera.

Por ejemplo, una de las biotecnologías que actualmente está en auge es la fecundación *in vitro* (FIV), para poder aplicar esta biotecnología se necesitan el gameto macho y hembra. Para evaluar el gameto macho (espermatozoide), el recuento, la motilidad y la morfología, es decir la calidad seminal ayudaran a determinar la capacidad de fertilización de la muestra seminal (Kruger *et al.*, 1986). En hembras, el tamaño adecuado de un folículo para la obtención de ovocitos, la integridad del citoplasma ovocitario y la cantidad y compactación de células de cumulus alrededor que lo protegen, son variables morfológicas que permiten determinar la calidad ovocitaria (I, II, III, IV) (Stojkovic *et al.*, 2001). Estas variables morfológicas son importantes, pero no serán suficientes para asegurar un correcto desarrollo y futura competencia (Sowinska *et al.*, 2017).

Evaluar la condición del núcleo, el citoesqueleto y las mitocondrias, son la forma más precisa para poder determinar la calidad de los ovocitos (Curcio *et al.*, 2013). Estas estructuras subcelulares proporcionaran la información correcta que se apoyará a su vez en las variables morfológicas ya mencionadas, para indicar que ovocito será

apto para ser utilizado en FIV o alguna otra biotecnología que emplee este gameto. La importancia de este trabajo radica en estudiar una de las estructuras subcelulares del ovocito, la mitocondria, así como las propiedades mitocondriales, como son la actividad y distribución mitocondrial. Con una mejor comprensión de los eventos fisiológicos básicos en ovocitos de alpaca se podrá mejorar la implementación y el éxito de biotecnologías reproductivas como la FIV, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e incluso clonación.

Se ha estudiado la distribución mitocondrial en :ratones (Van Blerkom *et al.*, 1984; Nishi *et al.*, 2003), bovinos (de Paz *et al.*, 2001; Stojkovic *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006), gato doméstico (Sowinska *et al.*, 2017), equinos (Aguilar *et al.*, 2002), humanos (Van Blerkom *et al.*, 2000; Wilding *et al.*, 2001), porcinos (Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Brevini *et al.*, 2005; Sturmey *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2007), caninos (Iorga *et al.*, 2008; Saffie, 2009) y la actividad mitocondrial en: perras (Saffie, 2009), yeguas (Torner *et al.*, 2007) y gatas (Sowinska *et al.*, 2017), en ninguno de los dos casos se ha tenido información en alpacas, por lo cual es de suma importancia poder describir los patrones de distribución y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ovogénesis

Los ovocitos provienen de las células germinales primordiales (PCGs), las cuales migran a los ovarios en el desarrollo fetal; cuando llegan a los ovarios, cesa la proliferación y empieza la meiosis (Wolpert *et al.*, 2010). Todos los ovocitos con los que contara un mamífero en su vida reproductiva estarán disponibles en el ovario dentro de los folículos primordiales, al momento del nacimiento (Dalton, 2011). Los ovocitos estarán detenidos en la etapa diploteno de la profase de la primera división meiótica hasta el inicio de la pubertad o madurez sexual (Wolpert *et al.*, 2010). Durante el desarrollo del ovocito, este se conecta a las células del folículo a través de uniones GAP (Makabe *et al.*, 2006), estas uniones admiten la transferencia de moléculas y metabolitos entre los dos tipos de células que forman parte del desarrollo del folículo y del ovocito (Kidder *et al.*, 2010). La expansión del ovocito en la fase de crecimiento se acompaña del desarrollo folicular con el resultado de que un ovocito completamente desarrollado está contenido dentro de un folículo antral, rodeado por miles de células foliculares; durante este periodo también se produce la expansión nuclear para formar la vesícula germinal (VG) (Chouinard 1975), también se forma la zona pelúcida, una capa de glucoproteína gruesa producida por el ovocito, que lo rodea (Bleil *et al.*, 1980).

El ovario contiene folículos en muchas etapas de crecimiento y desarrollo; durante el ciclo reproductivo en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH), los folículos antrales tempranos son rescatados de apoptosis y terminan las etapas finales de

crecimiento y desarrollo para convertirse en folículos antrales (Wolpert *et al.*, 2010). En respuesta a un aumento de la hormona luteinizante (LH), los ovocitos desarrollados dentro de los folículos pueden entrar en la próxima etapa de su desarrollo, la maduración (Dalton, 2011).

En la maduración del ovocito, se divisan cambios estructurales y citoplasmáticos; después de los cuales, el ovocito será apto para someterse a la fecundación. En respuesta al aumento de LH, la primera división meiótica se restablece, luego el ovocito avanza a partir de la etapa VG a través de la primera meiosis (MI), comienza la segunda meiosis (MII), por último, permanece detenido en metafase de la meiosis II hasta que se produce la fecundación (Dalton, 2011).

Durante la maduración se producen algunos cambios estructurales y metabólicos, como son: la regulación de la síntesis proteica, la regulación descendente de la transcripción, la alteración en las vías de señalización celular y la reorganización de varios orgánulos como lo son las mitocondrias (Eppig *et al.*, 1994).

## 2.2. Relación del desarrollo folicular y la fecundación

La capacidad de un hembra para producir vida depende del ovocito, y la capacidad del ovocito para producir un embrión viable, depende de tener la correcta y suficiente información de ARNm y proteínas (Sirard, 2001). Si la información del ovocito es errónea o insuficiente, pueden verse traducido en defectos futuros de la maduración, y consecuentemente afectara a un próximo proceso de desarrollo *in vitro* (Machatkova *et al.*, 2004). La interacción entre el tamaño del folículo y la fase de onda folicular resulta en la correcta producción de embriones, si la población de ovocitos es poca o mucha eso no es primordial, como si lo es la etapa de desarrollo folicular en la que estén (Machatkova *et al.*, 2004).

La fecundación comienza con la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito detenido en MII. Para que suceda esto, el espermatozoide ingresa y se une a la zona pelúcida, lo que da comienzo a la reacción



acrosomal, que es la liberación de enzimas hidrolíticas de la vesícula secretora especializada localizada en la cabeza del espermatozoide, lo cual permite ingresar a la zona pelúcida (Brucker *et al.*, 1995). Para evitar que otros espermatozoides ingresen, ocurre la exocitosis de gránulos corticales, que cambia la estructura de la zona, lo que la hace difícil a la penetración (Green 1997; Horvath *et al.*, 1993). La fusión de espermatozoide y óvulo da como resultado la liberación del ovocito del arresto en MII, así como la reanudación y finalización de la segunda división meiótica (Runft *et al.*, 2002). Los pronúcleos se vuelven visibles unas 4 horas después de la fusión espermatozoide-óvulo y se repositionan en el centro de la célula (Howlett *et al.*, 1985). Los cromosomas maternos y paternos finalmente se unen en profase de la primera división embrionaria que ocurre 17-20 horas después de la fecundación (Austin *et al.*, 1957; Howlett *et al.*, 1985).

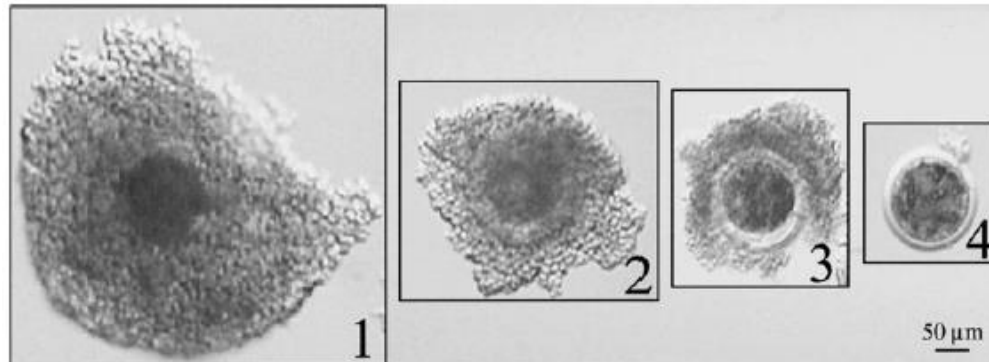
### 2.3. Clasificación de ovocitos inmaduros

La primera clasificación de ovocitos inmaduros fue hecha por Leibfried *et al.* (1979). Se clasificaron en cuatro grupos, grupo A: con muchas capas compactas de células del cumulus, grupo B: con células del cumulus parcialmente removidas, grupo C: ovocitos desnudos y grupo D: degeneración citoplasmática del ovocito. Cabe resaltar que solo los ovocitos que correspondían al grupo A y B podían ser usados para realizar alguna biotecnología reproductiva (Leibfried *et al.*, 1979). Unos años más tarde, en base a la primera clasificación, De Loos *et al.* (1989) realizó otra. Fueron clasificados en 4 categorías, calidad I: complejo cumulus ovocito (COCs) con cinco capas o más de células del cumulus y citoplasma homogéneo, calidad II: COCs con dos a cuatro capas de células del cumulus y citoplasma homogéneo, calidad III: una capa o menos de células de la granulosa o parcialmente desnudo y/o con citoplasma vacuolado y calidad IV: ovocito desnudado y/o citoplasma granular (Figura 1) (De Loos *et al.*, 1989).

Existen estudios en dromedarios (El-Harairy *et al.*, 2007), cerdos (Álvarez *et al.*, 2009) y ovejas (Barakat *et al.*, 2014) donde clasifican a los ovocitos en cuatro categorías, con

exactamente las mismas características en cada una, lo cual indica que no hay diferencias en cuanto a la clasificación.

En la actualidad en algunas especies se ha podido determinar como factor de clasificación a la distribución mitocondrial.



**Figura 1.** Cuatro categorías de COCs bovinos evaluados acorde con la apariencia morfológica del citoplasma y células del cumulus. (tomado de Stojkovic *et al.*, 2001)

#### 2.4. Características de la mitocondria en el ovocito

Las mitocondrias en el ovocito y en el embrión atraviesan por muchos cambios durante toda la ovogénesis, la maduración, la fecundación y el desarrollo previo a la implantación, los cambios traerán consigo alteraciones en la estructura de la misma mitocondria, en el número, la actividad, y se expresarán en relación con la energía proporcionada durante el desarrollo temprano (Dalton, 2011). La disfunción mitocondrial en el ovocito y en el embrión, juegan un papel importante en la infertilidad y en anomalías del desarrollo en humanos (Schatten *et al.*, 2014). Por lo tanto, dentro del ovocito juegan un papel vital en el desarrollo y competencia de este, que se verá traducido en el éxito del embrión, además son indicadores críticos de la calidad de ovocitos.

Las mitocondrias cumplen la función de producir trifosfato de adenosina (ATP), regula la homeostasis, el estado rédox, comprometidas en el transporte de los metabolitos, proteínas y en el metabolismo de los lípidos y aminoácidos (Solaini *et al.*,

2007; Zamzami *et al.*, 2007). Mediante un sistema enzimático, compuesto por cinco complejos multiprotéicos: Complejo I (NADH-ubiquinona oxidorreductasa), Complejo II (Succinato deshidrogenasa), Complejo III (Ubiquinona citocromo c oxidorreductasa), Complejo IV (Citocromo oxidasa) y Complejo V (ATP sintasa), convierte energía oxidativa en energía química (Camara, 2005).

En cuanto a los aspectos cuantitativos de la mitocondria, los ovocitos y embriones necesitan un cierto umbral de capacidad de fosforilación oxidativa, para funcionar normalmente, esto se establece bajo el control de los genomas nucleares y mitocondriales maternos durante la ovogénesis (Cummis, 2004). Durante la mitosis, las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas, y si el embrión no recibe una población suficiente de mitocondrias competentes para producir ATP, pueden convertirse en disfuncional (Cummins, 2004).

Correlaciones entre el potencial de desarrollo, el contenido de ATP y la función mitocondrial se observan en ovocitos y embriones bovinos, se deduce que la función mitocondrial está íntimamente asociada con las necesidades metabólicas cambiantes del embrión, a través de las primeras divisiones celulares con un cambio en los requisitos de sustrato de hidratos de carbono, a partir de glucosa a piruvato, esto refleja un cambio en el metabolismo oxidativo de la glicólisis. Además, se han sugerido efectos deletéreos de la glucosa, a través de la reducción de la glicolisis y la incapacidad de metabolizar piruvatos, lo cual conduce a alteraciones en el metabolismo mitocondrial y en la apoptosis (Cummis, 2004).

Durante el crecimiento de los ovocitos, el número de mitocondrias aumenta a medida que aumenta el diámetro del folículo, pero hay una gran variación en el número de copias mitocondriales en ovocitos maduros (Van Blerkom, 2004). El bajo contenido mitocondrial, medido por el número de copias del ADN mitocondrial, se relaciona con la fecundación o la falla del desarrollo (Santos *et al.*, 2006). Algunos estudios no encuentran una correlación entre el número de copias de ADN mitocondrial y el resultado del desarrollo (Barritt *et al.*, 2002). Sin embargo, dada la falta de replicación mitocondrial hasta después de la implantación y la dependencia de las mitocondrias para la provisión de ATP durante la maduración de los ovocitos y la embriogénesis

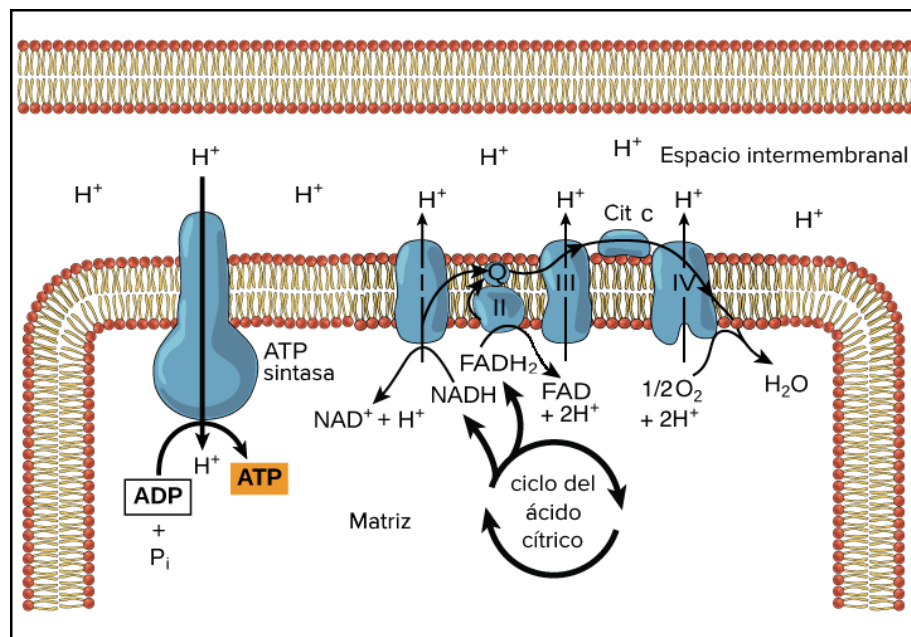
temprana, se puede decir que se necesita un mínimo de mitocondrias en el ovocito para garantizar un desarrollo exitoso (Dalton, 2011).

En roedores, la estimulación ovárica y la maduración *in vivo* se traduce en un aumento de la población mitocondrial del ovocito o el contenido de ATP (Lee *et al.*, 2006). Pero no hay alguna evidencia que afirme, que el efecto del número mitocondrial en la competencia de los ovocitos tiene su base en la producción de ATP (Brad *et al.*, 2003; Shoubridge *et al.*, 2007). Puede ser que el número, la actividad y la distribución mitocondrial estén relacionados con la calidad de los ovocitos. También se habla del trabajo importante de las mitocondrias para producir ATP en el ovocito. Sin embargo, puede ser que la organización espacial de las mitocondrias y la provisión de ATP sean más importantes que el contenido neto de ATP de los ovocitos (Van Blerkom, 2011).

#### **2.4.1. Estructura mitocondrial**

Las mitocondrias poseen dos membranas celulares, la externa y la interna. La externa encierra a la membrana interna y el espacio intermembrana, permitiendo el paso de las moléculas e iones pequeños, así como también tiene poros y canales para que pasen las moléculas más grandes (Dalton, 2011). La interna rodea la matriz de las mitocondrias, es el lugar donde están las enzimas de la cadena de transporte de electrones, también tiene una serie de invaginaciones llamadas crestas que pueden atravesar cambios en la morfología para regular la función mitocondrial (Mannella, 2005). Entre esos cambios, tenemos la remodelación de crestas que ha sido relacionado con condiciones de estrés oxidativo y la fusión durante la apoptosis (Mannella, 2008; Scorrano *et al.*, 2002). Su composición fosfolipídica particular, no permite que pasen la mayoría de los metabolitos. Debido a la impermeabilidad de la membrana se crea una diferencia de potencial electroquímico de protones, mostrándose dos componentes: uno de concentración (diferencia de pH) y otro de carga (potencial de membrana). El potencial de membrana mitocondrial (PMM) es utilizado por el complejo V para difundir protones, a favor de gradiente, a través de la

membrana mitocondrial interna, permitiendo la síntesis de ATP en un proceso denominado fosforilación oxidativa (Figura 2) (Luo *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Fosforilación oxidativa. Cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP. Adaptado de Avissar *et al.*, 2013.

## 2.5. Distribución mitocondrial

Las mitocondrias, pueden presentarse de diversas maneras, como redes interconectadas complejas, como estructuras individuales o como una combinación de las dos (Kuznetsov *et al.*, 2009). El grado de interconectividad mitocondrial en elementos del citoesqueleto regulados por la acción de proteínas específicas (Mfn1, Mfn2 y Opa1) que están involucradas en el proceso de fusión (Anesti *et al.*, 2005) y así mismo otras proteínas (Drp1, Fis1) que tienen un papel en la fisión mitocondrial (Chen *et al.*, 2010). Estas diferenciaciones pueden ser necesarias para asegurar el correcto funcionamiento y distribución de las mitocondrias, cabe resaltar que las fallas en estos procesos se han relacionado con algún tipo enfermedad (Westermann, 2010). La reubicación dentro del ovocito durante la maduración, desde la VG hasta la periferia de los ovocitos, sucede posiblemente para apoyar procesos metabólicos críticos en esa ubicación (Dumollard *et al.*, 2006). En cerdos se indica que la reubicación

mitocondrial es significativamente más frecuente en aquellos ovocitos más competentes, a diferencia de aquellos donde no hubo reubicación o fue muy leve luego de la maduración, esto podría indicar que la inmadurez del citoplasma es un factor que lleva a la baja redistribución mitocondrial y además se relacionaría con una baja capacidad de posterior desarrollo (Brevini *et al.*, 2005).

Algunos patrones de distribución mitocondrial han sido estudiados en ratones (Van Blerkom *et al.*, 1984; Nishi *et al.*, 2003), bovinos (de Paz *et al.*, 2001; Stojkovic *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006), gato doméstico (Sowinska *et al.*, 2017), equinos (Aguilar *et al.*, 2002), humanos (Van Blerkom *et al.*, 2000; Wilding *et al.*, 2001), ovinos (Cran *et al.*, 1980), porcinos (Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2004; Brevini *et al.*, 2005; Sturmey *et al.*, 2006; Brevini *et al.*, 2007) y caninos (Iorga *et al.*, 2008; Saffie, 2009), todos estos estudios indican que la distribución de las mitocondrias activas pueden ser indicativos de la necesidad de energía o de iones, en eventos claves durante la maduración de ovocitos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano.

### 2.5.1. Distribución citoplasmática

Cuando se habla de distribución citoplasmática, se tienen dos patrones principales, los cuales nos ayudan a clasificar a los ovocitos, estos son la homogeneidad y la heterogeneidad (Nishi *et al.*, 2003). La distribución homogénea de las mitocondrias a través del citoplasma es más común en la etapa de VG (Nishi *et al.*, 2003), mientras que la distribución heterogénea se observa con más frecuencia en el ovocito en metafase I o II (Torner *et al.*, 2004). Un aumento de la agregación mitocondrial alrededor del núcleo indica la maduración de los ovocitos, donde pasa de ser homogénea a ser heterogénea, además embriones morfológicamente de mala calidad solo se caracterizan por la distribución homogénea de las mitocondrias (Wilding *et al.*, 2001).

Las condiciones de cultivo inapropiadas pueden inhibir el movimiento mitocondrial hacia el citoplasma interno y así afectar su maduración citoplásmica (Torner *et al.*, 2004). La redistribución mitocondrial en diferentes áreas celulares está mediada por el



citoesqueleto, específicamente por la red de microtúbulos (Van Blerkom, 1991). La distribución anormal de las mitocondrias está relacionada con la formación inadecuada de la red de microtúbulos citoplásmicos, causa el retraso del desarrollo de ovocitos y dan efectos negativos en la embriogénesis debido a la distribución anormal de ATP (Nagai *et al.*, 2006).

El requerimiento de alta energía de la corteza del ovocito tiene una relación con la localización periférica de las mitocondrias en el ovocito en la etapa VG. Los ovocitos en estadio VG son afines a las células del cumulus, que están conectadas al ovolema con uniones GAP para suministrar recursos nutricionales (Liu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2001). La cooperación intercelular de este proceso podría culminar en una demanda de alta energía que explica la localización mitocondrial en ovocitos inmaduros (Sowinska *et al.*, 2017).

### **2.5.2. Agregados Mitocondriales**

El aumento de la agregación es un fenómeno normal, y la formación de agregados se asocia con un aumento significativo de la actividad mitocondrial, maduración de ovocitos y desarrollo embrionario (Egerszegi *et al.*, 2010; Bavister *et al.*, 2000). Cierta agregación mitocondrial parece ser esencial para controlar pH intracelular, función de la proteína y organización del citoesqueleto (De los Reyes *et al.*, 2011). Un ejemplo, la agregación mitocondrial juega un papel en la modulación de la concentración local de calcio libre, que también media la activación de ovocitos (Sun *et al.*, 2001). Trastornos en la agregación mitocondrial aumenta la permeabilidad celular al calcio externo, el aumento del calcio libre de células activa las enzimas hidrolíticas, reduce la producción de energía y al final da como resultado la muerte celular (Berridge *et al.*, 1998).

## 2.6. Actividad mitocondrial

Se sabe que altos niveles de actividad mitocondrial serían necesarios para posteriores maduraciones que dependen de la producción de ATP, maduración del núcleo y la competencia meiótica (Picton *et al.* 1998). Un estudio sobre ovocitos equinos confirmó que la mayor actividad metabólica de las mitocondrias se correlaciona con una mayor capacidad de desarrollo (Torner *et al.*, 2007). La actividad mitocondrial disminuye por diversos factores, entre ellos: la vitrificación, debido al estrés osmótico en el ovocito, causado por la exposición a un alto nivel de crioprotectores, para evitar la formación de cristales de hielo (Zander-Fox *et al.*, 2013).

Para medir la actividad mitocondrial se usan fluorocromos. La medición fotométrica de la intensidad de fluorescencia proporciona información valiosa con respecto al número de mitocondrias y su actividad metabólica (Egerszegi *et al.*, 2010). En algunas especies, como cerdos, bovinos, roedores y caballos, la actividad mitocondrial alcanzó su punto máximo poco antes de la ovulación (Brevini *et al.*, 2005; Rho *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005; Torner *et al.*, 2007).

Las mitocondrias generan la energía necesaria para los períodos críticos de desarrollo de ovocitos. Su distribución, agregación y actividad están relacionadas con el nivel de metabolismo celular, proliferación y diferenciación (Sowinska *et al.*, 2017).

La viabilidad y funcionalidad del ovocito se evalúa mediante técnicas de tinción asociadas a marcadores fluorescentes. Los marcadores evalúan el daño presente en la mitocondria del ovocito. Los ovocitos con un fluorocromo determinado, al ser excitados por un rango de luz adecuada de longitud de onda permiten que la consistencia e intensidad de coloraciones fluorescentes permitan realizar la lectura. Varios fluorocromos han sido aplicados para la evaluación de la función mitocondrial, mediante de la detección del potencial de membrana mitocondrial (PMM) (Nuñez, 2018).



### **2.6.1. Potencial de membrana mitocondrial**

La bomba de protones de la cadena de transporte de electrones establece el PMM o la fuerza motriz del protón (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011). Los protones se bombean desde el espacio de la matriz al espacio intermembrana, creando un pH sustancial y un gradiente eléctrico a través de la membrana interna mitocondrial, estos protones al final vuelven a entrar en el espacio de la matriz a través de la ATPasa, impulsando la síntesis de ATP (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011). Este potencial depende de varias otras funciones mitocondriales y está involucrado en el proceso apoptótico (Duchen, 1999; O'Reilly *et al.*, 2003).

Se pueden usar diferentes fluorocromos catiónicos para medir el potencial de membrana de las células individuales porque sus atributos esenciales son la permeabilidad de la membrana y la baja unión a la membrana (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011). Los cationes son atraídos por el potencial negativo a través de la membrana mitocondrial interna, por lo tanto, se acumulan preferentemente en las mitocondrias porque son altamente eficientes al cruzar las membranas hidrofóbicas (Yousif *et al.*, 2009). El potencial de membrana juega un papel directo en el control de la distribución a través de la membrana plasmática: cuanto más negativo es el potencial, mayor es la acumulación del fluorocromo cargado positivamente. El potencial de membrana controla el entorno promedio del fluorocromo (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011).

### **2.7. Empleo de fluorocromos para evaluación mitocondrial**

Se han encontrado pocos estudios enfocados en las mitocondrias como organela individual, desde su estado primitivo. Nuevas técnicas que permiten el análisis de alta resolución de las mitocondrias sin destruirlas se han ido desarrollando. Esto potenciado con la aparición de sondas fluorescentes, permite el estudio de las mitocondrias y la actividad mitocondrial utilizando microscopio de fluorescencia o citometría de flujo, con ayuda de diferentes fluorocromos para marcar mitocondrias (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011).

### **2.7.1. Fluorocromos para localización de mitocondrias**

Son capaces de teñir las mitocondrias independientemente de su estado de polarización. La fluorescencia de las células teñidas con este tipo de fluorocromo es directamente proporcional al contenido de mitocondrias o masa mitocondrial (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011).

#### **2.7.1.1. MitoTracker Green FM**

Reacciona con los grupos tiol libres de residuos de cisteína que pertenecen a las proteínas mitocondriales (Presley *et al.*, 2003). La concentración de este colorante es 300 veces mayor en la matriz mitocondrial que en el medio que rodea estas organelas, lo que puede deberse al pH de la membrana mitocondrial interna. Esto lleva a la unión covalente a una fracción de las proteínas mitocondriales. La unión de esta categoría de sonda se localiza principalmente en la membrana mitocondrial interna y sugiere que la cantidad de fluorescencia observada después de la tinción celular está más correlacionada con la cantidad de la membrana mitocondrial interna que con la masa mitocondrial completa. Este punto debe ser considerado cuidadosamente porque la topología de la membrana interna puede variar en diferentes especies, diferentes tipos de células dentro de la misma especie y diferentes estados metabólicos dentro de las mismas células (Mannella, 2006). Las variaciones en la intensidad de la tinción a veces pueden ser el resultado de una transición del estado metabólico y una modificación de la forma de la membrana mitocondrial interna en lugar de una variación de la masa mitocondrial (Cottet- Rousselle *et al.*, 2011).

### **2.7.2. Fluorocromos para medir actividad mitocondrial**

Dentro de este grupo existen fluorocromos mucho más específicos que se encargan de marcar mitocondrias activas.

### **2.7.2.1. Tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE) y Tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM)**

Son fluorocromos que pueden usarse en concentraciones relativamente bajas para la tinción específica de las mitocondrias sin efecto amortiguador (Metivier *et al.*, 1998; Scaduto *et al.*, 1999). Su bajo coeficiente de partición de membrana les permite teñir específicamente las mitocondrias polarizadas en lugar de otros organelas intracelulares (Scaduto *et al.*, 1999).

### **2.7.2.2. Mitochondrial Membrane Potential Probe (JC-1 y JC-9)**

Son miembros de la familia de la cianina y tienen una emisión de fluorescencia policromática: una fluorescencia verde en un estado monomérico y una roja en un estado agregado (Reers *et al.*, 1991). A baja concentración, en células sanas normales, JC-1 se agrega en la mitocondria de una manera dependiente del potencial. JC-1 sufre agregación dentro de la matriz mitocondrial por encima de una concentración umbral crítica, y los agregados se forman cuando el PMM es superior a -140 mV. La intensidad de la fluorescencia del monómero verde en la matriz es independiente del potencial hasta que el PMM caiga por debajo de ese valor (Nicholls *et al.*, 2000).

### **2.7.2.3. MitoTracker Orange y MitoTracker Red**

Pertenecen a la familia de moléculas de rosamina y poseen la ventaja de ser retenidos por la célula después de la fijación de formaldehído. Esto es de particular interés en el estudio de muestras de riesgo biológico y en el uso de protocolos donde se deben detectar antígenos intracelulares. Su fluorescencia naranja o roja los hace adecuados para protocolos multicolores (Cottet- Rousselle *et al.*, 2011).

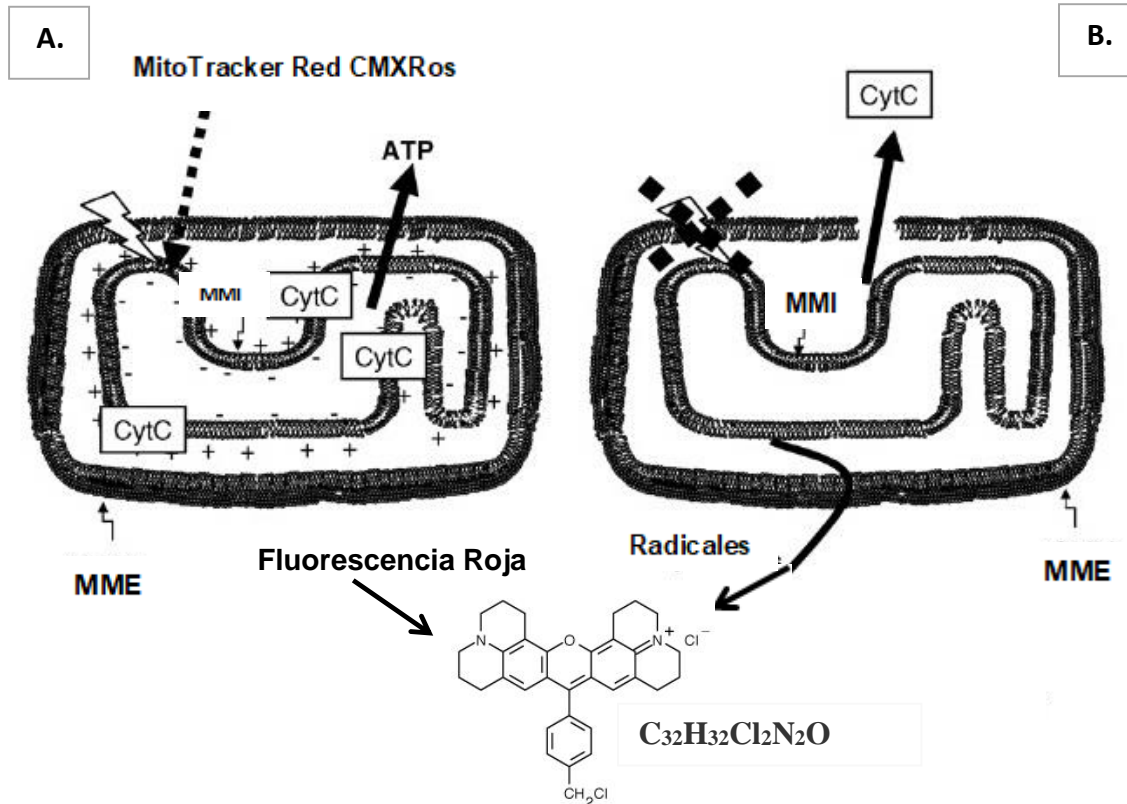
#### 2.7.2.4 MitoTracker Red CMXRos

Los Mitotrackers son fluorocromos que etiquetan a la mitocondria activa con el PMM, permanecen en ella después de la fijación, tienen la capacidad de penetrar la membrana plasmática y propagarse en compartimentos intracelulares. La intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la presencia de PMM. Se encuentran disponibles en tres diferentes colores de emisión: verde, naranja y rojo (Thomas *et al.*, 1998; Chazotte, 2011; Garner *et al.*, 1999; Mendes *et al.*, 2015).

El fluorocromo Mitotracker Red CMXRos es lipofílico y catiónico, tiene un resto clorometilo alquilante unido. Debido a su potencial de membrana, las mitocondrias funcionales toman este fluorocromo. Una vez que las sondas se acumulan en las mitocondrias, el grupo clorometilo puede reaccionar con nucleófilos accesibles, incluidos el grupo tiol de péptidos y proteínas, para formar un conjugado fijado en aldehído. Esta unión mejora la retención del fluorocromo en comparación a otros convencionales. Su máxima excitación es a 579 nm, pero parte de la fluorescencia es excitable a 488 nm, su máxima emisión es a 599 nm y su fluorescencia es roja (Poot *et al.*, 1996).

Tienen una alta sensibilidad a cambios en los valores del PMM, incluso si los cambios de emisión de fluorescencia de estos fluorocromos en respuesta a cambios en el PMM son cuantitativos (aumento o disminución de un color dado) y no cualitativo (cambio de colores). Los fluorescentes convencionales se eliminan fácilmente de las células una vez que se pierde el potencial de membrana. Los tintes MitoTracker se han desarrollado para superar esta limitación y se pueden usar antes de un paso de fijación. Son permeables a las células, pasivamente difusos a través de la membrana plasmática y se acumulan en las mitocondrias activas (Cottet-Rousselle *et al.*, 2011).

Este fluorocromo ha sido utilizado en la evaluación de PMM de espermatozoides criopreservados (Santiani *et al.*, 2015) y frescos (Nuñez, 2018) de alpaca, sin embargo, no se ha aplicado en ovocitos frescos de alpaca.



**Figura 3.** Ingreso del Fluorocromo MitoTracker Red CMXRos a la mitocondria.

A) Se difunde sobre la membrana plasmática y la membrana mitocondrial externa (MME), se acumulan en la membrana mitocondrial interna (MMI). B) Cuando las mitocondrias pierden su integridad el gradiente de protones de la membrana se pierde y como consecuencia la producción de ATP. Además, el citocromo c (CytC) se pierde y se difunden fuera de la membrana. Como consecuencia la respiración se bloquea y los marcadores fluorescentes como el MitoTracker no perciben el PMM. Los radicales ya no se mantiene dentro de la matriz de la mitocondria. Adaptado de Silva y Gadella, 2006.

## 2.8. Evaluación mitocondrial como herramienta para las biotecnologías reproductivas

Las biotecnologías reproductivas, significan un avance importante en la medicina veterinaria. Cada uno de estos avances, se realizan en laboratorios con ambientes especiales, equipos sofisticados y protocolos sumamente complejos. Dentro de las biotecnologías aplicadas a hembras, las más empleadas son: MIV de ovocitos, criopreservación de ovocitos, FIV e incluso clonación; sin embargo, en camélidos, específicamente en alpacas, diversos estudios han logrado tasas de maduración ovocitaria sumamente bajas, con éxito limitado y respuestas extremadamente bajas de producción de embriones *in vitro* (Huanca *et al.*, 2014; Del campo *et al.*, 1994; Ratto *et al.*, 2005). Con el empleo de métodos genético-estadístico, genética poblacional, aplicación de programas de mejoramiento genético, en conjunto con las técnicas de producción *in vivo* e *in vitro*, clonación, conservación y bipartición de embriones, podría incrementarse significativamente el progreso genético (para una característica) de los programas de producción convencionales en hembras (Palma, 2001).

Trastornos de la fertilidad, se han convertido en un problema creciente en todo el mundo, y la disfunción mitocondrial, asociada con la infertilidad, ha sido demostrada en las mujeres afectadas por enfermedades o trastornos metabólicos, como la diabetes y la obesidad, como cambios en el metabolismo resultante del envejecimiento de ovocitos (Grindler *et al.*, 2013). Por otro lado, los rumiantes suplen la mayoría de sus necesidades de energía celular con lípidos y tienen poco carbohidrato circulante, sin embargo, los camélidos difieren de este esquema; no se tiene claro si esto se debe al aumento de la absorción de carbohidratos del tracto gastrointestinal, la gluconeogénesis incrementada, la absorción pobre de glucosa por los tejidos u otro mecanismo (Cebra *et al.*, 2001). En el caso de las alpacas tienen concentraciones de glucosa en sangre más altas que los rumiantes domésticos (Dahlborn *et al.*, 1992). La eliminación de la glucosa es más lenta que en otras especies domésticas, por una respuesta insulínica débil y una absorción celular lenta. Esta respuesta puede perjudicar la asimilación de la glucosa exógena, así como hacer que las alpacas sean

proclives a trastornos como diabetes (Cebra *et al.*, 2001). La diabetes, altera la redistribución mitocondrial en la maduración ovocitaria, con lo cual se observa una mayor distribución perinuclear y agrupamiento mitocondrial, siendo esta distribución compatible con una translocación insuficiente de las mitocondrias (Wang *et al.*, 2009). Se tiene reportes que los ovocitos de ratones diabéticos tienen un número de copias de ADNmt (ADN mitocondrial) mucho mayor que los ovocitos de los controles sanos (Wang *et al.*, 2009). No obstante, este incremento en el número de copias de ADNmt no es un aumento de la función mitocondrial en la diabetes. Por el contrario, la función mitocondrial se reduce y el nivel promedio de ATP en ovocitos obtenidos de ratones diabéticos es significativamente menor que en los controles (Wang *et al.*, 2009).

Las disfunciones mitocondriales se traducen en aumento del número de mujeres que requieren FIV u otras técnicas de reproducción asistida (Schatten *et al.*, 2014). A su vez, la fertilidad disminuye aún más con la edad, siendo las causas: disminución de la calidad de los ovocitos y disfunción mitocondrial (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2011). La repercusión importante que tiene este procedimiento natural en la fertilidad femenina (Li *et al.*, 2017), hace investigar constantemente las posibles mejoras en la mitocondria, lo cual podría conducir a mejores resultados de fertilidad, mientras que la aplicación de estrategias de transferencia o reemplazo mitocondrial a la infertilidad relacionada con la edad podría ser posible en el futuro (Li *et al.*, 2017).

En ovocitos con potencial de desarrollo presumiblemente menor, se emplean ajustes del tiempo de maduración, el uso de medios suplementados con factores de crecimiento (EGF, IGF) o el establecimiento de un sistema de cultivo en dos pasos que incluya la prematuridad en presencia de inhibidores de la maduración nuclear, a su vez la utilización de ondas foliculares sincronizadas por aspiración transvaginal en donantes vivos como opción para mejorar las biotecnologías, así también, explotar ovocitos con mayor potencial de desarrollo, aumentará la eficiencia del embrión *in vitro* (Machatkova *et al.*, 2004). Adicionalmente las condiciones estándar de maduración se deben modificar para los ovocitos con diferentes capacidades de desarrollo con respecto a la etapa de desarrollo folicular (Machatkova *et al.*, 2004).



Es de vital importancia estudiar la fisiología del ovocito inmaduro, describiendo la distribución y actividad mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca, a fin de permitir en el futuro diseñar protocolos de maduración, FIV y/o criopreservación; y así corregir poco a poco las falencias y asegurar una mejora en las biotecnologías reproductivas en hembras de gran valor productivo.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas y Celulares de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), ubicado en el Km.19 de la Panamericana Sur, en el distrito de Villa el Salvador, donde las muestras fueron procesadas y evaluadas mediante microscopia de fluorescencia (Mi5 Epi-Fluor, LW Scientific).

#### 3.2. Obtención de las muestras

Se colectaron ovarios, luego del beneficio de alpacas, en el Camal Municipal de Huancavelica, Perú (Figura 4). Se lavaron con suero fisiológico, se colocaron en bolsas transparentes con suero fisiológico al 0.9%. (NaCL). Se almacenaron en cajas transportadoras con gel refrigerante, manteniendo una temperatura de 4°C (Tas *et al.*, 2006), y fueron transportados en las siguientes 10 a 16 horas (Preis *et al.*, 2004) al Departamento de Lima donde fueron trabajados para recuperar los ovocitos.



**Figura 4.** Ovarios con folículos (alpaca) provenientes del Camal Municipal de Huancavelica (Fuente: propia).

### 3.3. Manejo de las muestras

Para recuperar los ovocitos, los ovarios se lavaron con suero fisiológico y fueron mantenidos en PBS (Buffer salino fosfato). Se retiró tejido conectivo y vasos sanguíneos para evitar la contaminación de la muestra (Figura 5). Posteriormente se secaron los ovarios a fin de realizar la aspiración de los folículos. Solo se aspiró los folículos con diámetro entre 3-4 mm, para ello se empleó una jeringa de 5 ml estéril y aguja 21G 1½" a fin de recuperar los complejos cumulus-ovocitos (CCOs) (Figura 6). El líquido folicular obtenido se depositó en un tubo Falcon de 15 ml cubierto con papel aluminio, y se dejó reposar por 15 minutos. Luego, el sedimento se aspiró y se colocó en una placa Petri (60 x 15 mm) mantenida a 37° C, para facilitar la búsqueda de CCOs.



**Figura 5.** Retiro de tejido conectivo de ovarios de alpaca (Fuente: propia).

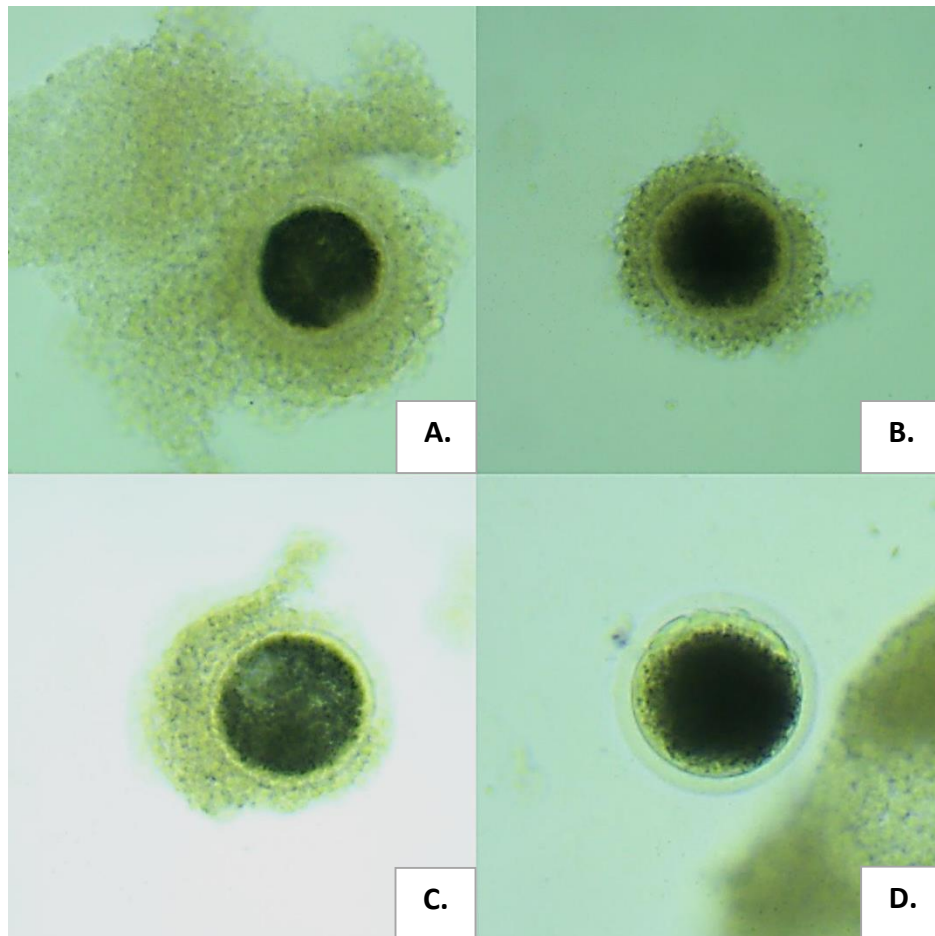


**Figura 6.** Aspiración de Folículos de 3-4 mm (Fuente: propia).

Los ovocitos fueron clasificados con ayuda de un estereoscopio a 40x, según lo señalado por De Loos *et al.* (1989); donde se considerarán para participar en este estudio, todas las calidades de ovocitos (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Categorías de clasificación de COCs.

Categorías	Características por categoría
I	COCs con 5 o más capas compactas de células del cumulus y con citoplasma homogéneo (Figura 7A).
II	COCs con 2-4 capas compactas de células del cumulus y citoplasma homogéneo (Figura 7B).
III	1 capa o menos de células de la granulosa o parcialmente denudado y/o citoplasma vacuolado (Figura 7C).
IV	Ovocito desnudo y/o citoplasma granular (Figura 7D).



**Figura 7.** Calidades de ovocitos de alpaca. A) calidad I B) calidad II C) calidad III D) calidad IV (Fuente: propia).

Se realizó la clasificación de ovocitos obtenidos, separándolos de acuerdo con su categoría en una placa de 4 pocillos, se obtuvieron 33 ovocitos por cada categoría, teniendo un total de 132 ovocitos. Luego se procedió a retirar todas las células del cumulus mecánicamente, aspirándolos reiteradas veces con ayuda de una pipeta de pasteur de vidrio modificada, hasta desnudarlos (Figura 8). Inmediatamente después, los ovocitos se depositaron en placas de cultivo con medio PBS, donde fueron lavados 2 veces, previo al empleo del fluorocromo.



**Figura 8.** Desnudamiento de ovocitos con pipeta pasteur modificada (Fuente: propia).

### 3.4. Evaluación de la actividad mitocondrial

Para evaluar la actividad mitocondrial (emisión de fluorescencia) se elaboraron las siguientes soluciones según lo descrito por Hallap, 2005:

- Solución stock:

Se procedió a diluir 50µg de fluorocromo MitoTracker Red CMXRos (PM=531.52 g/mol), en 94µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) para llegar a una concentración de 1 mM, se homogenizó y se preparó alícuotas de 2µl finalmente se guardó en congelación.

- Solución de trabajo:

Se diluyó 2µl de solución de stock de MitoTracker Red CMXRos en 100 µl de PBS para llegar a una concentración de 20 µM.



- Evaluación de las muestras

Se colocó en una lámina portaobjeto 100  $\mu$ l de PBS y se añadió 0.5  $\mu$ l de la solución de trabajo, a fin de llegar a una molaridad final de 100 nM de MitoTracker Red CMXRos. Luego se colocó 4 ovocitos por lámina, los cuales fueron cubiertos con un cubreobjetos sujeto de los extremos con silicona fría. Se ejerció una ligera presión sobre el cubreobjetos hasta entrar en contacto con los ovocitos, evitando dañarlos. Luego de probar distintos tiempos y temperaturas, se decidió incubarlos en oscuridad a temperatura de 28°C por 20 minutos. Finalmente se observaron las láminas en el microscopio de fluorescencia para poder determinar la actividad mitocondrial.

### **3.5. Evaluación de resultados mediante microscopia de fluorescencia**

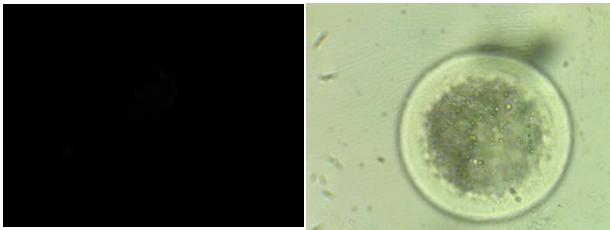
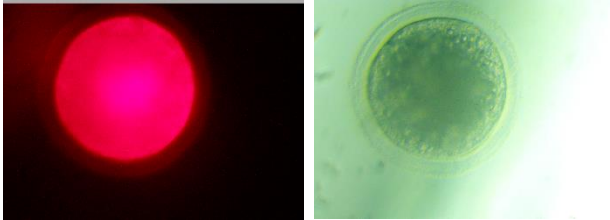
Los resultados fueron evaluados mediante microscopia de fluorescencia. Se analizaron 132 ovocitos. Para la excitación de la muestra con MitoTracker Red CMXRos se utilizó el microscopio (Mi5 Lumin Epi-Fluor, LW Scientific) con un filtro de 490/510 nm y el fluorocromo con una excitación y emisión de 579/599 nm respectivamente.

#### **3.5.1. Controles de fluorescencia**

Se empleó un control negativo para asegurar que el fluorocromo MitoTracker Red CMXRos se asocie a mitocondrias vivas. Para ello, se mantuvieron ovarios de alpaca a temperatura de -25°C por 2 semanas, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente (28°C), luego se volvieron a congelar en nitrógeno líquido (-196°C). Finalmente se realizó la búsqueda de ovocitos y se procedió a aplicar el fluorocromo, dejándolo incubar en oscuridad a una temperatura de 28° C, observándose que ningún ovocito emitió fluorescencia roja (Cuadro 2).

Como control positivo se emplearon ovocitos de calidad I, los cuales fueron incubados en oscuridad a una temperatura de 28° C, observándose la presencia de fluorescencia roja, indicativo de funcionalidad del MitoTracker Red CMXRos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Control de fluorescencia en ovocitos de alpaca usando MitoTracker Red CMXRos (Fuente: propia)

Control de fluorescencia	MitoTracker Red CMXRos	
<p><b>Control negativo</b></p>	<p>No se observa fluorescencia en el citoplasma</p>	
<p><b>Control positivo</b></p>	<p>Se observa fluorescencia roja en todo el el citoplasma</p>	

### **3.6. Análisis de resultados**

La actividad mitocondrial se evaluó a través de la fluorescencia emitida en alta, media y baja. Para la medición se cuantificó de acuerdo con la intensidad de fluorescencia registrado mediante el programa Image J, los valores de intensidad se consideraron como: Alto 79-126 pixeles; medio 50-78.9 pixeles y bajo 6-49.9 pixeles. Los patrones de distribución mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca fueron examinados mediante un análisis descriptivo de los resultados obtenidos.

Los datos fueron presentados en gráficos de columnas (frecuencias), asimismo se trabajó incluyendo valores de media, desviación estándar, mediana, coeficiente de variación, rango intercuartil, intervalo de confianza y moda, a través de cuadro de cajas y bigotes, obtenidos usando el software Prism 3.



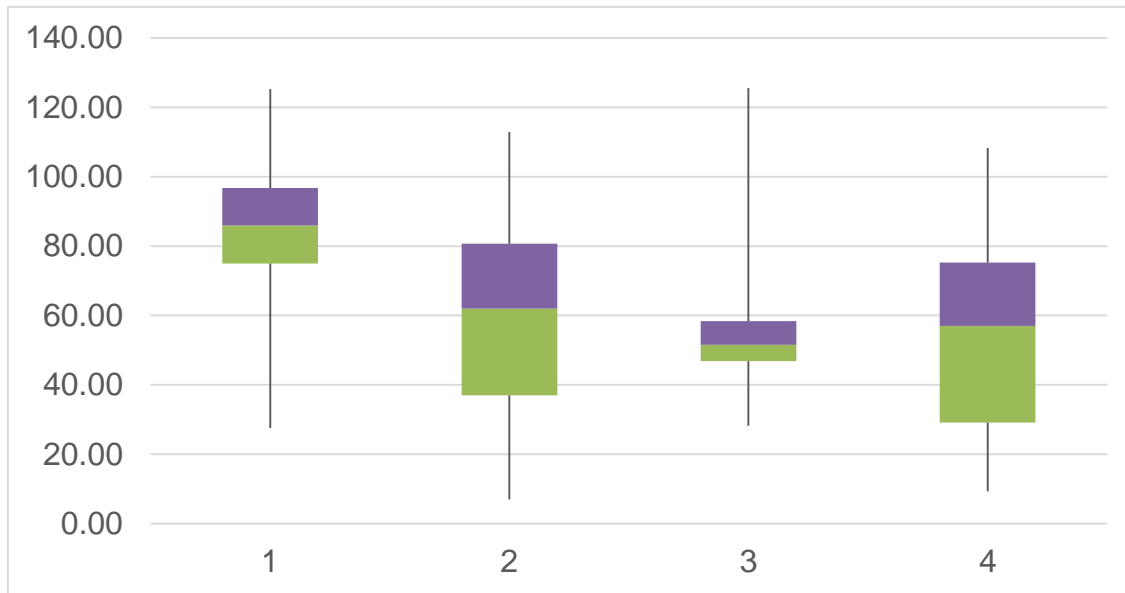
#### IV. RESULTADOS

En el Cuadro 3 se observa la media, desviación estándar, mediana, coeficiente de variación, rango intercuartil, intervalo de confianza y moda de los datos obtenidos para actividad mitocondrial (píxeles), por calidades de ovocitos y población total.

**Cuadro 3.** Medidas de tendencia central y dispersión para actividad mitocondrial (píxeles) por calidades y población total de ovocitos inmaduros de alpaca.

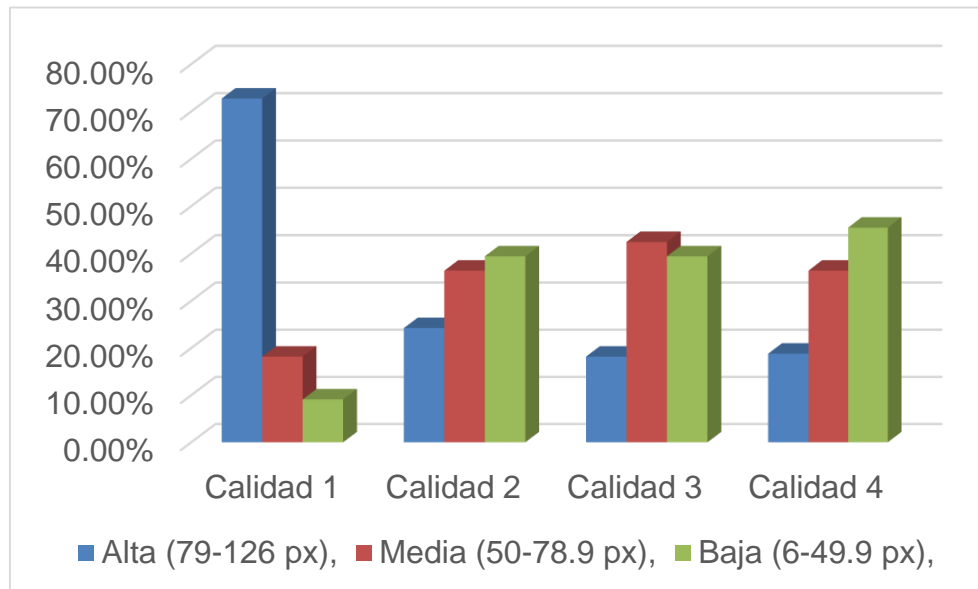
Medidas de tendencia central y dispersión	Calidades de ovocitos (píxeles)				Total
	I (n=33)	II (n=33)	III (n=33)	IV (n=33)	(n=132)
<b>Media</b>	84.85	59.73	57.79	53.82	64.05
<b>Desviación estándar</b>	22.11	28.09	21.38	25.74	27.12
<b>Mediana</b>	85.98	61.99	51.57	56.97	61.01
<b>Coeficiente de variación</b>	0.26	0.47	0.37	0.48	0.42
<b>Rango intercuartil</b>	21.78	43.79	11.53	46.06	39.80
<b>Intervalo de confianza</b>	7.54	9.58	7.29	8.78	4.63
<b>Moda</b>	-	-	-	-	-

**Cuadro 4.** Cuadro de cajas y bigotes por calidades de ovocitos de alpaca.



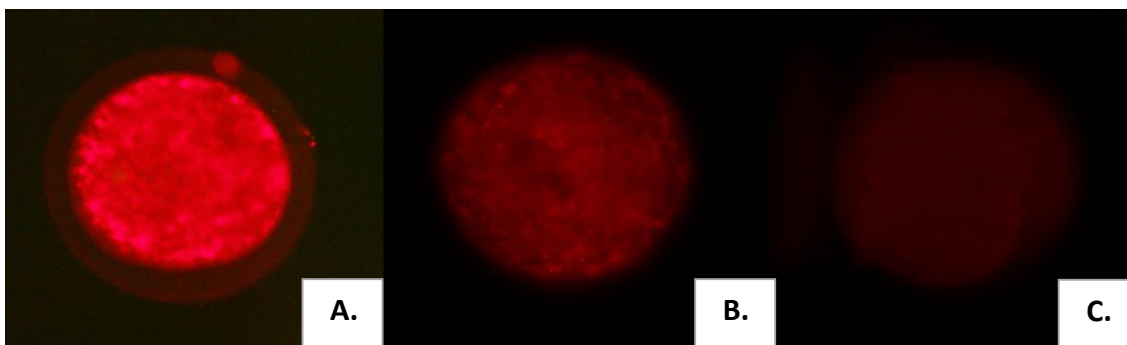
**Calidad I:** mínimo 27.54, Q1 47.41, Q2 11.03, Q3 10.76, máximo 28.56; **calidad II:** mínimo 6.95, Q1 29.28, Q2 25.06, Q3 18.73, máximo 32.21; **calidad III:** mínimo 28.20, Q1 18.60, Q2 4.76, Q3 6.77, máximo 67.18; **calidad IV:** mínimo 9.29, Q1 19.89, Q2 27.80, Q3 18.27, máximo 33.06.

**Cuadro 5.** Porcentajes de actividad mitocondrial por calidades de ovocitos de alpaca.



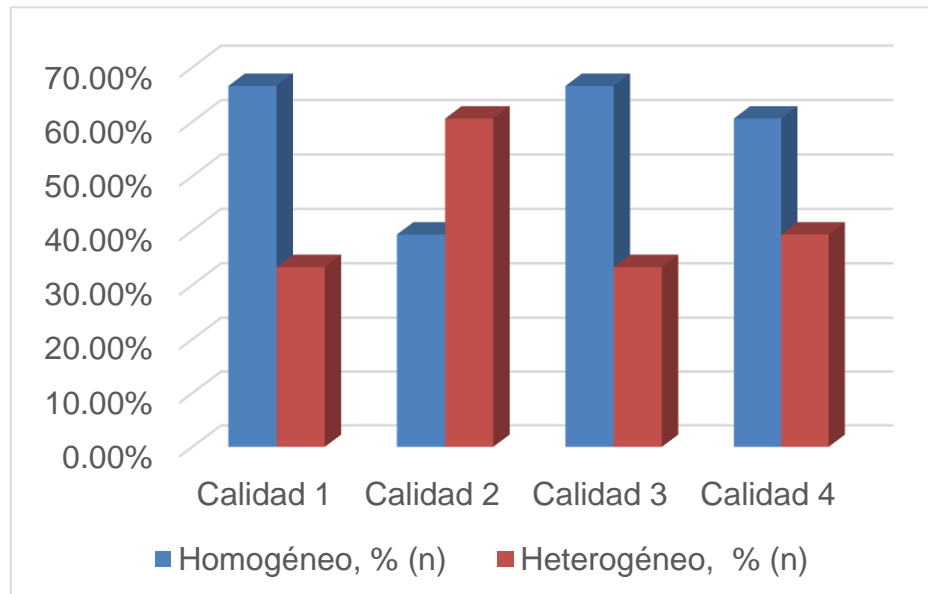
**Calidad I:** alta 72.72% (24/33), media 18.18% (6/33), baja 9.09% (3/33); **calidad II:** alta 24.24% (8/33), media 36.36% (12/33), baja 39.39% (13/33); **calidad III:** alta 18.18% (6/33), media 42.42% (14/33), baja 39.39% (13/33); **calidad IV:** alta 18.80% (6/33), media 36.36% (12/33), baja 45.45% (15/33).

**Figura 9.** Comparación de emisión de fluorescencia en ovocitos de alpaca (Fuente: propia).



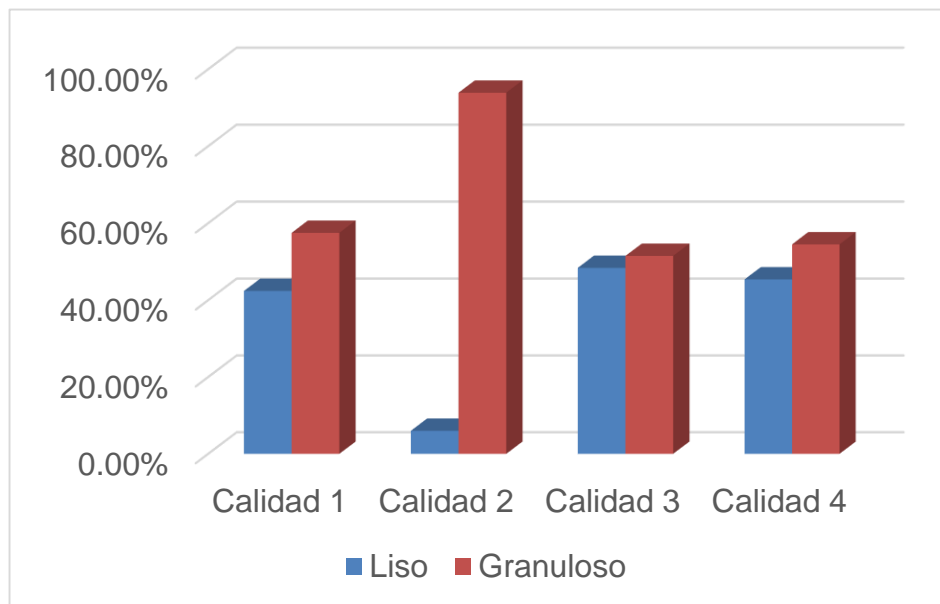
A) fluorescencia alta (79-126 pixeles) B) fluorescencia media (50.78.9 pixeles)  
C) fluorescencia baja (6-49.9 pixeles).

**Cuadro 6.** Porcentajes de distribución citoplasmática por calidades de ovocitos de alpaca.



**Calidad I:** homogéneo 66.60% (22/33), heterogéneo 33.30% (11/33); **calidad II:** homogéneo 39.30% (13/33), heterogéneo 60.60% (20/33); **calidad III:** homogéneo 66.60% (22/33), heterogéneo 33.30% (11/33); **calidad IV:** homogéneo 60.60% (20/33), heterogéneo 39.30% (11/33).

**Cuadro 7.** Porcentajes de agregados mitocondriales por calidades de ovocitos de alpaca.

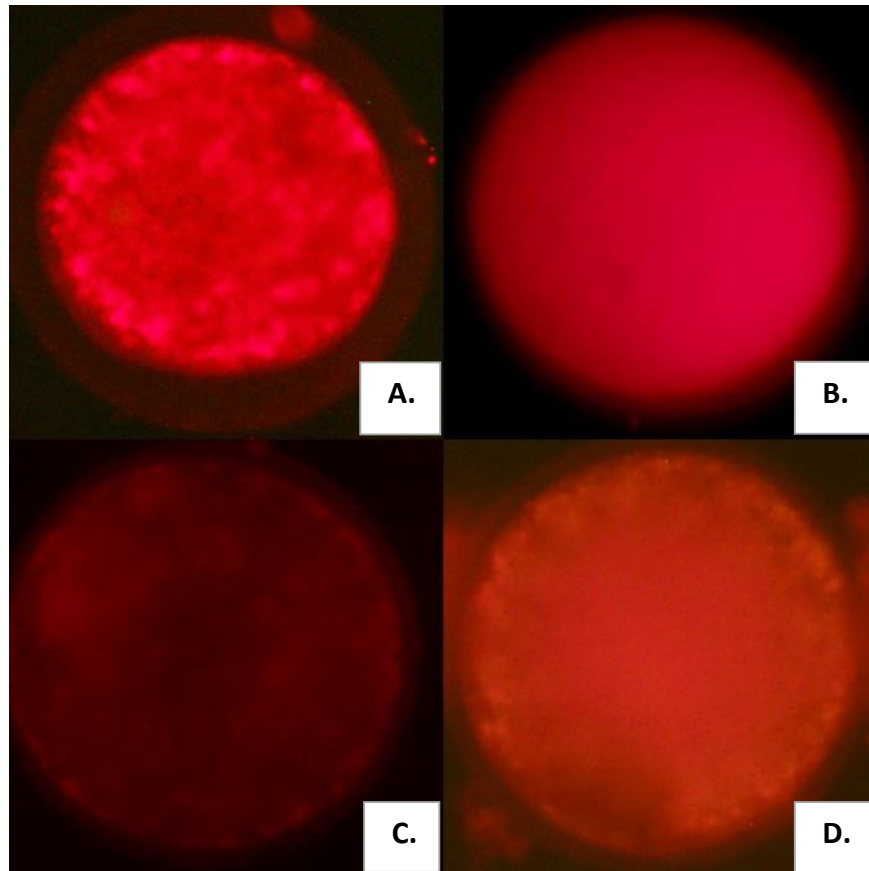


**Calidad I:** liso 42.40% (14/33), granuloso 57.50% (19/33); **calidad II:** liso 6% (2/33), granuloso 93.90% (31/33); **calidad III:** liso 48.40% (16/33), granuloso 51.50% (17/33); **calidad IV:** liso 45.40% (15/33), granuloso 54.50% (18/33).

**Cuadro 8.** Interacción de parámetros de distribución mitocondrial para la población total de ovocitos inmaduros de alpaca.

Distribución citoplasmática	Agregados mitocondriales	
	Granuloso	Liso
<b>Homogéneo</b>	23.5% (31/132)	34.9% (46/132)
<b>Heterogéneo</b>	40.9% (54/132)	0.8% (1/132)

**Figura 10.** Patrones de distribución mitocondrial en ovocitos inmaduros de alpaca (Fuente: propia).



A) Homogéneo granuloso B) Homogéneo liso C) Heterogéneo granuloso  
D) Heterogéneo liso

## V. DISCUSIÓN

La calidad de un ovocito inmaduro es determinada a través del número de células compactas del cumulus que lo rodea y la homogeneidad del citoplasma (De Loos *et al.*, 1989; El-Harairy *et al.*, 2007); sin embargo, esta evaluación no predice la capacidad que tiene el ovocito de madurar y/o ser fecundado. Según lo señalado por Curcio *et al.* (2014), una mejor forma de clasificar los ovocitos es en base a la evaluación de la condición de estructuras subcelulares, como el núcleo, el citoesqueleto y la mitocondria. Estudios realizados en diversas especies, han considerado la evaluación mitocondrial ovocitaria una herramienta de gran importancia para determinar la capacidad de maduración de estos. La evaluación mitocondrial comprende la evaluación de la distribución y la actividad mitocondrial (Iorga *et al.*, 2008; Saffie, 2009; de Paz *et al.*, 2001; Stojkovic *et al.*, 2001; Tarazona *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en ovocitos inmaduros, madurados *in vitro* (MIV) por 72 horas e *in vivo* en perra (Saffie, 2009), se observó que los ovocitos inmaduros presentaban dos tipos de distribución mitocondrial: homogéneo liso y homogéneo granuloso, estos dos patrones también se encontraron en este estudio, pero adicionalmente se encontraron dos más, heterogéneo liso y heterogéneo granuloso, en total 4 diferentes patrones de distribución mitocondrial. Lo que llamo la atención que al revisar los resultados de los ovocitos que fueron sometidos a MIV por 72 horas por Saffie (2009), se observaron tres patrones, dos de ellos igual a los ovocitos inmaduros del mismo estudio y uno adicional que fue heterogéneo granuloso. Estos resultados se acercan un poco más a lo encontrado en alpacas, si bien son dos poblaciones distintas de ovocitos, (ovocitos inmaduros en alpacas y ovocitos MIV por 72 horas en perras)

en ambas poblaciones se observan los patrones (heterogéneo granuloso, homogéneo liso y homogéneo granuloso). Los caninos, presentan una característica particular, ovulan los ovocitos en un estado inmaduro, específicamente en profase de la primera división meiótica (De los Reyes *et al.*, 2011), con lo cual al someterlos a MIV por 72 h llegaran a metafase II. La alpaca es una especie de ovulación inducida, ovula en metafase II (Buccione *et al.*, 1990) motivo por el cual los ovocitos inmaduros de alpaca ya se encuentran en esta fase de desarrollo y se podría considerar esto como una razón para explicar porque los hallazgos encontrados en este estudio se acercan a los hallazgos en ovocitos MIV por Saffie (2009).

En otro estudio realizado en gatas por Sowinska *et al.* (2017) se observó que el 80% de los ovocitos inmaduros mostraron localización periférica de las mitocondrias, el 16% localización homogénea y el 4% de localización heterogénea, 78% presentaron agregados mitocondriales y 22% no presentaron agregados. Lo cual difiere de lo encontrado en alpaca ya que la localización periférica no se tiene registrada en este estudio. En humanos, bovinos, porcinos y equinos, se ha reportado que la mayoría de los ovocitos inmaduros muestran localización mitocondrial periférica (Stojkovic *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2007; Van Blerkom, 2011); mientras que en mono rhesus, mono cynomolgus y hámster, las mitocondrias de los ovocitos aparecen distribuidas uniformemente en el citoplasma (Bavister *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2005). Por ello, se puede inferir que la ubicación de las mitocondrias en estado inmaduro varía según la especie. Si bien en el estudio de Sowinska *et al.* (2017) no se pudo identificar los cuatro patrones en los ovocitos inmaduros de alpaca, si tuvieron en común dos patrones registrados en gatos, homogéneo y heterogéneo, esto puede deberse a que las dos especies, tanto camélidos sudamericanos como felinos, presentan ovulación inducida (San Martín *et al.*, 1968), es decir ovulan ovocitos en metafase II, ya maduros. Si bien las características de distribución mitocondrial podrían variar entre especies, la coincidencia con la etapa, características en común o diferencias, podrían acercarnos a un patrón repetitivo que merece ser descrito.

A pesar de que no existen estudios similares, algunos justifican cuán importante es la actividad mitocondrial en el proceso de maduración de ovocitos, un estudio en



yeguas, por Torner *et al.* (2007) demostró que existe una relación directamente proporcional entre actividad mitocondrial y capacidad de MIV, además indica que la intensidad de emisión de fluorescencia está asociada con el tiempo de MIV, el objetivo del estudio fue evaluar la cromatina y el estado de las mitocondrias en diferentes momentos de la MIV (0 h, 18 h, 24 h, 32 h), los resultados arrojan que los ovocitos con baja emisión de fluorescencia (192-262  $\mu\text{A}$ ): 50.87% (58/114) fueron los de MIV a 0 h-18 h, mientras que los de alta emisión de fluorescencia (507-514  $\mu\text{A}$ ): 49.12% (56/114) fueron los de MIV a 32-24 h. Resultados similares fueron estudiados en gatos, en el cual el objetivo fue estudiar a la mitocondria en ovocitos inmaduros y MIV de gato, la población con alta emisión de fluorescencia (600-700  $\mu\text{A}$ ) fue MIV a 24 h (45 ovocitos), y baja emisión de fluorescencia (420-500  $\mu\text{A}$ ) fueron los ovocitos inmaduros (49 ovocitos) (Sowinska *et al.*, 2017). Para los ovocitos inmaduros de gatos y equinos el rango de actividad mitocondrial bajo va de 192-500 pixeles y en alpacas de 6-49.9 pixeles, comparándolos se encuentra una clara y abismal diferencia, lo cual determina que la emisión de fluorescencia varía entre especies. La emisión de fluorescencia alta en equinos y gatos fue encontrada en los ovocitos sometidos a MIV por alrededor de 24 h-32 h, con lo cual no se puede comparar los resultados frente a lo encontrado en este estudio en el cual no se sometió a maduración ningún ovocito. En los estudios ya mencionados no hablan de una emisión de fluorescencia media con lo cual, tampoco se podría comparar la encontrada en este estudio. La maduración es un evento clave en el cual cambios como el aumento de la actividad respiratoria para proporcionar ATP para la activación y el desarrollo de embriones antes de la implantación, son necesarios (Torner *et al.*, 2007), por ello en estos estudios observamos este aumento en la emisión de la intensidad de fluorescencia a lo largo de la maduración de un ovocito.

Adicionalmente, Saffie (2009) indica que la actividad mitocondrial en ovocitos de perra inmaduros fue alta (60-90 pixeles): 11.6% (24.94/215), media (30-59 pixeles): 64.7% (139.105/215), baja (1-29 pixeles): 23.7% (50.955/215). Se observa que la población de emisión de fluorescencia media fue la que más predominó, mientras que en el presente estudio fue la emisión de fluorescencia alta (79-126 pixeles) 72.72% (24/33). Si bien en el estudio de Saffie (2009) no se separan los ovocitos por calidades,

la actividad mitocondrial media en perras pudo ser predominante, ya que como se mencionó ovulan ovocitos en un estadio inmaduro, por otro lado, en alpacas predominó una actividad mitocondrial alta, ya que ovulan los ovocitos en un estadio maduro, los resultados pudieron darse por la diferente fisiología reproductiva entre especies.

## VI. CONCLUSIÓN

En conclusión, la descripción de la actividad y distribución mitocondrial en diferentes especies, ayudarán a potenciar la evaluación morfológica de ovocitos. Mediante estas evaluaciones se busca entender con más precisión cuales son las bases morfológicas y fisiológicas de la maduración ovocitaria, y con ello perfeccionar las biotecnologías reproductivas aplicadas a alpacas en Perú.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar J, Losinno L, Koncurat M, Miragaya MH. Nuclear cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in Young and aged mares. *Theriogenology*. 2002; 58:689-692.
- Álvarez G, Dalvit G, Achi M, Miguez M, Cetica P. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell*. 2009; 33 :167-177.
- Anesti V, Scorrano L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2005; 1757: 692-699.
- Austin CR, Bishop MH. Fertilisation in Mammals. *Biological Reviews*. 1957; 32: 296-348.
- Avissar Y, Choi J, DeSaix J. *Biology*. Texas: OpenStax College; 2013. Chapter 7, Cellular Respiration;206.
- Barakat I, Al-Himaidi A, Abd-Elkader O. Characterization of immature sheep oocytes and zona pellucida morphology using scanning electron microscope (sem). *Indian Journal of Animal Research*. 2014; 48: 370-374.
- Barritt JA, Kokot M, Cohen J, Steuerwald N, Brenner CA. Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reproductive biomedicine online*. 2002; 4: 243-247.
- Bavister B, Squirrell J. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Human Reproduction*. 2000; 15: 189-198.

- Berridge M, Bootman M, Lipp P. Calcium - a life and death signal. *Nature*.1998; 395: 645-648.
- Bleil JD, Wassarman PM. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology*. 1980; 76: 185-202.
- Brad AM, Bormann CL, Swain JE, Durkin RE, Johnson AE, Clifford AL, *et al.* Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 2003; 64: 492-498.
- Brevini T, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2007; 98: 23-38.
- Brevini T, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig pocytes. *Biology of reproduction*. 2005; 72: 1218-1223.
- Brucker C, Lipford GB. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Human Reproduction Update*. 1995; 1: 51-62.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction*. 1990; 43: 543-547.
- Camara Y. Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona, Facultad de Biología; 2005.
- Cebra C, McKane S, Tornquist S. Effects of exogenous insulin on glucose tolerance in alpacas. *Am J Vet Res*. 2001a; 62: 1544-1547.
- Chazotte B. Labeling mitochondria with MitroTracker dyes. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011; 8: 990-992.
- Chen H, Chan DC. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010; 1201: 21-25.

- Chouinard LA. A light- and electron-microscope study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepubertal mouse. *Journal of Cell Science*. 1975; 17: 589-615.
- Cottet- Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol J. Cytometric Assessment of Mitochondria Using Fluorescent Probe. *Cytometry*. 2011; 79: 405-425.
- Cran DG, Moor RM, Hay MF. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *Journals of Reproduction and Fertility*. 1980; 59: 125-132.
- Cummis JM. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004; 115: 23-29.
- Curcio B, Gastal M, Pereira G, Corcini C, Landim-Alvarenga F, Barros S, *et al.* Ultrastructural Morphology and Nuclear Maturation Rates of Immature Equine Oocytes Vitrified with Different Solutions and Exposure Times. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34, 632-640. 2013; 34: 632-640.
- Dahlborn K, Benlamlah S, Wallsten C. Glucose regulation in the camel. *Newmarket State R & D Publications*. 1992;414–415.
- Dalton C. Mitochondrial Dynamics During Mouse Oocyte Maturation. [Tesis doctoral]. Londres: University College London;2011.
- De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip AM. Morphology of immature bovine oocytes. *Molecular Reproduction and development*. 1989; 24:197-204.
- De los Reyes M, Palomino J, Parraguez VH, Hidalgo M, Saffie P, Reyes MD, *et al.* Mitochondrial distribution and meiotic progression in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 2011; 75: 346–353.
- De Paz P, Sanchez A, De la Fuente J, Chamorro C, Alvarez M, Anel E, *et al.* Ultrastructural and cytochemical comparison between cow and calf oocytes. *Theriogenology*. 2001; 55: 1107-1116.
- Del Campo MR, Del Campo CH, Donoso MX, Berland M, Mapletoft RJ. *In vitro* fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*. 1994; 41: 1219-1229.

- Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: From homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol.* 1999;516 :1–17.
- Dumollard R, Duchen M, Sardet C. Calcium signals and mitochondria at fertilization. *Semin cell dev biol.* 2006; 17: 314-323.
- Egerszegi I, Alm H, Rátky J, Heleil B, Brüssow KP, Torner H. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reproduction, Fertility, and Development.* 2010; 22: 830–838.
- Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Lüke S, Seidel T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion.* 2011; 11: 783-796.
- El-Harairy M, Shamiah S, Abdel-Khalek A, Khalil W. Effect of pregnancy status and harvesting technique and recovery rate and categories of Dromedary camel oocytes. *Egyptian Journal of Basic and Applied Physiology.* 2007; 6: 255-268.
- Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the Developmental Programs Controlling Nuclear and Cytoplasmic Maturation of Mouse Oocytes. *Developmental Biology.* 1994; 164: 1-9.
- Garner D, Thomas C. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development.* 1999; 53: 222-229.
- Green DP. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction.* 1997; 2: 147-156.
- Grindler N, Moley K. Maternal obesity, infertility and mitochondrial dysfunction: potential mechanisms emerging from mouse model systems. *Molecular Human Reproduction.* 2013; 19: 486-494.
- Hallap T, Nagy S, Jaakman U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology.* 2005; 63: 2311-2322.

- Horvath PM, Kellom T, Caulfield J, Boldt J. Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 1993; 34: 65-72.
- Howlett SK & Bolton VN. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. *J Embryol. Exp Morphol*. 1985; 87: 175-206.
- Huanca W, Condori R, Chileno M, García H, Cainzo J, Becerra J. Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Post fecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca. *Revista de Investigaciones veterinarias del Perú*. 2014; 25: 468-476.
- Iorga AI, Valentini L, De Santis T, Ambruosi B, Guaricci AC, Caira M, *et al.* Distribution of active mitochondria in canine oocyte is related to reproductive cycle stage but can be damaged during IVM cultura. *Reproduction in Domestic Animal*. 2008; 43: 127- 128.
- Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 88: 399-413.
- Kruger T, Menkveld R, Stander FS, Lombard C, Van der Merwe J, Van Zyl J, *et al.* Sperm Morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46: 1118-1123.
- Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009; 41: 1928-1939.
- Lee ST, Oh SJ, Lee EJ, Han HJ, Lim JM. Adenosine triphosphate synthesis, mitochondrial number and activity, and pyruvate uptake in oocytes after gonadotropin injections. *Fertility and Sterility*. 2006; 86:1164–1169.
- Leibfried, L, First NL. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature *In Vitro*. *Journal of Animal Science*. 1979; 48: 76-86.
- Li H, Chian R. Mitochondrial Dysfunction and Age- related Oocyte Quality. *Reproductive and Developmental Medicine*. 2017; 1: 45-54.



- Liu S, Li Y, Feng H, Yan J, Li M, Ma S, *et al.* Dynamic modulation of cytoskeleton during *in vitro* maturation in human oocytes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2010; 151: 1-7.
- Luo S, Schatten H, Sun Q. Sperm Mitochondria in Reproduction: Good or Bad and Where Do They Go?. *Journal of Genetics and Genomics*. 2013; 40: 549-556.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 2004; 61: 329-335.
- Makabe S, Naguro T, Stallone T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microscopy Research and Technique*. 2006; 69: 436-449.
- Mannella CA. Structural Diversity of Mitochondria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1147: 171-179.
- Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2005; 1763: 542-548.
- Mannella CA. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762: 140-147.
- Mendes A, Oliveira J, Nunes M. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. *Semina: Ciências Agrárias*. 2015; 36: 4365-4376.
- Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N, Larochette N, Susin SA, Marzo I, *et al.* Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1-triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett*. 1998; 61: 157-163.
- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, *et al.* Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku Medical*. 2006; 210: 137-144.

- Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 166–174.
- Nishi Y, Takeshita T, Sato K, Araki T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during *in vitro* maturation. *J Nippon Medical.* 2003; 70: 408-415.
- Nuñez K. Determinación de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides epididimarios de alpaca. [Tesis]. Perú: Universidad Científica del Sur, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas; 2018.
- O'Reilly CM, Fogarty KE, Drummond RM, Tuft RA, Walsh JV. Quantitative análisis of spontaneous mitochondrial depolarizations. *Biophys J.* 2003; 85: 3350–3357.
- Palma G. Biotecnología de la Reproducción. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. 2001; 1: 1-4.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1998; 145: 27-37.
- Poot M, Zhang Y, Krammer J, Wells K, Jones L, Hanzel D, *et al.* Analysis of Mitochondrial Morphology and Function with Novel Fixable Fluorescent Stains. *The Jowd of Histochemistry and Cytochemistry.* 1996; 44: 1363-1372.
- Preis K, Carnevale E, Coutinho da Silva M, Caracciolo di Brienza V, Gomes G, Maclellan L, *et al.* *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22° C. *Theriogenology.* 2004; 61: 1215- 1223.
- Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 793: 41–150.
- Ratto M, Berland M, Huanca W, Singh J, Adams G. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenoly.* 2005; 63: 2445-2457.
- Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry.* 1991; 30: 4480–4486.

- Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 2002; 63: 464–470.
- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. Egg Activation at Fertilization: Where It All Begins. *Developmental Biology*. 2002; 245: 237-254.
- Saffie P. Evaluación de la distribución mitocondrial en Ovocitos de perra: inmaduros, madurados *in vitro* y madurados *in vivo*. [Tesis]. Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; 2009.
- San Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodreguez R, Bustinza G, Acosta L. Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil*. 1968; 16: 395-399.
- Santiani A, Ugarelli A, Choez K, Pacheco J, Giuliano S, Evangelista- Vargas S. Estudio del potencial de membrana mitocondrial y peroxidación lipídica en espermatozoides de alpaca criopreservados con enzimas antioxidantes. *Proceeding of the VII World Congress on South American Camelids*. 2015; 592-596.
- Santos TA, El-Shourbagy S, StJohn JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertility and Sterility*. 2006; 85: 584-591.
- Scaduto RC, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. 1999; 76: 469–477.
- Schatten H, Sun QY, Prather R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014; 12: 111:122.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, *et al*. A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Developmental Cell* 2002; 2: 55-67.
- Shoubridge EA, Wai T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Current Topics in Developmental Biology*. 2007;77: 87–111.
- Silva P, Gadella B. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 2006; 65: 958-978.

- Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progress and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1241–54.
- Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baracca A. Evaluating mitochondrial membrane potential in cells. *Biosci Rep* 2007; 27: 11–21.
- Sowinska N, Müller K, Niżański W, Jewgenow K. Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat (*Felis catus*) after *in vitro* maturation and vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 1:1-8.
- Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves P, *et al.* Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*. 2001; 64: 904-909.
- Sturmey R, Otoole P, Leese H. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*. 2006; 132: 829-837.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, *et al.* Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*. 2001; 122: 155-163.
- Suzuki H, Satoh M, Toyokawa K. Changes in distribution of active mitochondria during oocyte maturation and fertilization in the hamster. *Journal of Mammalian Ova Research*. 2005; 22: 163–169.
- Tarazona AM, Rodriguez JI, Restrepo LF, Olivera-Ángel M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006; 41:5-11.
- Tas M, Evecen M, Ozdas O, Cirit U, Demir K, Birler S, *et al.* Effect of transport and storage temperature of ovaries on *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2006; 96: 30-34.
- Thomas C, Garner D, Dejarnette J, Marchall C. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*. 1998; 58: 786-793.

- Torner H, Alm H, Kanitz W, Goellnitz K, Becker F, Poehland R, *et al.* Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in horse oocytes during IVM. *Reproduction in Domestic Animals*. 2007; 42: 176–183.
- Torner H, Brüssow K, Alm H, Ratky J, Pöhland R, Tuchscherer A, *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*. 2004; 61: 1675, 1689.
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial inheritance between blastomeres in cleavage stage human embryos: determination at the pronuclear stage relationship to microtubular organization, ATP content and developmental competence. *Human Reproduction*. 2000; 15: 2621- 2633.
- Van Blerkom J, Runner MN. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *American Journal of Anatomy*. 1984; 171: 335-355.
- Van Blerkom J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. 1991. *Proc Natl Acad Sci*. 1991; 88:5031-5035.
- Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*. 2004; 128: 269-280.
- Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*. 2011; 11:797-813.
- Wang L, Wang D, Zou X, Xu C. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Zhejiang University*. 2009; 10: 483-492.
- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 872-884.
- Wilding M, Dale B, Marino M, Di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo M, *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 2001; 5: 909-917.

- Wolpert L, Tickle C, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. Principles of Development. 4th. ed. Oxford: Oxford University Press; 2010.
- Yousif LF, Stewart KM, Kelley SO. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *Chembiochem*. 2009; 10: 1939-1950.
- Zamzami N, Maisse C, Metivier D, Kroemer G. Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol* 2007; 80: 327–340.
- Zander-Fox D, Cashman KS, Lane M. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2013; 30: 107–116.