

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE  
APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE TRANSPORTE,  
COLECCIÓN Y MÉTODOS DE RECUPERACIÓN EN LA  
CANTIDAD Y CALIDAD OVOCITARIA DE ALPACAS  
HUACAYA (*Vicugna pacos*) POSTMORTEM**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**CARLOS REA DONGO**

**ABANCAY - PERÚ**

**2017**

i



**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE TRANSPORTE,  
COLECCIÓN Y MÉTODOS DE RECUPERACIÓN EN LA  
CANTIDAD Y CALIDAD OVOCITARIA DE ALPACAS  
HUACAYA (*Vicugna pacos*) POSTMORTEM**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la dicha de abrazar esta carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, aprender día a día y enseñarme que con humildad y esfuerzo todo es posible.

A mis padres: Ernesto y Ubaldina, y hermanos Jorge, Tony, Jimena, Nilton y Alex. Por su amor incondicional y ser mi mayor fortaleza y voluntad interna.

A mi enamorada por su aliento y consejos para doblar las barreras.

## AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme los conocimientos y valores necesarios para enfrentar una vida profesional.

Al Dr. Arturo Rodríguez Zamora, responsable del Laboratorio de Reproducción de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, por su disposición y apoyo constante en la evaluación de las muestras y posterior ejecución de la investigación.

Agradezco a mi asesor MC. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, quien llevó las gestiones para la ejecución de esta investigación y sus invaluables conocimientos que sirvieron de apoyo; además, supo guiar el desarrollo de esta tesis desde el inicio hasta su culminación.

A cada uno de los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que impartieron sus conocimientos para mi formación profesional.

A los miembros del Jurado Evaluador de esta tesis: Mag. Virgilio Machaca Machaca, MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes y MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe. Por su apoyo y tiempo en la evaluación del presente estudio.

A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron con la realización de esta tesis.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA  
BASTIDAS DE APURÍMAC**

**Dr. Leonardo Adolfo Prado Cárdenas**  
**RECTOR**

**Dr. Rolando Ramos Obregón**  
**VICERRECTOR ACADÉMICO**

**Dra. Iris Eufemia Paredes Gonzales**  
**VICERRECTORA DE  
INVESTIGACIÓN**

**Mag. Dora Yucra Vargas**  
**DECANA (i) DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**ASESOR**



---

**MC. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez**  
**ASESOR**

## ÍNDICE

|  | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN  | viii |
| ABSTRACT                                       | viii |
| I. INTRODUCCIÓN                                | 1    |
| II. MARCO TEÓRICO                              | 3    |
| 2.1. Antecedentes de la investigación          | 3    |
| 2.2. Bases teóricas                            | 6    |
| 2.2.1 Generalidades de la alpaca               | 6    |
| 2.2.2 Anatomía del ovario de la alpaca         | 6    |
| 2.2.3 Estacionalidad reproductiva              | 7    |
| 2.2.4 Dinámica folicular                       | 7    |
| 2.2.5 Fertilización <i>in vitro</i>            | 8    |
| 2.2.6 Maduración de ovocitos                   | 8    |
| 2.2.7 Recuperación de complejos ovocito-cumulo | 9    |
| 2.2.8 Medios de transporte de ovarios          | 9    |
| 2.2.8.1 Buffer Fosfato Salino (PBS)            | 10   |
| 2.2.8.2 Cloruro de sodio                       | 11   |
| 2.2.9 Métodos de colección de ovocitos         | 12   |
| 2.2.9.1 Método de aspiración                   | 13   |
| 2.2.9.2 Método de slicing                      | 13   |
| 2.2.10 Medios de colección de ovocito          | 14   |

|   |    |
|---|----|
| <b>Medio de cultivo tisular (TCM-199)</b>                 | 14 |
| <b>2.2.11 Cantidad de ovocitos</b>                        | 15 |
| <b>2.2.12 Calidad de ovocitos</b>                         | 15 |
| <b>2.3. Bases conceptuales</b>                            | 16 |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>                            | 18 |
| <b>3.1. Localización</b>                                  | 18 |
| <b>3.2. Diseño experimental</b>                           | 18 |
| <b>3.3. Colección y transporte de ovarios</b>             | 19 |
| <b>a) Colección de ovarios</b>                            | 19 |
| <b>b) Transporte de ovarios</b>                           | 19 |
| <b>3.4. Recuperación de ovocitos</b>                      | 19 |
| <b>a) Por método de aspiración</b>                        | 20 |
| <b>b) Por método de slicing</b>                           | 20 |
| <b>3.5. Evaluación de ovocitos</b>                        | 21 |
| <b>3.6. Análisis estadístico</b>                          | 21 |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                         | 23 |
| <b>4.1. Ovocitos recuperados</b>                          | 23 |
| <b>4.2. Cantidad de ovocitos colectados según calidad</b> | 25 |
| <b>V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>                  | 29 |
| <b>a) CONCLUSIONES</b>                                    | 29 |
| <b>b) RECOMENDACIONES</b>                                 | 30 |
| <b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                     | 31 |
| <b>ANEXOS</b>   | 37 |



## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>cuadro 1.</b> Ovocito recuperados ( media $\pm$ desviación estándar) del ovario de alpacas Huacaya posmortem, según medio de transporte, medios de colección y métodos de recuperación                     | 25 |
| <b>Cuadro 2.</b> Efecto del método de recuperación sobre la cantidad de ovocitos del ovario según calidad, en Alpacas Huacaya   | 26 |
| <b>Cuadro 3.</b> Base de datos (TRANS = Medio de transporte; RECUP = Método de recuperación; COLEC = medio de colección; REP = repetición; CAL = Calidad de ovocito; OVO = cantidad de Ovocitos recuperados). | 44 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1.</b> Recolección de ovarios en el Camal Municipal de Huancavelica.   | 38   |
| <b>Figura 2.</b> Cajas de poliestireno rotuladas para los dos medios de transporte de ovarios.                                       | 38   |
| <b>Figura 3.</b> Muestras de ovarios que arribaron al laboratorio.   | 39   |
| <b>Figura 4.</b> Medios de colección (TCM o PBS) de ovocitos, mantenidos en baño María.  | 39   |
| <b>Figura 5.</b> Recuperación de ovocitos mediante el método de aspiración folicular.  | 40   |
| <b>Figura 6.</b> Método de recuperación de ovocitos por el método de slicing.  | 40   |
| <b>Figura 7.</b> Frascos rotulados según medios de colección de ovocitos, medios de transporte y métodos de recuperación ovocitaria. | 41   |
| <b>Figura 8.</b> Aspiración del sedimento folicular según los tratamientos.  | 41   |
| <b>Figura 9.</b> Evaluación estereomicroscópica de los ovocitos de alpaca.   | 42   |
| <b>Figura 10.</b> Ovocitos recuperados para su posterior evaluación.   | 42   |
| <b>Figura 11.</b> Ovocito de calidad 1, se observa mayor de tres capas de granulosa.   | 43   |

## RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la cantidad y número de ovocitos obtenidos según calidad, mediante diferentes métodos de recuperación, medios de colección, medios de transporte de ovarios de alpacas Huacaya postmortem. Se utilizaron ovarios ( $n = 160$ ) de alpacas beneficiadas en el Camal Municipal de Huancavelica, evaluados en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. En los tratamientos se usó dos medios de transporte de ovarios: buffer fosfato salino (PBS), NaCl; dos medios de colección de ovocitos: medio de cultivo tisular (TCM - 199), PBS; dos métodos de recuperación de ovocitos: aspiración folicular, slicing. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2 \times 2 \times 2$ , se realizó el análisis de varianza. Se transportó los ovarios en medio PBS o NaCl, en una caja de poliestireno entre 30 a 36 °C aproximadamente por 6 h, en el laboratorio se les mantuvo a 37 °C durante la evaluación. Según tratamientos, se aspiraron ovocitos de folículos de 2 a 6 mm de diámetro, con aguja hipodérmica, se colectaron ovocitos mediante cortes de ovario, luego el contenido colectado se sedimentó por 15 min. Se evaluó la cantidad y calidad de ovocitos mediante la morfología con estereomicroscopio. Se colectó mayor ( $P < 0.05$ ) cantidad de ovocitos en promedio por ovario con el método de slicing (slicing:  $10.53 \pm 0.53$ ; aspiración:  $4.98 \pm 0.46$ ). Se obtuvo mayor ( $P < 0.05$ ) cantidad de ovocitos en promedio según calidad 1, 2, 3 y 4 con el método de slicing (calidad 1, 2, 3, 4 para slicing:  $2.83 \pm 0.13$ ,  $4.09 \pm 0.28$ ,  $1.33 \pm 0.03$ ,  $2.29 \pm 0.19$ ; para aspiración:  $1.36 \pm 0.08$ ,  $2.01 \pm 0.21$ ;  $0.64 \pm 0.16$ ;  $0.96 \pm 0.14$  respectivamente); con ambos métodos de recuperación se colectaron mayor porcentaje de ovocitos de calidad 1 y 2: 67.8% con aspiración; 65.7% con slicing. El medio de transporte de ovarios PBS o NaCl, medio de colección de ovocitos PBS o TCM no afectaron ( $P > 0.05$ ) la cantidad de ovocitos y el número de ovocitos recuperados según calidad. En conclusión, se recupera mayor cantidad de ovocitos y mayor número de ovocitos obtenidos según calidad, mediante el método de slicing que el método de aspiración folicular.

**Palabras clave:** TCM, PBS, disección, ovocito, Huacaya, ovario

## ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the quantity and number of oocytes obtained according to quality, by of different recovery methods, medium of collection, medium of transport of ovaries from postmortem Huacaya alpacas. They were used ovaries ( $n = 160$ ) of slaughtered alpacas in the slaughterhouse municipality of Huancavelica, evaluated in the Animal Reproduction Laboratory of the National University of the saint Cristobal of Huamanga. In the treatments were used two transport medium of the ovarian: phosphate buffered saline (PBS), NaCl; two collection médium of the oocyte: tissue culture medium (TCM-199), PBS; two methods of recovery of the oocyte: follicular aspiration, slicing. The treatments were distributed in a completely randomized design with  $2 \times 2 \times 2$  factorial arrangement, analysis of variance was performed. The ovaries were transported in PBS or NaCl medium in a polystyrene box at approximately  $30$  to  $36$  ° C for 6 h, in the laboratory they were maintained at  $37$  ° C during the evaluation. According to treatments, oocytes were aspirated from follicles 2 to 6 mm of diameter, with a hypodermic needle, oocytes were collected by ovarian sections, then the collected contents were sedimented for 15 min. The quantity and quality of oocytes were evaluated by stereomicroscope morphology. A greater number of oocytes ( $P < 0.05$ ) were collected per ovary with the slicing method (slicing:  $10.53 \pm 0.53$ , aspiration:  $4.98 \pm 0.46$ ). A higher ( $P < 0.05$ ) quantity of oocytes was obtained on average according to quality 1, 2, 3 and 4 with the slicing method (quality 1, 2, 3, 4 for slicing:  $2.83 \pm 0.13$ ,  $4.09 \pm 0.28$ ,  $1.33 \pm 0.03$ ,  $2.29 \pm 0.19$ , for aspiration:  $1.36 \pm 0.08$ ,  $2.01 \pm 0.21$ ,  $0.64 \pm 0.16$ ,  $0.96 \pm 0.14$  respectively); with both recovery methods, a higher percentage of quality 1 and 2 oocytes were collected: 67.8% with aspiration; 65.7% with slicing. Ovary transport medium PBS or NaCl, collection medium of PBS or TCM oocytes did not affect ( $P > 0.05$ ) the number of oocytes and the number of oocytes recovered according to quality. In conclusion, more oocytes and more oocytes were obtained according to quality, using the slicing method than the follicular aspiration method.

**Key words:** TCM, PBS, dissection, oocyte, Huacaya, ovary

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee una población de 3685516 alpacas (Suri, 442013; Huacaya, 2909212; Híbridas, 265135) [INEI, 2012]. De las cuales alrededor del 8% de alpacas son mejoradas, la mayor cantidad de alpacas son de baja calidad genética, lo cual repercute en la economía de los pobladores andinos (Alvarado, 2006). Esta calidad genética, entre otros factores, está relacionada directamente con la fertilidad, que cada vez es más afectada (Huanca, 2008).

Las biotecnologías reproductivas en camélidos que se están desarrollando en el Perú incluyen la inseminación artificial, transferencia de embriones, criopreservación de gametos y estudios preliminares sobre fertilización *in vitro* (Huanca, 2005). Debido a que los protocolos de recuperación y la maduración de ovocitos afectan la fertilización *in vitro* y estas son bajas (Leisinger *et al.*, 2014; Conde *et al.*, 2008). Los estudios futuros que implican la aplicación de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos deben centrarse en el desarrollo de protocolos estandarizados para la maduración *in vitro* de ovocitos y cultivo de embriones, estos avances deben contribuir a la producción exitosa de la primera cría de camélidos sudamericanos derivado de tecnologías *in vitro* (Leisinger *et al.*, 2014); que permitiría la posibilidad de obtener mayor número de generaciones de poblaciones en tiempo menor (Conde *et al.*, 2008).

Por las consideraciones anteriores, hay necesidad de mejorar el transporte de ovarios, medios de colección y métodos de recuperación ovocitaria, para obtener más cantidad de ovocitos de calidad, que sirvan para la maduración *in vitro*, que posteriormente se pueda mejorar las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos. El estudio tuvo como objetivo general evaluar la cantidad y número de ovocitos según calidad obtenidos por diferentes métodos de recuperación, medios de colección, medios de transporte de ovarios de alpacas Huacaya postmortem.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación

Se evaluaron la cantidad y calidad de ovocitos de alpacas, obtenidos por dos métodos, se utilizaron 40 ovarios de alpacas. Para el método de aspiración folicular, se aspiraron folículos de 2 mm de diámetro con aguja 20 G x 1 y para el método corte los ovarios fueron cortados en forma longitudinal y transversal con bisturí. El número de ovocitos recuperados fue superior por el método de corte ( $10.00 \pm 7.01$ ) comparando con el método de aspiración folicular ( $4.50 \pm 2.06$ ) para alpacas. En cuanto a la calidad, no se encontró el efecto de métodos de colección (aspiración folicular o corte) sobre la categoría de los ovocitos en alpacas (Vasquez *et al.*, 2015).

Se recuperaron ovocitos para fertilización *in vitro* en llamas utilizando dos técnicas. La primera consistió en el desmenuzado del ovario con ayuda de una hoja de afeitar, con este método se recuperó 27 ovocitos por llama descartándose el 26% de los 1324 complejos de ovocito cumulus (COCs) recuperados. Además, se utilizó la técnica de punción de folículos de los ovarios para la recuperación de los COCs de la llama utilizando ovarios recuperados del camal, con esta técnica se recuperó 6.4 ovocitos por llama (Del Campo *et al.*, 1994).

Se obtuvo ovocitos de 270 ovarios (135 alpacas) de hembras vacías en edad reproductiva, en solución fisiológica al 0.9% a 30 a 35°C, al que se agregó penicilina G potásica. Utilizando tres técnicas de recuperación de complejo ovocitos Cumulus (COCs). Para la aspiración folicular, se utilizó 98 ovarios (49 alpacas), con aguja 21G x 1½. Con el slicing folicular (incisión de la superficie del foliculo del ovario), 86 ovarios (43 alpacas). Para la disección ruptura folicular, se utilizaron 86 ovarios (43 alpacas), y se procedió a diseccionar y aspirar folículos de 2 a 6 mm en los tres casos, obteniendo como resultado 101, 105 y 124 ovocitos respectivamente, y con un porcentaje de COCs aptos considerando los ovocito de clase I y II, 63.17, 67.90 y 72.36% (Gómez *et al.*, 2013).

En un experimento Benavides *et al.* (2015), utilizaron 116 ovarios para la técnica de aspiración y 88 ovarios de alpacas para la técnica de disección. Se recuperaron 772 ovocitos con el método de aspiración y 1134 con el método de disección, pero luego del proceso de selección, se utilizaron 451 y 449 ovocitos, procedentes de aspiración y disección, respectivamente. Los ovocitos fueron categorizados de acuerdo a su calidad como A (excelente), B (buena) y C (mediana). Los resultados muestran una diferencia en el número de ovocitos recuperados por ovario ( $P < 0.05$ ), a favor del método de disección. No hubo diferencias significativas entre categorías de ovocitos según el método de colección.

Ruiz *et al.* (2011) evaluaron la viabilidad posdescongelamiento de ovocitos de alpaca vitrificados luego de la maduración *in vitro*. En este proceso se recuperaron 96 ovarios de alpaca procedentes del Camal Municipal de Huancavelica, Perú, los



cuales fueron llevados en termos a temperatura ambiente al Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, dentro de las tres horas siguientes al sacrificio de los animales. Folículos pequeños (2 a 6 mm) se aspiraron con ayuda de agujas 21 G en jeringas de 5 mL. Se recolectaron en promedio 3.5 complejos ovocito-cumulus (COCs) por ovario, recuperándose 667 COCs, y siendo seleccionado el 69% de ellos como apto para la maduración *in vitro*.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes temperaturas de transporte (35°C, 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. Se formaron dos grupos. El grupo G1 (n=10) correspondió a ovarios colocados en solución salina a 35°C y el grupo G2 (n=10) a ovarios colocados en solución salina a 4°C. Fueron transportados al laboratorio en un lapso de 18 horas. En cada grupo, usando el método de aspiración los ovocitos fueron colectados desde los ovarios, siendo colocados en solución salina a 35°C. Se evaluó la calidad morfológica y diámetro de los ovocitos colectados. Los resultados obtenidos fueron: G1: calidad morfológica 54% de ovocitos de categoría I y II, diámetro de los ovocitos  $0.17 \pm 0.03$  mm,  $3.5 \pm 1.7$  ovocitos colectados de  $5.1 \pm 2.3$  folículos > 3 mm; y para G2: calidad morfológica 36% de ovocitos de categoría I y II, diámetro de los ovocitos  $0.17 \pm 0.03$ mm,  $3.6 \pm 2.1$  ovocitos colectados de  $6.6 \pm 1.6$  folículos > 3mm. Diferencia estadística significativa fue observada entre la calidad morfológica de ovocitos obtenidos desde ovarios de alpacas transportados a 35°C y 4°C. Los resultados nos sugieren una mejor calidad morfológica en ovocitos procedentes de ovarios transportados

en suero fisiológico a 35°C respecto a los transportados a 4°C (Huanca *et al.*, 2007b).

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1 Generalidades de la alpaca**

Del quechua Alpaqo o Paqo – lama Pacos, es un camélido capaz de alimentarse con pastos muy pobres. Llega a medir 100 cm, como promedio y a pesar entre 60 a 70 kg de peso vivo en edad adulta y tener una cría por año, se discute aun si tiene su origen en el Huanaco o Vicuña, presenta dos variedades o razas, Huacaya y Suri. Su periodo de gestación es de 330 días (De los Ríos, 2006).

### **2.2.2 Anatomía del ovario de la alpaca**

Los ovarios de los camélidos sudamericanos en especial de las alpacas presentan formas irregulares, presentando dos formas más comunes (elipsoide y globular), particularmente cuando se presentan múltiples folículos, esto dependiendo del estadio de maduración. Por lo general presentan pequeños folículos que no pueden ser detectados por palpación (1 a 3 mm), como también se puede observar folículos maduros con un tamaño de 3 mm a más (Fowler, 1989).

El ovario de la alpaca, por lo general es de forma globosa irregular, semejando en algunos casos al ovario de la cerda, especialmente cuando contiene numerosos folículos en desarrollo. La extremidad tubo-ovárica (bursa) cubre totalmente al ovario. El ovario izquierdo es ligeramente más pesado ( $2.40 \pm 1.34$  g) que el derecho ( $1.87 + 0.94$  g) cuando no contienen un cuerpo lúteo activo, en cuyo caso el peso se incrementa entre un 60 y 100%. Las dimensiones son las siguientes:

largo,  $1.6 \pm 0.3$  cm y ancho,  $1.1 \pm 0.2$  cm. Cuando los folículos alcanzan un diámetro mayor a 4 mm, así como el cuerpo lúteo, éstos se proyectan sobre la superficie del ovario en forma muy prominente y son fácilmente identificables. Folículos entre 5 y 12 mm son considerados normales, mientras que estructuras mayores se consideran patológicas (Sumar, 2007).

### **2.2.3 Estacionalidad reproductiva**

Los camélidos sudamericanos en especial las alpacas son considerados generalmente estacionales en su actividad reproductiva en las zonas donde tradicionalmente se crían en su hábitat natural, los nacimientos se producen agrupados en la época de mayor lluvia (diciembre a marzo), cuando el forraje es más abundante, pero si son mantenidos en buen estado corporal y los machos separados de las tropas de hembras presentan una actividad ovárica durante todo el año (Franklin, 1982). Aunque baja la tasa ovulatoria a partir de agosto, debido a que no se encuentra suficiente forraje para que las alpacas estén en óptimas condiciones (Bonacic, 1991).

### **2.2.4 Dinámica folicular**

Los folículos son la unidad fundamental que determina desde el nacimiento el potencial reproductivo que puede exhibir una hembra a lo largo de su vida, la calidad del ovocito condicionará la supervivencia embrionaria, establecimiento y el mantenimiento de la preñez y el desarrollo fetal (Rodríguez, 2013). La foliculogénesis, ovogénesis, ondas foliculares y las hormonas sexuales involucradas en el ciclo estral, tienen relación con el tamaño folicular en la vida reproductiva de la hembra (Motta *et al.*, 2011). La dinámica folicular es afectada

por los efectos ambientales y los estados fisiológicos de las hembras que impiden establecer un patrón específico, para el desarrollo normal de los procesos de formación, desarrollo y la maduración del ovocito y del folículo (Restrepo, 2010). Exhiben ondas de crecimiento folicular ovárico y son ovuladores inducidos, por lo tanto no exhiben ciclos estrales en la forma de especies que ovulan espontáneamente (Gigle *et al.*, 2016).

### **2.2.5 Fertilización *in vitro***

Las tecnologías de reproducción asistida tienen muchas aplicaciones en la ganadería. La investigación dirigida a mejorar la calidad de los ovocitos y la producción *in vitro* de embriones se ha centrado principalmente en la optimización de las condiciones de cultivo (Huanca, 2012).

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en los camélidos sudamericanos, permitiría la propagación de los animales genéticamente superiores, especialmente los que poseen fibra fina y de colores naturales (Miragaya *et al.*, 2006).

### **2.2.6 Maduración de ovocitos**

En cada ciclo estral, un número de folículos se activan para entrar en una fase de crecimiento, se caracteriza por la proliferación de células de la granulosa y un aumento en el tamaño de los ovocitos (Ali *et al.*, 2006).

Ruiz *et al.* (2015) señalan que en alpacas varios autores reportan diferentes tiempos de maduración *in vitro* desde 24 a 38 h; estos resultados nos llevan a pensar que el tiempo óptimo de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca y llama aún no está definido.

### 2.2.7 Recuperación de complejos ovocito-cumulo

Se denomina ovocito al óvulo en diferenciación (RAE, 2016). Distintas metodologías se han evaluado para la recuperación de complejos ovocito-cúmulo (COCs) en hembras de camélidos sudamericanos. Ovarios de alpacas y llamas beneficiadas son una fuente adecuada para la recuperación de COCs, por la gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación *in vitro* y para su utilización como receptores de núcleo de células donadoras en un programa de transferencia nuclear (Ruiz, 2008). La primera recuperación de ovocitos para su fecundación *in vitro* en camélidos sudamericanos se hizo en llamas; en esta investigación se desmenuzó el ovario con ayuda de una hoja de afeitar y posterior evaluación y clasificación de los ovocitos (Del Campo *et al.*, 1994). La colección de COCs se realiza de folículos que tienen un tamaño en promedio de 3 a 6 mm mediante técnicas de aspiración o punción folicular y el método de slicing (Vasquez *et al.*, 2015; Del Campo *et al.*, 1994).

### 2.2.8 Medios de transporte de ovarios

El transporte de ovarios para proceso de fecundación *in vitro*, se realiza desde el matadero al laboratorio, en medios isotónicos de solución salina y a temperatura adecuada (Huanca *et al.*, 2007b). Se evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre la tasa de maduración nuclear y tasa de división postfecundación a 72 horas de ovocitos de alpacas. Los CCOs fueron obtenidos de ovarios procedentes de animales beneficiados en el camal y transportados a 35 °C en solución salina 0.9% suplementada con antibiótico antimicótico (Huanca *et al.*, 2014). Los ovarios

pueden permanecer en solución salina 0.9% a temperatura de 30 a 37°C hasta 8 horas sin llegar a afectar la calidad de los ovocitos (Gomez *et al.*, 2013). Uno de los medios más comunes es el fosfato buffer salino y cloruro de sodio.

#### 2.2.8.1 Buffer Fosfato Salino (PBS)

El tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline), es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano (isotónica). Se trata de una solución isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; no es tóxica para las células de los mamíferos, y su pH es de 7.4. La solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH, comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de cloruro de sodio, fosfato de sodio y, en algunas formulaciones, con fosfato de potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal (Genómica, 2016).

Existe una gran variedad de medios de cultivo (TCM-199), PBS, HAM-F10, etc., que pueden utilizarse para recolectar oocitos, el más usado actualmente es el Dulbecco's fosfato buffer salino (PBS). Este medio tiene la particularidad que su buffer es fosfato lo que lo hace más estable a los cambios de pH. Además, es un medio de fácil preparación, sus componentes son encontrados sin mayores problemas en el comercio y son de relativo bajo costo. Comúnmente se habla de dos tipos de medios de cultivos. El medio de colección o de lavado (flushing) y el medio de mantención. La diferencia fundamental entre ambos radica en la cantidad de proteína agregada, el primero posee 1 a 2% de proteína (suero fetal, albúmina bovina, etc.), en cambio el medio de mantención posee 10 a 20% de proteína y a veces se enriquece con glucosa (1 mg/mL) y piruvato de sodio (0.33 mM) [Del Campo, 1983].

#### 2.2.8.2 Cloruro de sodio

Cloruro de sodio es un compuesto iónico formado por un catión sodio ( $\text{Na}^+$ ) y un anión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), y, como tal, puede reaccionar para tener cualquiera de estos dos iones. Como cualquier otro cloruro iónico soluble, precipita cloruros insolubles cuando es agregado a una solución de una sal metálica apropiada como nitrato de plata. El ión  $\text{Na}^+$  es causante de la regulación osmótica celular regulando el potencial de membrana expulsando el ión  $\text{K}^+$ . El suero fisiológico o también conocido como solución salina normal es una solución estéril de cloruro de sodio al 0.9% (peso/volumen) ( $\text{NaCl}$ ) [Reyes *et al.*, 2016].

El cloruro de sodio provee de suplementos electrolíticos. El sodio es el principal catión del líquido extracelular y actúa en el control de distribución de agua,

balance electrolítico y presión osmótica de los fluidos corporales. El sodio también se asocia a cloruro y bicarbonato en la regulación del balance ácido-base. El cloruro, el principal anión extracelular, sigue la disposición fisiológica del sodio y los cambios en el balance ácido-base del organismo son reflejados por cambios de la concentración sérica de cloruro (Fresenius, 2016).

### 2.2.9 Métodos de colección de ovocitos

Ovarios de alpacas y llamas beneficiadas son una fuente adecuada para la recuperación de COCs, por la gran disponibilidad de ovocitos para la investigación en la estandarización de protocolos de maduración y fecundación *in vitro* (Ruiz, 2008). La obtención de ovocitos puede ser realizada de ovarios procedentes de mataderos o por aspiración transvaginal (Huanca *et al.*, 2007a).

Los ovocitos se liberan del folículo por punción y aspiración con una aguja de 18 G. En hembras jóvenes (1 a 3 meses de edad), los folículos son pequeños y la textura suave del ovario hace difícil seleccionar ovocitos por aspiración folicular. Por tanto, los ovocitos a partir de estos ovarios se obtienen rutinariamente por corte de la superficie del ovario, la recuperación de un grupo de ovocitos con un grado heterogéneo de crecimiento y atresia desde desconocidas etapas de desarrollo del folículo. En este caso, los ovocitos son seleccionados por el diámetro y la apariencia morfológica de las células del cúmulo y ooplasma (Paramio *et al.*, 2016).

Los ovocitos inmaduros pueden recuperarse de matadero de ovarios o de animales vivos. Los ovarios del matadero proporcionan una fuente abundante y barata



obtención de ovocitos que se pueden recuperar por aspiración folicular, slicing, o disección del folículo (De Souza-Fabian *et al.*, 2014).

#### **2.2.9.1 Método de aspiración**

La aspiración folicular se realiza de folículos pequeños (2 a 6 mm) se aspiran con ayuda de agujas 21 G en jeringas de 5 mL (Ruiz *et al.*, 2015). Se aspiran los contenidos foliculares de los folículos (3 a 10 mm) con aguja de calibre 18 G unida a una jeringa desechable (Nowshari, 2005).

Vasquez *et al.* (2015) utilizó para evaluar la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos de ovarios de alpacas y llamas, el método de aspiración folicular, se colectaron de folículos de 2 mm de diámetro con aguja 20 G. En llamas y alpacas puncionando folículos de ovarios recuperados del camal, se aspiraron los COCs de con ayuda de una jeringa (Del Campo *et al.*, 1992).

#### **2.2.9.2 Método de slicing**

Es una técnica que consiste en realizar repetidos cortes longitudinales y transversales con un bisturí en la superficie del ovario colocado sobre una placa Petri (Martínez, 1992).

La recolección de ovocitos por corte consiste en realizar el corte del ovario fijado con una pinza hemostática y los cortes se realizan en forma longitudinal y transversal con un bisturí, realizando cortes a 2 mm de distancia aproximadamente sobre la placa Petri (Vasquez *et al.*, 2015).

La disección quirúrgica de los folículos del ovario se deposita en una placa Petri y se fija con una pinza quirúrgica, posteriormente con la ayuda del micro-escalpelo la pared de cada folículo visible se secciona consiguiendo la expulsión del contenido folicular (Quintana *et al.*, 2012).

La disección de la corteza ovárica se realiza con la ayuda de una hoja de bisturí y luego se sumerge en la solución de lavado pre maduración (Benavides *et al.*, 2015).

#### **2.2.10 Medios de colección de ovocito**

##### **Medio de cultivo tisular (TCM-199)**

El TCM-199 es un medio de cultivo tisular (Tissue Culture Medium 199), que está compuesto por sales de Earles con bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (albumina bovina o suero) [Ahumada, 2009].

Muchos medios de cultivo de tejidos temprano se formularon predominantemente de productos de origen animal y/o extractos de tejidos. En 1950, Morgan y sus colaboradores informaron de sus esfuerzos para producir una fuente nutricional totalmente definido para cultivos celulares. Sus experimentos, llevados a cabo con varias combinaciones de vitaminas, aminoácidos, y otros factores revelaron que el crecimiento del tejido explantado podría medirse en lo que se conoce como Medium 199. Sin embargo, se encontró que la adición de un cultivo a largo plazo de las células requiere suplemento de suero para el fluido de cultivo. Cuando complementado adecuadamente, Medium 199 tiene una amplia aplicabilidad

especies, en particular para el cultivo de células no transformadas. Es ampliamente utilizado en virología, producción de vacunas y en el cultivo *in vitro* de explantes primarios de los tejidos epiteliales del cristalino y de rata de páncreas de ratón (Sigma-Aldrich, 2016).

#### **2.2.11 Cantidad de ovocitos**

La cantidad de ovocitos se refiere, al número de ovocitos recuperados de los folículos ováricos, por cualquiera de los métodos existentes. Los métodos más comunes en camélidos sudamericanos para obtención de ovocitos son el corte (disección) y aspiración (punción) folicular (Del Campo *et al.*, 1992; Ruiz *et al.*, 2007).

La disponibilidad de ovocitos es la principal limitante, sobretodo en CSA, por la lejanía de los centros de crianza y por el bajo número de camales para el beneficio de estas especies, los mataderos no siempre se encuentran cerca a los laboratorios (Huanca *et al.*, 2007a; Ruiz, 2009). Esta realidad dificulta la implementación de líneas de investigación en la producción *in vitro* de embriones (Ruiz, 2009).

#### **2.2.12 Calidad de ovocitos**

Sobre la calidad de ovocitos los embriólogos coinciden en que el principal desafío en la tecnología de embriones *in vitro*, sigue siendo el uso de ovocitos con competencia óptima. Dependerá de la calidad de ovocito y su posterior capacidad para completar la maduración citoplásmica y nuclear, y producir un embrión viable y saludable. La competencia de desarrollo de los ovocitos es adquirida

progresivamente, alcanzando los folículos al tamaño máximo (Gandolfi *et al.*, 2005).

Los ovocitos son clasificados según el número de capas de células del cumulus y el aspecto del citoplasma: categoría 1 - COC con  $\geq 5$  capas de células del cumulus compactos y citoplasma homogéneo; categoría 2 - COC con 2 a 4 capas compactas de células del cúmulo, y citoplasma homogéneo; categoría 3 -  $\leq 1$  capa de células de la granulosa o parcialmente desnudado, y citoplasma vacuolado; y categoría 4 - ovocitos desnudados y citoplasma granular (De Loos *et al.*, 1989).

### 2.3. Bases conceptuales

**Ovario:** El ovario (lat. ovum, huevo; gr. ooforon) es la gónada u órgano reproductor femenino productor y secretor de hormonas sexuales y óvulos (Wikipedia, 2017).

El ovario de la alpaca tiene las dimensiones siguientes: largo,  $1.6 \pm 0.3$  cm y ancho,  $1.1 \pm 0.2$  cm. Cuando los folículos alcanzan un diámetro mayor a 4 mm, así como el cuerpo lúteo, éstos se proyectan sobre la superficie del ovario en forma muy prominente y son fácilmente identificables. Folículos entre 5 y 12 mm son considerados normales, mientras que estructuras mayores se consideran patológicas (Sumar, 2007).

**Folículo:** Es el que se forma en los ovarios de los mamíferos y aísla unos óvulos de otros (RAE, 2016). El folículo ovárico, es una acumulación de células haploides que se encuentran en el interior del ovario (De Loos *et al.*, 1989).

**Ovocito:** Óvulo en diferenciación (RAE, 2016). Un oocito u ovocito, es un gametocito hembra o célula germinal que participa en la reproducción. En otras palabras, es un precursor inmaduro del óvulo, o célula huevo. El ovocito se produce en el ovario del embrión durante la gametogénesis femenina (Huanca *et al.*, 2007a).

**Colección:** Acumulación de una sustancia orgánica (RAE, 2016). Colección es un término que procede del vocablo latino *collectio* y que hace mención al conjunto de cosas de una misma clase que se reúnen por su valor o por el interés que despiertan (Definición, 2017).

**Calidad:** Propiedad o conjunto de propiedades inherentes a algo, que permiten juzgar su valor (RAE, 2016). El primer paso que se hace necesario llevar a cabo para poder determinar la esencia del concepto calidad es establecer su origen etimológico, se encuentra en la palabra latina *qualitas*, la cual a su vez procede del griego y más en concreto del término *ποιότης* (Definición, 2017).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización

El estudio de la evaluación ovocitaria, se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, ubicado en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho, Perú. Localizado a 13° 08' 40" Latitud Sur y 74° 13' 25" Longitud Oeste, y está a 2880 m de altitud. Los ovarios de las alpacas, fueron recuperados del Camal Municipal de Huancavelica, ubicado en el distrito, provincia y departamento de Huancavelica, localizado a 11° 59' 10" Latitud Sur y 74° 34' 40" Longitud Oeste, se encuentra a 3678 m de altitud (Google Earth, 2017). Se realizó dentro del mes de julio de 2017.

#### 3.2. Diseño experimental

Se usó dos medios de transporte de ovarios: fosfato buffer salino (PBS), NaCl al 0.9%; dos medios de colección de ovocitos: medio de cultivo tisular (TCM - 199), PBS; dos métodos de recuperación de ovocitos: aspiración folicular y slicing. Distribuidos en ocho grupos en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2A x 2B x 2C (A = medios de transporte; B = medios de colección; C = métodos de recuperación).

### **3.3. Colección y transporte de ovarios**

#### **a) Colección de ovarios**

Los ovarios fueron colectados ( $n = 160$ ) de alpacas adultas postmortem beneficiadas en el Camal Municipal de Huancavelica, dentro de los 15 min de beneficio. El ovario se separó, mediante un corte, de la bolsa ovárica, fueron colocados en bolsas de polietileno en medios de transporte.

#### **b) Transporte de ovarios**

Los ovarios fueron transportados en dos medios de transporte PBS o NaCl, cada uno en 500 mL de medio, dentro de la caja de poliestireno, donde se mantuvieron a una temperatura de 30 a 36 °C (la temperatura se conservó colocando agua atemperada en bolsas de polietileno, monitoreadas con termómetro digital durante el transporte), el tiempo de transporte fue aproximadamente 6 h hasta el arribo al laboratorio para su posterior evaluación.

### **3.4. Recuperación de ovocitos**

La recuperación de ovocitos de los ovarios de las alpacas beneficiadas se realizó por dos métodos:

#### **a) Por método de aspiración**

Los ovarios fueron lavados dos veces con cloruro de sodio al 0.9%, para eliminar restos de sangre, en vasos precipitados de 500 mL. Se mantuvo los materiales biológicos en todo el proceso a temperatura de 36 °C sobre una platina atemperada. Se sujetó los ovarios con papel toalla para puncionar y aspirar

ovocitos de folículos visibles, entre a 2 a 6 mm de diámetro, de la superficie ovárica con ayuda de una aguja de 18 G x 1.5'' adosado a una jeringa de 10 mL, donde contenía 1 mL de PBS o TCM. Se aspiró de ambos grupos de ovarios con medios de transporte NaCl o PBS. El contenido folicular aspirado se colocó a tubos cónicos de 45 mL, para sedimentar por 15 min, luego se aspiró el sedimento con pipeta Pasteur hacia las placas Petri de 10 x 30 mm de diámetro para su evaluación posterior.

#### **b) Por método de slicing**

Luego de ser lavado los ovarios y mantenidos a temperatura constante, como se describió anteriormente. Se colocó el ovario en placa Petri de vidrio (14 x 93 mm) que contenía 2mL de PBS o TCM (como medios de colección), se sujetó con pinza el ovario y se realizó los cortes longitudinales y transversales a distancias de 2 mm aproximadamente por los lados de la pared ovárica donde se ubica la corteza ovárica, luego se embebió con el medio de colección y se realizó el lavado con el mismo medio. El contenido de la placa Petri se transfirió a otra placa de 10 x 30 mm dejando reposar por 15 min hasta su evaluación posterior.

### **3.5. Evaluación de ovocitos**

Previa a la evaluación los ovocitos, para separar de los detritos, fueron transferidos de una placa a otra hasta tres veces, estas placas contenían los mismos medios de colección. La calidad de los ovocitos se evaluó de acuerdo a la clasificación morfológica descrito por De Loos *et al.* (1989); los ovocitos fueron categorizados según el número de capas de células del cumulus y el aspecto del citoplasma, categoría 1: COC con  $\geq 5$  capas de células del cumulus compactos y



citoplasma homogéneo; categoría 2: COC con 2 a 4 capas compactas de células del cúmulo, y citoplasma homogéneo; categoría 3:  $\leq 1$  capa de células de la granulosa o parcialmente desnudado, y citoplasma vacuolado; y categoría 4: ovocitos desnudados y citoplasma granular.

### 3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el sistema SAS (*Statistical Analysis System*) versión 9.4. Las variables de respuesta al principio se comprobaron la normalidad y homogeneidad de varianzas mediante la prueba Shapiro-Wilk a través del procedimiento UNIVARIATE, luego se utilizó el procedimiento GLM (modelo lineal general) para realizar el análisis de varianza bajo el diseño completamente al azar, con arreglo factorial  $2A \times 2B \times 2C$ , donde A es el factor medio de transporte de ovarios con dos niveles: PBS y NaCl; B es el factor método de recuperación de ovocitos con dos niveles: aspiración y slicing; C es el factor medio de colección de ovocitos con dos niveles: PBS y TCM. Se consideró que hay diferencia estadística entre grupos de tratamiento, cuando resulte  $P \leq 0.05$ . El modelo estadístico fue:

$$Y = \mu + A + B + C + AB + AC + BC + ABC + e$$

Dónde:

- Y = Es la cantidad o calidad de ovocitos recuperados.
- $\mu$  = Es la constante, media de las observaciones.
- A = Es el efecto del factor medio de transporte con dos niveles: PBS y NaCl.
- B = Es el efecto del factor medio de colección con dos niveles: PBS y TCM.
- C = Es el efecto del factor método de recuperación con dos niveles: aspiración y slicing.

- AB = Es el efecto de la interacción de los factores A y B
- AC = Es el efecto de la interacción de los factores A y C.
- BC = Es el efecto de la interacción de los factores B y C.
- ABC = Es el efecto de las interacciones de los factores A por B y por C.
- e = Es el efecto del error experimental, que está distribuido como  $\varepsilon$  DNI ( $0, \sigma^2e$ ).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Ovocitos recuperados

Los resultados se muestran en el Cuadro 1. Se recuperó mayor ( $P < 0.05$ ) cantidad de ovocitos con el método slicing. El medio de transporte de ovarios PBS y NaCl, medio de colección PBS y TCM de ovocitos no afectaron ( $P > 0.05$ ) la cantidad de ovocitos recuperados. Entre medio de transporte, medio de colección y método de recuperación no hubo ( $P > 0.05$ ) interacción para la cantidad de ovocitos recuperados.

Los resultados encontrados en esta investigación, promedio  $\pm$  desviación estándar, para ovocitos recuperados por ovario por el método de aspiración fue  $5.0 \pm 0.4$ ; por slicing  $10.5 \pm 0.5$ ; son similares a los reportes de Vasquez *et al.* (2015) quienes señalan en promedio de ovocitos por ovario, colectados por los métodos de aspiración  $4.50 \pm 2.06$ ; por corte folicular  $10.0 \pm 7.01$ . Otros estudios muestran resultados con valores altos y bajos, Benavides *et al.* (2015) reportan por método de aspiración  $7.42 \pm 4.67$ ; por disección  $14.45 \pm 4.38$  de ovocitos colectados por ovario. Gomez *et al.* (2013) encontraron por aspiración folicular  $3.21 \pm 1.19$ ; por slicing folicular  $3.77 \pm 1.25$ ; por disección-ruptura folicular  $4.08 \pm 1.15$  ovocitos colectados por ovario. Mamani (2015) reportó un número promedio de 2.5 COC viables recuperados de cada ovario; Ruiz *et al.* (2007) 2.2 COC por ovario de

alpaca. Los resultados de este estudio se encuentran dentro de los valores reportados en otras investigaciones.

Hay varios factores que afectarían la cantidad de los ovocitos colectados. Uno de los más importantes sería el estado de la onda folicular, que estaría relacionado con la nutrición. La época en que se colectó los ovocitos, pertenece a época seca, donde la disponibilidad de alimentos para las alpacas es limitada. Dupont *et al.* (2014) señalan que en los rumiantes como en otros mamíferos, las alteraciones de la energía y el metabolismo de proteínas relacionados con las variaciones en la dieta pueden afectar las funciones reproductivas a diferentes niveles en el eje gonadotrópico. Los factores que influyen son los nutrientes (ácidos grasos, glucosa y aminoácidos) y las señales hormonales de diversos tejidos periféricos (insulina (páncreas), IGF-I (hígado), hormona del crecimiento (pituitaria), hormonas tiroideas (T3 / 4) y adipocinas (adiposo tejido) tal como leptina, adiponectina y resistina).

Dentro del folículo, la glucosa puede ser metabolizada por cuatro diferentes vías: (i) por glicólisis para producir ATP y piruvato o lactato; (ii) por la vía de pentosa fosfato para proporcionar precursores para la síntesis de nucleótidos de purina y NADPH para diversas vías biosintéticas incluyendo defensa antioxidante; (iii) por la hexosamina biosintética para proporcionar sustratos para la glicosilación de proteínas y la síntesis del ácido hialurónico requerida para el cúmulo expansión; y (iv) por la vía del poliol que produce sorbitol y la fructosa cuyos papeles en la función folicular permanecen en gran parte desconocido (Collado-Fernandez *et al.*, 2013).

**Cuadro 1.** Ovocitos recuperados (media  $\pm$  desviación estándar) del ovario de alpacas Huacaya postmortem, según medio de transporte, medio de colección y método de recuperación.

| Medio de transporte | Método de recuperación | Medio de colección | Ovarios utilizados (n) | Total de ovocitos colectados | Ovocitos por ovario         |
|---------------------|------------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| PBS                 | Aspiración             | PBS                | 20                     | 99                           | 5.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>  |
|                     |                        | TCM                | 20                     | 105                          | 5.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>  |
|                     | Slicing                | PBS                | 20                     | 213                          | 10.7 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup> |
|                     |                        | TCM                | 20                     | 217                          | 10.9 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup> |
| NaCl                | Aspiración             | PBS                | 20                     | 98                           | 4.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>  |
|                     |                        | TCM                | 20                     | 96                           | 4.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>  |
|                     | Slicing                | PBS                | 20                     | 203                          | 10.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> |
|                     |                        | TCM                | 20                     | 209                          | 10.5 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup> |

Letras de superíndice distintas dentro de la misma columna expresan diferencias ( $P < 0.05$ )

#### 4.2. Cantidad de ovocitos colectados según calidad

Los resultados se muestran en el Cuadro 2. Se colectó mayor ( $P < 0.05$ ) cantidad de ovocitos de calidad 1, 2, 3 y 4 con el método de slicing que aspiración folicular. Se colectaron mayor cantidad de ovocitos de calidad 1 y 2: 270.0 (67.8%) con el método de aspiración; 553.0 (65.7%) con el método slicing respecto a las otras calidades 3 y 4; estos ovocitos serían aptos para la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos. El medio de transporte de ovarios PBS y NaCl, medio de colección PBS y TCM de ovocitos no afectaron ( $P > 0.05$ ) la calidad de ovocitos colectados. No hubo ( $P > 0.05$ ) interacción entre medio de transporte, medio de colección y método de recuperación para la cantidad de ovocitos colectados según calidad.

**Cuadro 2.** Efecto del método de recuperación sobre la cantidad de ovocitos del ovario según calidad, en Alpacas Huacaya.

| Calidad de ovocito | Método de recuperación de ovocitos |      |                          |      |
|--------------------|------------------------------------|------|--------------------------|------|
|                    | Aspiración (n = 80 ovarios)        |      | Slicing (n = 80 ovarios) |      |
|                    | Cantidad                           | %    | Cantidad                 | %    |
| 1                  | 109 <sup>a</sup>                   | 27.4 | 226 <sup>b</sup>         | 26.8 |
| 2                  | 161 <sup>a</sup>                   | 40.5 | 327 <sup>b</sup>         | 38.8 |
| 3                  | 51 <sup>a</sup>                    | 12.8 | 106 <sup>b</sup>         | 12.6 |
| 4                  | 77 <sup>a</sup>                    | 19.3 | 183 <sup>b</sup>         | 21.7 |
| Total              | 398                                |      | 842                      |      |

Letras de superíndice distintas dentro de la misma fila expresan diferencias ( $P < 0.05$ )

Estos resultados son similares a los reportados por Gomez *et al.* (2013) que recuperaron 63.2, 67.9 y 72.4% de complejos ovocitos cumulus de calidad I y II, con métodos de aspiración folicular, slicing de ovarios y disección-ruptura folicular. En otro estudio Benavides *et al.* (2012) colectaron ovocitos por el método de aspiración: 17.5, 63.41 y 19.07% (calidad A, B, C, seleccionados de 722 ovocitos); por el método de disección: 18.46, 56.34 y 25.17% (calidad A, B, C, seleccionados de 1134 ovocitos). Los ovocitos colectados de calidad 2, son que se recuperaron en mayor cantidad; sin embargo, Vasquez *et al.* (2015) reportaron 40.0; 31.1; 8.9; 20.0% de ovocitos colectados por el método de aspiración; 30.0, 31.0, 23.5; 15.5% por el método de corte correspondientes a la calidad I, II, III, IV respectivamente.

Trasorras *et al.* (2013) señala que no se conoce si estos folículos recuperados, considerados pre-ovulatorios, están en fase de crecimiento o regresión, lo que

afectaría la calidad de los ovocitos. La mayor cantidad de ovocitos colectados por método de corte, podría ocurrir porque se estaría recuperando ovocitos de la corteza ovárica, incluyendo los ovocitos inmaduros cuyo antro aún no es visible externamente, mientras por aspiración se realiza de folículos entre 2 a 6 mm de diámetro visibles a la aspiración. La relativa mayor cantidad de ovocitos según calidad correspondiente a la calidad 2, podría ser entre otros factores por el desarrollo folicular y ovocitario que estaría relacionado con los factores intraováricos, relacionados con la bioquímica nutricional y fisiológica, que dependería fundamentalmente de la disponibilidad de alimentos. El periodo donde las alpacas estuvieron alimentándose corresponde a la época seca, donde los alimentos son precarios en su calidad nutritiva.

La nutrición influye en el desarrollo folicular ovárico en rumiantes, posiblemente por cambios en las hormonas metabólicas y también por efectos directos de determinados nutrientes en el ovario. Las hormonas metabólicas que parecen tener importantes funciones establecidas en estos procesos se incluyen a la insulina, la leptina y factor de crecimiento tipo insulinoide, hormona de crecimiento, hormonas tiroideas (T3/4), ghrelina, apelina, adipocinas, adiponectina y resistina. Hay evidencia de que la cadena larga dietética n - 3 de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) pueden actuar como reguladores específicos reproductivos. Los mecanismos moleculares de la acción de estos PUFAs aún son desconocidos en los rumiantes. Sin embargo, los PUFAs podrían mediar su acción a través de la activación de receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR $\gamma$ ) y / o la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) modulando la concentración plasmática de algunas adipocinas tales como adiponectina o

resistina. La AMPK parece ser una señal clave que regula la cantidad de energía requerida en el crecimiento de folículos, ovocitos y embriones (Dupont *et al.*, 2014).



## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### a) CONCLUSIONES

Se obtuvo mayor cantidad de ovocitos recuperados mediante el método de slicing que por método de aspiración; el medio de transporte de ovarios PBS o NaCl, medio de colección PBS o TCM de ovocitos no afectaron dicha cantidad.

Se recuperó mayor cantidad de ovocitos según calidad, 1 a 4, utilizando el método de slicing en contraste con el método de aspiración. La cantidad de ovocitos según calidad no fue afectada por medios de transporte de ovarios PBS o NaCl, tampoco por medios de colección PBS o TCM.

Se obtuvieron mayor porcentaje de ovocitos de categoría 1 y 2 con ambos métodos de recuperación de ovocitos, slicing y aspiración folicular, los que servirían para maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos.

Los medios TCM o PBS tienen efectos similares sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados; sin embargo, podría tener efectos importantes para los siguientes procesos de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de alpacas.

## b) RECOMENDACIONES

Realizar estudios con diferentes medios de transporte de ovarios y de colección, para observar los efectos sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de alpacas.

Orientar investigaciones basadas en medios de colección de ovocitos, para mantener la mejor calidad ovocitaria para procesos de maduración, fertilización y cultivo de embriones *in vitro*.

Continuar estudios sobre los factores que mejorarían el mantenimiento de ovocitos competentes, hasta lograr crías de alpacas producidas a partir de fertilización *in vitro*.



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, C. J. (2009). *Efecto de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo y la calidad de embriones de bovino producidos in vitro en grupos reducidos*. (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Ali, A., Benkhalifa, M., Miron P. (2006). In-vitro maturation of oocytes: biological aspects. *Reproductive biomedicine online*, 13 (3), 437-446.
- Alvarado, A. (2006). *Evaluación de tres técnicas de obtención de ovocitos en animales vivos, como primera etapa del proceso de producción de embriones in vitro en alpacas*. Recuperado de: <http://proyectos.concytec.gob.pe/proyectos/subidos/sintesis/PROCYt04-2006.pdf>
- Benavides, L., Huanca, W., & Quintanilla, L. (2015). Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(4), 596-603.
- Bonacic, S. (1991). Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. *Avances en Ciencias Veterinaria*, 6 (2). Recuperado de <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4642/4529>
- Collado-Fernandez, E., Picton, H. M., & Dumollard, R. (2013). Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *The*

*International Journal of Developmental Biology*, 56(10-11-12), 799-808.

Conde, P. A., Herrera, C., Trasorras, V. L., Giuliano, S. M., Director, A., Miragaya, M. H., & Agüero, A. (2008). In vitro production of llama (Lama glama) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal Reproduction Science*, 109(1), 298-308.

Definición (2017). Recuperado de <https://definicion.de/>

De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P. V., & Kruij, T. A. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 24(2), 197-204.

De Los Rios, E. (2006). *El futuro de los productos andinos en la region alta y los valles centrales de los Andes/textiles Camélidos*. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial. Recuperado de <http://infoalpacas.com.pe/wp-content/uploads/2016/09/Diagnostico-Nacional-Estado-de-Situaci%C3%B3n-del-Sector-Textil-Cam%C3%A9lidos-en-el-Per%C3%BA-2.pdf>.

De Souza-Fabjan, J. M. G., Panneau, B., Duffard, N., Locatelli, Y., De Figueiredo, J. R., de Figueirêdo Freitas, V. J., & Mermillod, P. (2014). In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*, 81(9), 1149-1162.

Del Campo, M. (1983). *Transferencia de embriones en bovinos: métodos y técnicas*. Monografías de Medicina Veterinaria, 6 (2). Recuperado de <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/4857/4743>

Del Campo, M. R., Del Campo, C. H., Donoso, M. X., Berland, M., & Mapletoft, R. J. (1994). In vitro fertilization and development of llama (Lama glama) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 41(6), 1219-1229.

Del Campo, M. R., Donoso, M. X., Del Campo, C. H., Rojo, R., Barros, C.,

- Parrish, J. J., & Mapletoft, R. J. (1992). In vitro maturation of llama (*Lama glama*) oocytes. *In Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction* (Vol. 1, pp. 324-326).
- Dupont, J., Scaramuzzi, R. J., & Reverchon, M. (2014). The effect of nutrition and metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants. *Animal*, 8(7), 1031-1044.
- Fowler, M., (1989). Reproduction. In: *Medicine and Surgery of South American Camelids*. Iowa State University Press/Ames. 41(3), 276-312.
- Franklin, W. (1982). Biology, ecology and relationship to man of the South American camelids. In: *Mammalian Biology in South America*. Mares M.A. and Genoways H.H. University of Pittsburgh, (Eds). Pymatuning Laboratory of Ecology Special 6: 457-489.
- Fresenius-Kabi. (2016). Cloruro de sodio. Recuperado de [http://www.fresenius-kabi.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=334:cloruro-de-sodio-09&catid=48:envase-apiroflex-bfs&Itemid=191](http://www.fresenius-kabi.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=334:cloruro-de-sodio-09&catid=48:envase-apiroflex-bfs&Itemid=191)
- Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Cillo, F., & Antonini, S. (2005). Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 24(1), 413.
- Gigli L., A. Russo., A. Agüero. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *In Vet*, 8, 183-204.
- Gómez, O. E., Choque, D., Henao, F., Escobedo, M, H & Valverde, N. (2013). Comparación de tres métodos de recuperación de complejos ovocito-cúmulus (COCS) de alpaca recuperados de ovarios postmortem en un camal. *Spermova*, 3(1): 103-104.
- Huanca, T. (2008). Efecto de la administración de gonadotropinas exógenas (FSH y eCG en la respuesta ovárica y la producción de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*). Universidad Santiago de Compostela, España.

- Huanca, W. (2012). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos como alternativas para la mejora genética. In XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Asociación Venezolana de Producción Animal.
- Huanca, W. L. (2005). Aplicación de biotecnologías reproductivas en especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos. *Agrociencia*, 9(1-2), 505-509.
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., & Adams, G. (2007a). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 15, 195-201.
- Huanca, W., Palomino, J., Cervantes, M., Cordero, A. & Huanca, T. (2007b). Efecto de temperatura de transporte (35° y 4°C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de camal. *XX Reunión ALPA y XXX Reunión APPA - Cusco, Perú*.
- INEI. Instituto Nacional de Estadística e Informática (2012). IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Recuperado de <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados>.
- Laboratorio de Genómica Viral y Humana. (2016). Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). Recuperado de [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_Buffer\\_PBS.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf).
- Leisinger, C. A., Coffman, E. A., da Silva, M. C., Forshey, B. S., & Pinto, C. R. F. (2014). Factors affecting in vitro maturation of alpaca (*Lama paco*) oocytes. *Animal Reproduction Science*, 150(1), 70-75.
- Martínez, E. (1992). Maduración de los ovocitos. *Porci*, (9), 45-56.
- Mamani, G.D. (2015). *Métodos de selección espermática y tasa de fecundación in vitro en ovocitos de alpacas (vicugna pacos)*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú.

- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2), 299-310.
- Motta, P.A., Cuellar, N.R., Sánchez, C.M.G., & Rojas, E.C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *vet.zootec.* 5(2): 88-99. Recuperado de [https://www.yumpu.com/es/document/view/18825004/dinamica-folicular-en-la-vida-reproductiva-de-la-hembra-bovina-](https://www.yumpu.com/es/document/view/18825004/dinamica-folicular-en-la-vida-reproductiva-de-la-hembra-bovina)
- Nowshari, M. A. (2005). The effect of harvesting technique on efficiency of oocyte collection and different maturation media on the nuclear maturation of oocytes in camels (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 63(9), 2471-2481.
- Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1), 152-159.
- Quintana, M. D., Campos, P. E. C., Herrera, P., Gallego, C., & Padrón, E. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal*, 34(1), 53-56.
- RAE. Real Academia Española. (2016). Recuperado de: <http://www.rae.es/>.
- Restrepo, H. (2010). Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en bos indicus. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), 5577-5586.
- Reyes, O. J., Camacho, J. F., Troncoso J. R. (2016). Uso de cloruro de sodio en bases granulares. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 16(1). 63-71.
- Rodriguez, F. (2013). *Respuesta al estro y población folicular de cabras suplementadas con propionato de calcio en la estación reproductiva.* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Bolivia.

- Ruiz, B., Landeo, J., Artica, F., Ratto, F., & Correa, S. (2011). Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(3), 206-212.
- Ruiz, J. (2009). *Vitrificación de ovocitos de alpaca (Vicugna pacos)*. (Tesis doctoral). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Ruiz, J. (2015). State-of-the-art production of embryos in vitro in South American camelids. *Spermova*, 5(2): 264-269.
- Ruiz, J. A. (2008). Avances en biotecnología reproductiva aplicada en la hembra de los camélidos sudamericanos. Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos. 1a ed. Universidad Nacional de Huancavelica, Perú, 49-82.
- Ruiz, J. A., Correa, J. E., Ayuque, G., Landeo, L., Yaranga, M., & Zacarías, A. (2007). Producción in vitro de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. *I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos*. Universidad Nacional de Huancavelica. Perú.
- Ruiz, J., Landeo, L., Artica, M., Ratto, M., & Correa, J. (2011). Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(3), 206-212.
- Sigma-Aldrich. (2016). Medium 199. Recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m2520?lang=en&region=PE>
- Sumar, J. (2007). Demographics and herd management practices in South America. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed., St. Louis, MO: Saunders/Elsevier, 845-51.
- Trasorras, V., Giuliano, S., & Miragaya, M. (2013). In vitro production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 187-193.





**Figura 1.** Recolección de ovarios en el Camal Municipal de Huancavelica.



**Figura 2.** Cajas de poliestireno rotuladas para los dos medios de transporte de ovarios.



**Figura 3.** Muestras de ovarios que arribaron al laboratorio.



**Figura 4.** Medios de colección (TCM o PBS) de ovocitos; mantenidos en baño María.



**Figura 5.** Recuperación de ovocitos mediante el método de aspiración folicular.



**Figura 6.** Método de recuperación de ovocitos por el método de slicing.



**Figura 7.** Frascos rotulados según medios de colección de ovocitos, medios de transporte y métodos de recuperación ovocitaria.



**Figura 8.** Aspiración del sedimento folicular según los tratamientos.



**Figura 9.** Evaluación estereomicroscópica de los ovocitos de alpaca.



**Figura 10.** Ovocitos recuperados para su posterior evaluación.



**Figura 11.** Ovocito de calidad 1, se observa mayor de tres capas de granulosa.

**Cuadro 3.** Base de datos (TRANS = Medio de transporte; RECUP = Método de recuperación; COLEC = medio de colección; REP = repetición; CAL = Calidad de ovocito; OVO = cantidad de ovocitos recuperados).

| TRANS | RECUP | COLEC | REP | CAL | OVO |
|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| PBS   | ASP   | PBS   | 1   | 1   | 17  |
| PBS   | ASP   | PBS   | 1   | 2   | 20  |
| PBS   | ASP   | PBS   | 1   | 3   | 6   |
| PBS   | ASP   | PBS   | 1   | 4   | 11  |
| PBS   | ASP   | PBS   | 2   | 1   | 12  |
| PBS   | ASP   | PBS   | 2   | 2   | 22  |
| PBS   | ASP   | PBS   | 2   | 3   | 4   |
| PBS   | ASP   | PBS   | 2   | 4   | 7   |
| PBS   | ASP   | TCM   | 1   | 1   | 14  |
| PBS   | ASP   | TCM   | 1   | 2   | 20  |
| PBS   | ASP   | TCM   | 1   | 3   | 10  |
| PBS   | ASP   | TCM   | 1   | 4   | 12  |
| PBS   | ASP   | TCM   | 2   | 1   | 12  |
| PBS   | ASP   | TCM   | 2   | 2   | 23  |
| PBS   | ASP   | TCM   | 2   | 3   | 5   |
| PBS   | ASP   | TCM   | 2   | 4   | 9   |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 1   | 1   | 27  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 1   | 2   | 44  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 1   | 3   | 15  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 1   | 4   | 25  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 2   | 1   | 26  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 2   | 2   | 42  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 2   | 3   | 11  |
| PBS   | SLIC  | PBS   | 2   | 4   | 23  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 1   | 1   | 26  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 1   | 2   | 43  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 1   | 3   | 13  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 1   | 4   | 23  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 2   | 1   | 30  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 2   | 2   | 44  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 2   | 3   | 13  |
| PBS   | SLIC  | TCM   | 2   | 4   | 25  |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 1   | 1   | 9   |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 1   | 2   | 14  |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 1   | 3   | 9   |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 1   | 4   | 13  |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 2   | 1   | 17  |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 2   | 2   | 20  |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 2   | 3   | 7   |
| NaCl  | ASP   | PBS   | 2   | 4   | 9   |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 1   | 1   | 13  |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 1   | 2   | 24  |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 1   | 3   | 5   |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 1   | 4   | 7   |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 2   | 1   | 15  |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 2   | 2   | 18  |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 2   | 3   | 5   |
| NaCl  | ASP   | TCM   | 2   | 4   | 9   |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 1   | 1   | 32  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 1   | 2   | 40  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 1   | 3   | 13  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 1   | 4   | 18  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 2   | 1   | 27  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 2   | 2   | 37  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 2   | 3   | 14  |
| NaCl  | SLIC  | PBS   | 2   | 4   | 22  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 1   | 1   | 30  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 1   | 2   | 40  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 1   | 3   | 16  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 1   | 4   | 24  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 2   | 1   | 28  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 2   | 2   | 37  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 2   | 3   | 11  |
| NaCl  | SLIC  | TCM   | 2   | 4   | 23  |