

4. RESULTADOS.

De las 7 glicosidasas analizadas en este estudio, no se detectó actividad α -D-galactosidasa y neuraminidasa en ninguna de las muestras de FO bovino (FOB) y porcino (FOP), por lo que a continuación describiremos los resultados obtenidos para las otras 5 glicosidasas (α -L-fucosidasa, β -D-glucosaminidasa, β -D-galactosidasa, α -D-manosidasa, β -D-galactosaminidasa) que sí presentaron actividad enzimática en el FO de ambas especies.

Los valores brutos de fluorescencia de las 5 glicosidasas con actividad en el fluido oviductal, tanto bovino como porcino, fueron mayores que los obtenidos para estas mismas enzimas en el plasma seminal humano, empleado como control positivo en este estudio.

4.1. Especie bovina.

4.1.1. Unidades de actividad enzimática en el FOB.

Como se puede observar en la Tabla 13, el fluido oviductal bovino (FOB) presentó actividad α -L-fucosidasa, β -N-acetil-glucosaminidasa, β -D-galactosidasa, α -D-manosidasa y β -N-acetil-galactosaminidasa sin diferencias significativas entre la fase folicular y luteal.

4.1.2. Actividad enzimática específica en el FOB.

Al transformar los datos a actividad enzimática específica (Tabla 14), observamos que la actividad α -D-manosidasa ($p= 0'033$; Figura 9) y β -N-acetil-galactosaminidasa ($P= 0'025$; Figura 10) fue significativamente mayor en el FOB de hembras en fase folicular que en fase luteal.

Tabla 13. Unidades de **actividad enzimática** en FOB en las distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	α -L-fucosidasa	β -N-acetil-glucosaminidasa	β -D-galactosidasa	α -D-manosidasa	β -N-acetil-galactosaminidasa
Púberes	Folicular	19'79 \pm 4'06 (N= 30)	51'37 \pm 2'54 (N= 28)	34'14 \pm 1'04 (N= 31)	50'68 \pm 1'83 (N= 32)	36'53 \pm 1'44 (N= 30)
	Luteal	24'68 \pm 1'90 (N= 72)	47'71 \pm 4'34 (N= 77)	38'86 \pm 6'95 (N= 76)	47'63 \pm 1'52 (N= 73)	34'06 \pm 1'00 (N= 72)
P		0'217	0'621	0'667	0'246	0'175

Tabla 14. Unidades de **actividad enzimática específica** en FOB en las distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	α -L-fucosidasa	β -N-acetil-glucosaminidasa	β -D-galactosidasa	α -D-manosidasa	β -N-acetil-galactosaminidasa
Púberes	Folicular	36'46 \pm 7'37 (N=30)	93'41 \pm 4'36 (N=28)	62'60 \pm 1'84 (N=31)	92'83 \pm 2'88 a (N=32)	66'55 \pm 2'40 a (N=30)
	Luteal	43'12 \pm 3'31 (N=72)	83'48 \pm 7'72 (N=77)	68'05 \pm 12'36 (N= 76)	83'17 \pm 2'67 b (N= 73)	59'48 \pm 1'73 b (N= 72)
P		0'343	0'451	0'783	0'033	0'025

Figura 9. Actividad enzimática específica de α -D-manosidasa en fluido oviductal bovino

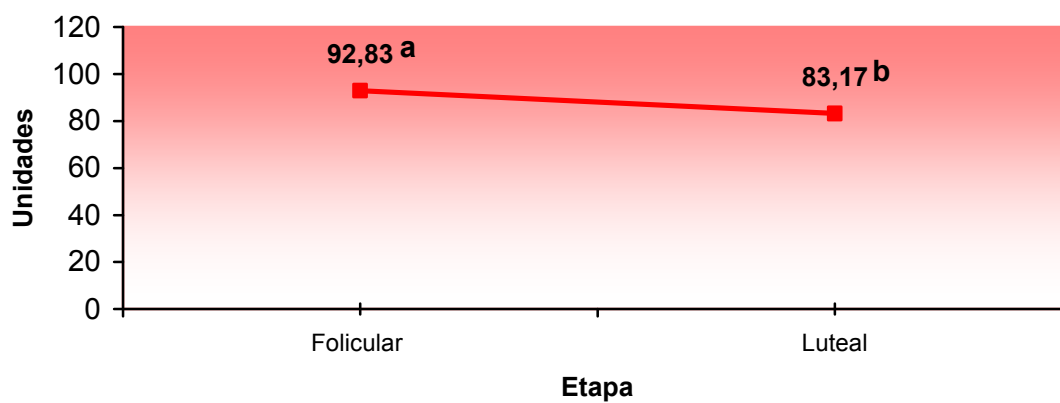
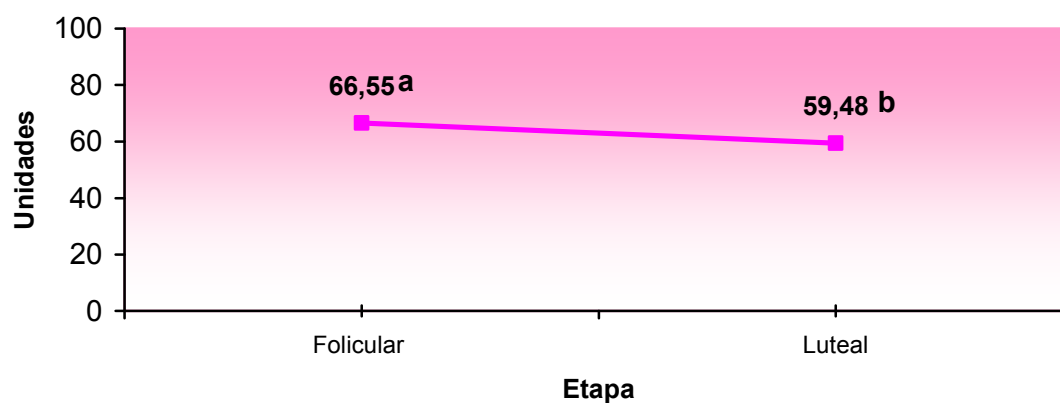


Figura 10. Actividad enzimática específica de β -N-acetilgalactosaminidasa en fluido oviductal bovino



4.1.3. Concentración de proteínas en el FOB.

La concentración de proteína en el FOB no varió significativamente entre las distintas fases del ciclo estral (Tabla 15).

Tabla 15. Concentración de proteína en el FOB de animales en las distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	Proteína (microgramos/microlitro)
Púberes	Folicular	54'28 ± 3'71 (N= 34)
	Luteal	55'89 ± 2'92 (N= 78)
P		0'751

4.1.4. Volumen de FOB recogido en cada fase.

El volumen de FOB obtenido, después de la aspiración y la centrifugación, se estableció en relación al número de oviductos en cada fase del ciclo estral (Tabla 16). El número total de oviductos bovinos disecados fue 237 y no se observaron diferencias en el volumen de FOB recogido en cada fase, que estuvo en torno a los 36µl/oviducto.

Tabla 16. Volumen de FOB recogido de oviductos de animales adultos. N = número de oviductos en cada fase.

Grupo	Fase	Volumen (microlitros/oviducto)
Púberes	Folicular	35'86 ± 0'74 (N= 75)
	Luteal	37'15 ± 0'43 (N= 162)
P		0'115

Teniendo en cuenta el volumen de FOB (microlitros/oviducto) y la concentración de proteínas (microgramos/microlitro) se calculó la concentración de proteínas totales (microgramos/oviducto) para cada fase del ciclo. La concentración de proteínas totales fue similar en ambas fases siendo los valores medios de 1.946'48 ± 109'28 y 2.076'31 ± 128'11 respectivamente para la fase folicular y luteal.

4.1.5. Correlación entre las enzimas del FOB.

En la tabla 17 se muestran algunas correlaciones entre la actividad enzimática específica de distintas enzimas del FOB.

Tabla 17. Índices de correlación de la actividad enzimática específica entre distintas glicosidasas del FOB.

Enzimas	r ²	P
α-L-fucosidasa vs. β-N-acetil-galactosaminidasa	-0'22	0'05
α-D-manosidasa vs. β-N-acetil-galactosaminidasa	0'73	<0'01
β-D-galactosidasa vs. α-D-manosidasa	0'74	<0'01

4.2. Especie porcina.

4.2.1. Unidades de actividad enzimática en el FOP.

Los valores de unidades de actividad enzimática para cada glicosidasa en el fluido oviductal porcino (FOP) de animales púberes y prepúberes se reflejan en las Tablas 18 y 19.

En las cerdas púberes, se observaron diferencias significativas a lo largo del ciclo estral para todas las enzimas: α-L-fucosidasa (P=0'05; Figura 14), β-N-acetil-glucosaminidasa (P<0'01; Figura 11), β-D-galactosidasa (P<0'01; Figura 12), α-D-manosidasa (P<0'01; Figura 13) y β-N-acetil-galactosaminidasa (P<0'01; Figura 14). Por otra parte, en el grupo de las prepúberes se aprecia que las 5 enzimas manifiestan alta actividad en la única fase del ciclo estudiada, la folicular temprana.

Al comparar las actividades enzimáticas entre el FOP de fase folicular temprana de los animales púberes y prepúberes, sólo la enzima α-L-fucosidasa mostró una tendencia a presentar mayor actividad en el FO de cerdas prepúberes (Figura 15, P<0'06).

Tabla 18. Unidades de **actividad enzimática** en fluido oviductal porcino de animales púberes en distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	α -L-fucosidasa	β -N-acetil-glucosaminidasa	β -D-galactosidasa	α -D-manosidasa	β -N-acetil-galactosaminidasa
Púber	Folicular temprana	24'07 \pm 5'27 ab (N= 15)	28'42 \pm 4'55 ab (N= 16)	34'37 \pm 1'84 a (N= 16)	51'04 \pm 3'67 a (N= 16)	34'13 \pm 2'19 a (N= 16)
	Folicular tardía	28'44 \pm 2'80 a (N= 32)	36'29 \pm 2'14 a (N= 31)	23'20 \pm 1'67 b (N= 30)	34'91 \pm 1'82 b (N= 31)	20'91 \pm 1'42 b (N= 32)
	Luteal temprana	14'97 \pm 2'09 b (N= 26)	17'35 \pm 1'49 b (N= 26)	23'76 \pm 1'67 b (N= 26)	34'07 \pm 1'60 b (N= 26)	23'00 \pm 2'06 b (N= 24)
	Luteal tardía	25'19 \pm 5'57 ab (N= 22)	30'79 \pm 3'71 a (N= 21)	24'07 \pm 1'62 b (N= 22)	38'29 \pm 1'65 b (N= 24)	24'88 \pm 1'76 b (N= 22)
P		0'05	<0'01	<0'01	<0'01	<0'01

Tabla 19. Unidades de **actividad enzimática** en fluido oviductal porcino de animales prepúberes en distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	α -L-fucosidasa	β -N-acetil-glucosaminidasa	β -D-galactosidasa	α -D-manosidasa	β -N-acetil-galactosaminidasa
Prepúber	Folicular temprana	37'43 \pm 3'47 (N= 15)	30'87 \pm 5'37 (N= 16)	31'91 \pm 2'55 (N= 16)	47'93 \pm 3'39 (N= 16)	34'49 \pm 2'80 (N= 16)

Figura 11. Unidades de actividad enzimática de α -L-fucosidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

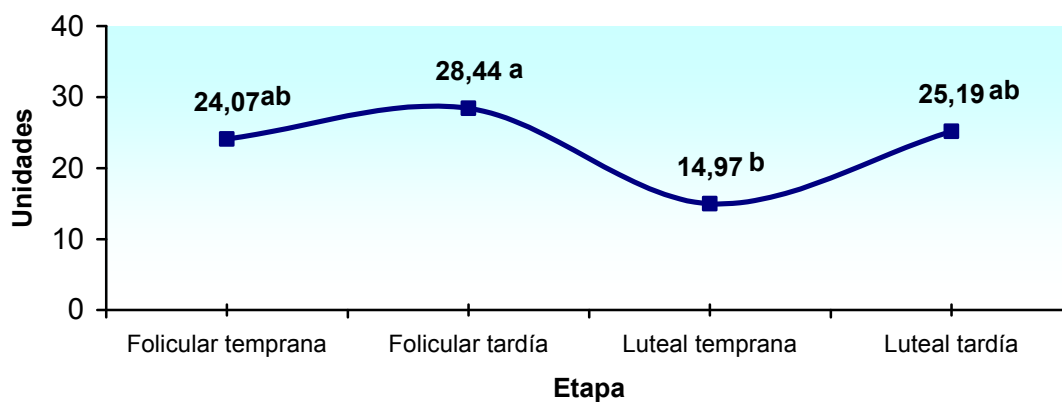


Figura 12. Unidades de actividad enzimática de β -N-acetilglucosaminidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

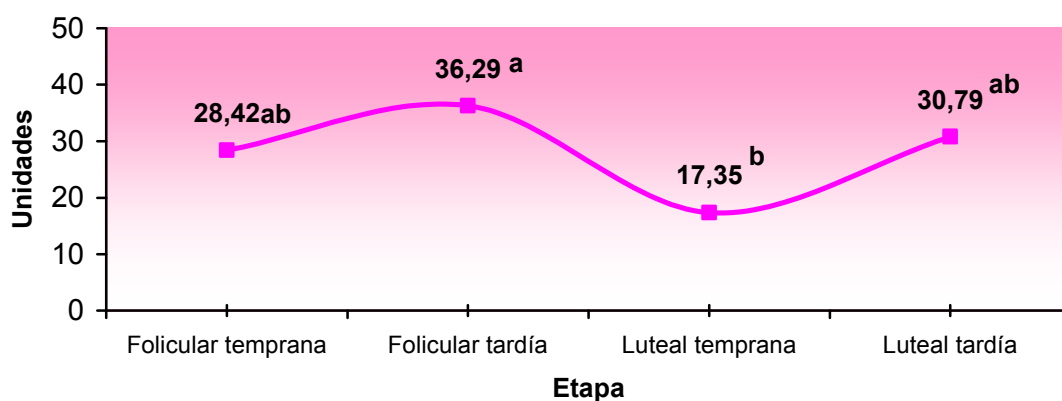


Figura 13. Unidades de actividad enzimática de β -D-galactosidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

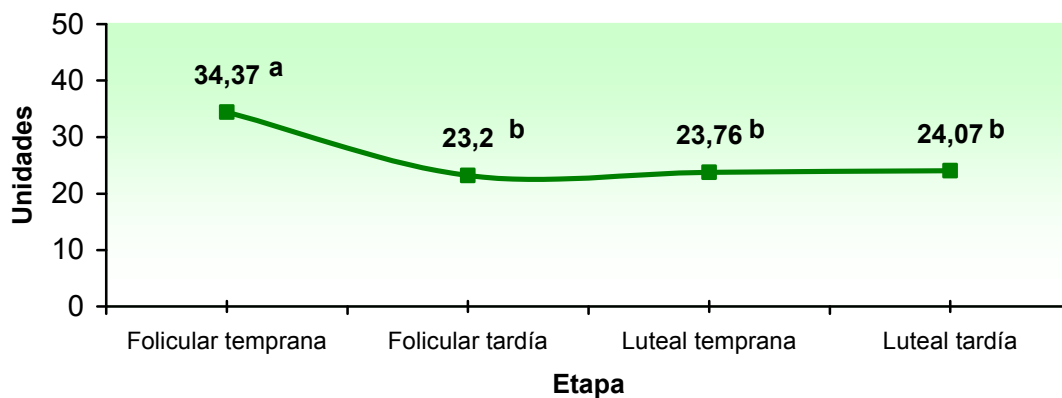


Figura 14. Unidades de actividad enzimática de α -D-manosidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

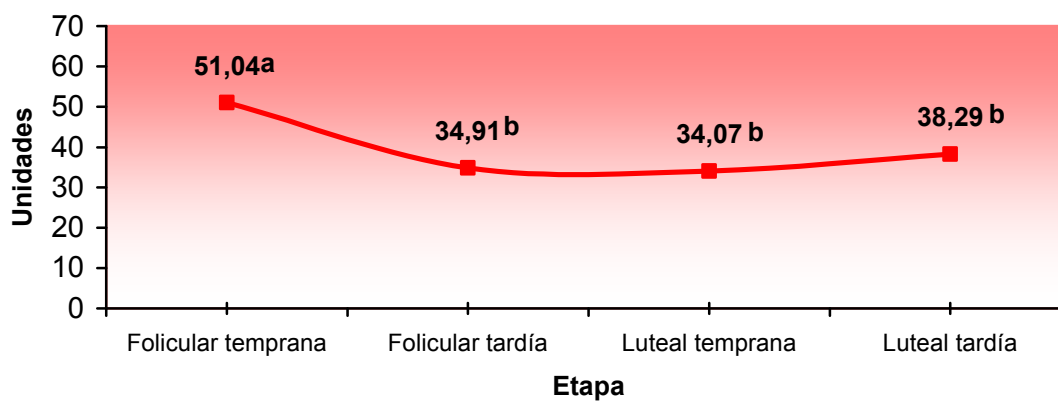


Figura 15. Unidades de actividad enzimática de β -N-acetilgalactosaminidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

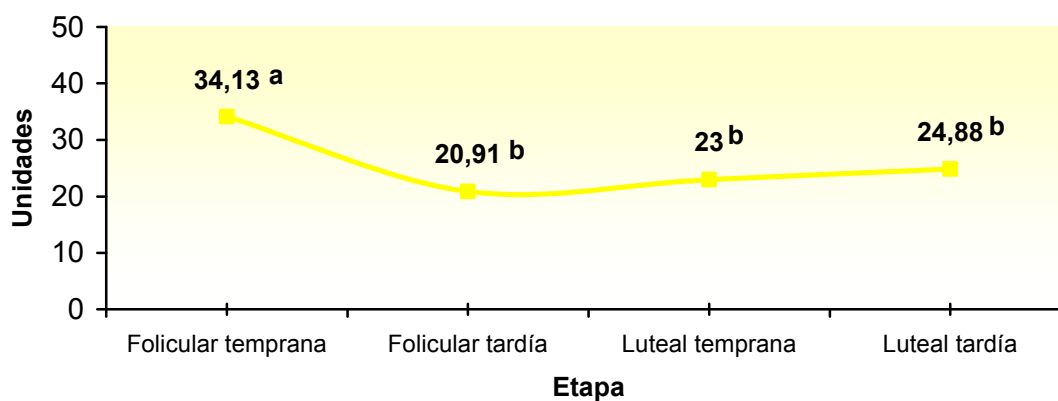
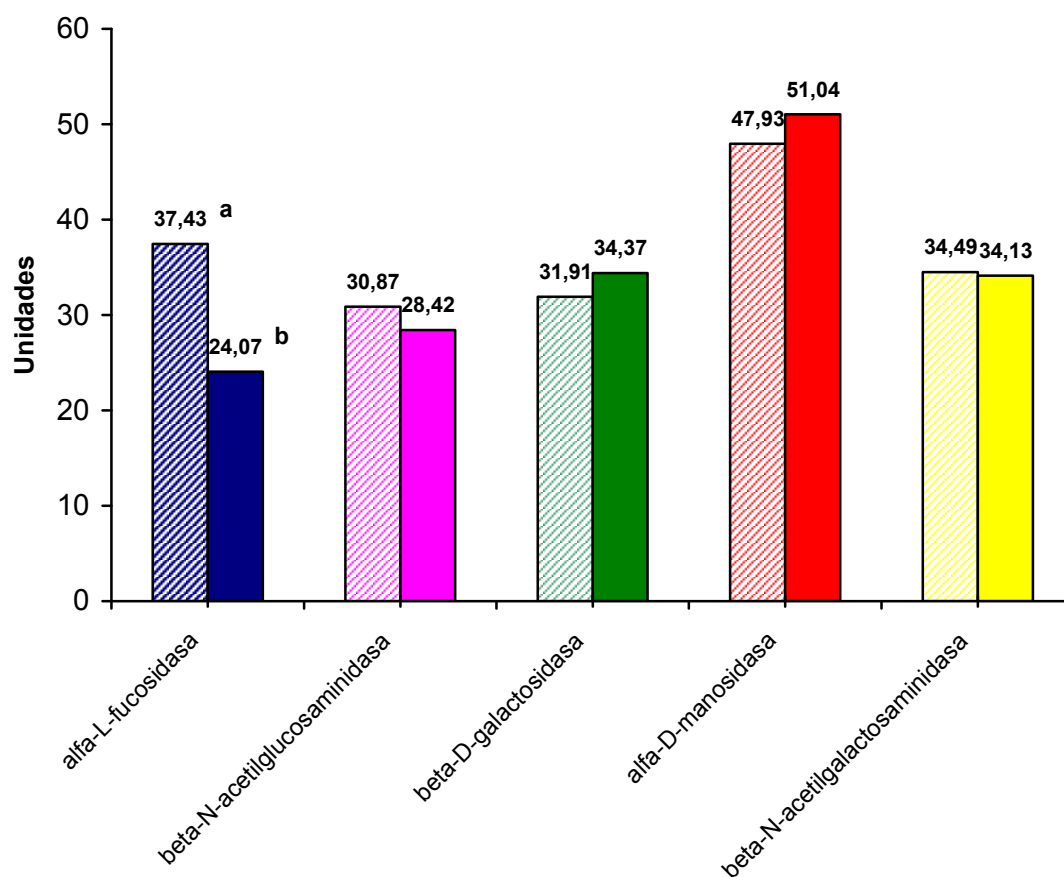


Figura 16. Actividad enzimática comparada en fluido oviductal de cerdas púberes y prepúberes en fase folicular temprana



4.2.2. Actividad enzimática específica en el FOP.

Al transformar los datos del fluido oviductal de las cerdas púberes en actividad enzimática específica, tal y como había ocurrido al calcular los valores en unidades de actividad enzimática, se observaron diferencias significativas para todas las enzimas a lo largo del ciclo estral ($P < 0,01$; Tablas 20 y 21, Figuras 17 a 21). Por otra parte, en la única etapa del ciclo estral estudiada en los oviductos procedentes de animales prepúberes, la actividad enzimática específica fue alta para todas las glicosidasas.

Tabla 20. Unidades de **actividad enzimática específica** en fluido oviductal porcino de animales púberes en distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	α -L-fucosidasa	β -N-acetil-glucosaminidasa	β -D-galactosidasa	α -D-manosidasa	β -N-acetil-galactosaminidasa
Púber	Folicular temprana	49'28 \pm 10'79 ab (N= 15)	58'18 \pm 9'31 a (N= 16)	70'35 \pm 3'77 a (N= 16)	104'49 \pm 7'51 a (N= 16)	69'88 \pm 4'49 a (N= 16)
	Folicular tardía	72'08 \pm 7'10 a (N= 32)	91'96 \pm 5'42 b (N= 31)	58'79 \pm 4'24 ab (N= 30)	88'48 \pm 4'62 ab (N= 31)	52'99 \pm 3'61 b (N= 32)
	Luteal temprana	33'08 \pm 4'62 b (N= 26)	38'35 \pm 3'29 a (N= 26)	52'51 \pm 3'69 bc (N= 26)	75'29 \pm 3'53 bc (N= 26)	50'83 \pm 4'55 b (N= 24)
	Luteal tardía	47'03 \pm 10'39 ab (N= 22)	57'49 \pm 6'93 a (N= 21)	44'94 \pm 3'03 c (N= 22)	71'49 \pm 3'08 c (N= 24)	46'45 \pm 3'29 b (N= 22)
P		<0'01	<0'01	<0'01	<0'01	<0'01

Tabla 21. Unidades de **actividad enzimática específica** en fluido oviductal porcino de animales prepúberes en distintas fases del ciclo estral. N= número de muestras.

Grupo	Fase	α -L-fucosidasa	β -N-acetil-glucosaminidasa	β -D-galactosidasa	α -D-manosidasa	β -N-acetil-galactosaminidasa
Prepúber	Folicular temprana	67'63 \pm 6'27 (N= 15)	55'79 \pm 9'71 (N= 16)	57'66 \pm 4'60 (N= 16)	86'60 \pm 6'13 (N= 16)	62'32 \pm 5'05 (N= 16)

Figura 17. Actividad enzimática específica de α -L-fucosidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

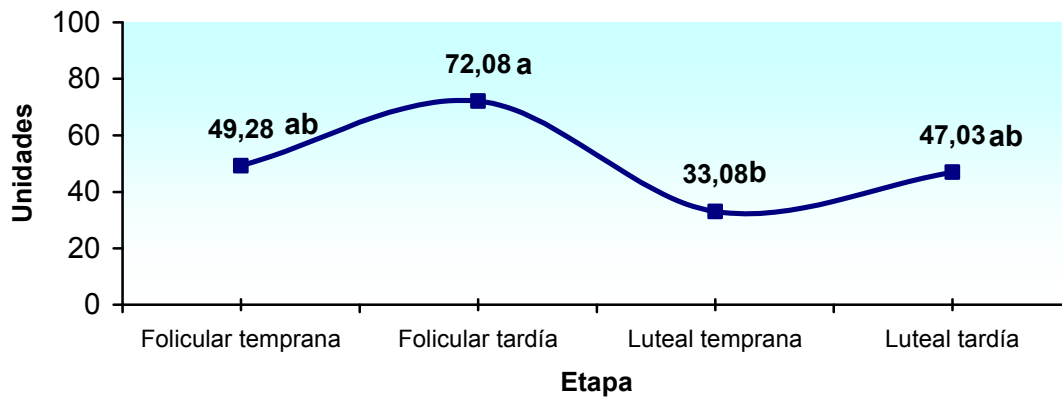


Figura 18. Actividad enzimática específica de β -N-acetilglucosaminidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

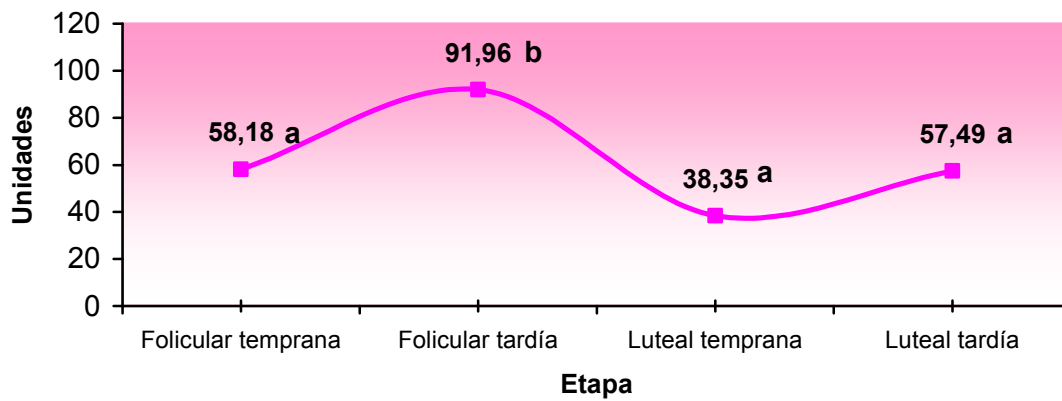


Figura 19. Actividad enzimática específica de β -D-galactosidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

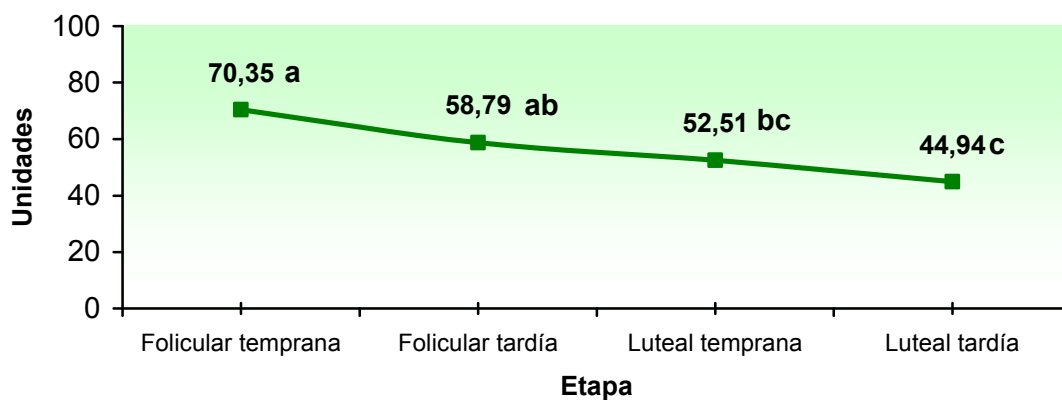


Figura 20. Actividad enzimática específica de α -D-manosidasa en fluido oviductal de cerdas púberes

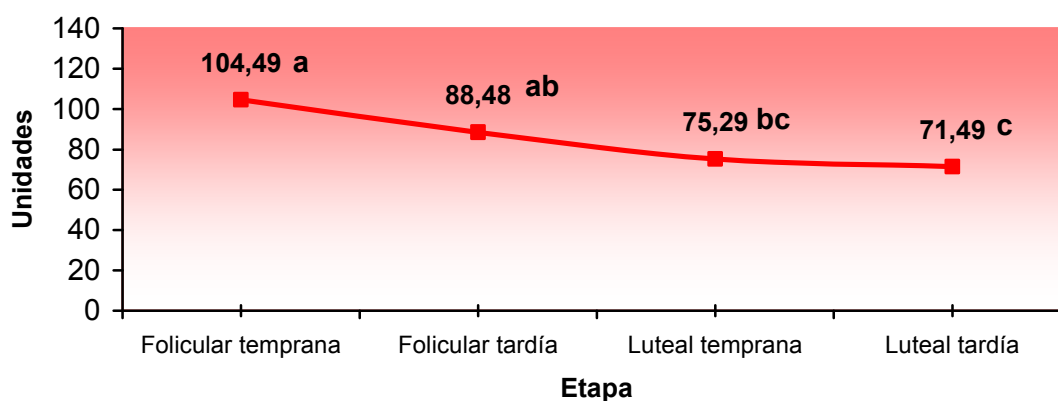
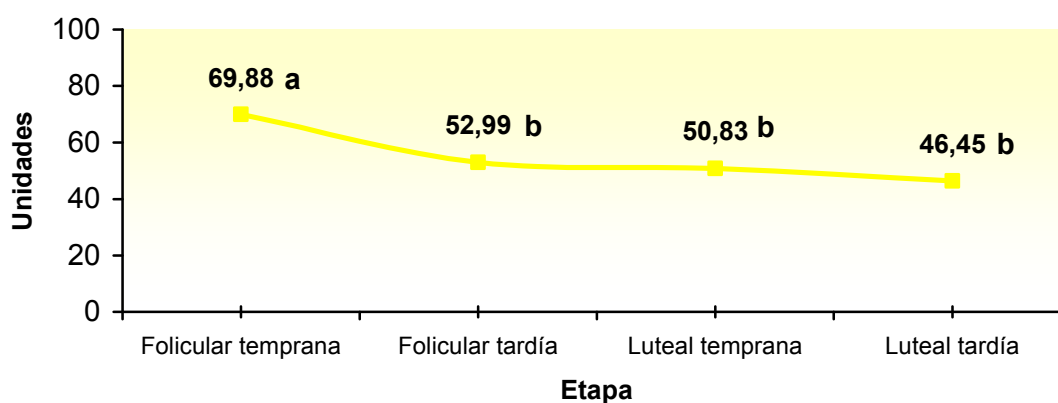
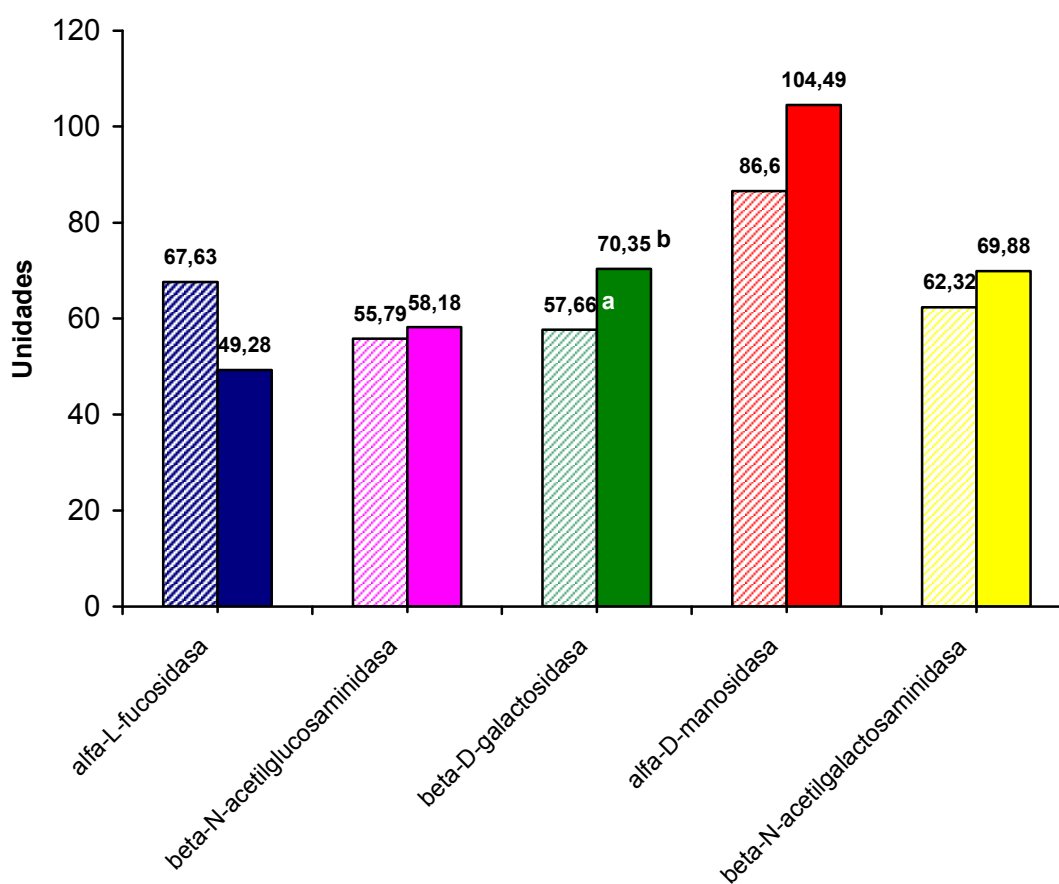


Figura 21. Actividad enzimática específica de β -N-acetilgalactosaminidasa en fluido oviductal de cerdas púberes



Al comparar las actividades enzimáticas específicas entre cerdas púberes y prepúberes en fase folicular temprana, se observaron diferencias significativas en la actividad específica de la β -D-galactosidasa, que fue mayor en el FO de cerdas púberes ($P=0,04$; Figura 21).

Figura 22. Actividad enzimática específica comparada en fluido oviductal de cerdas púberes y prepúberes en fase folicular temprana



4.2.3. Concentración de proteínas en el FOP.

El FOP de las cerdas púberes (Tabla 22) mostró mayor concentración de proteína en fase luteal tardía ($53'56\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sucedido por las secreciones producidas durante la fase folicular temprana ($48'85\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la fase luteal temprana ($45'25\mu\text{g}/\mu\text{l}$). La menor concentración de proteínas se obtuvo en la fase folicular tardía ($39'46\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Al calcular la concentración de proteínas totales (μg)/oviducto se obtuvieron valores de $1.354'77 \pm 172'78$, $2.118'57 \pm 200'65$, $1.680'49 \pm 122'79$ y $1.563'20 \pm 149'76$ respectivamente para la fase folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía. La mayor concentración de proteínas/oviducto se alcanzó en los momentos previos a la ovulación, en la fase folicular tardía ($P=0'02$).

Tabla 22. Concentración de proteína en el FOP de animales púberes. N= número de muestras.

Grupo	Fase	Proteína (microgramos/microlitro)
Púber	Folicular temprana	48'85 ± 3'55 (N= 25) ab
	Folicular tardía	39'46 ± 1'42 (N= 57) a
	Luteal temprana	45'25 ± 2'53 (N= 53) ab
	Luteal tardía	53'56 ± 3'95 (N= 33) b
P		<0'01

Por otra parte, la concentración de proteína del FO de las cerdas prepúberes en la única fase del ciclo estudiada fue de 55'34µg/µl (Tabla 23).

Tabla 23. Concentración de proteína en el FOB de animales prepúberes. N= número de muestras.

Grupo	Fase	Proteína (microgramos/microlitro)
Prepúber	Folicular temprana	55'34 ± 4'32 (N= 27)

4.2.4. Volumen de FOP recogido en cada fase.

Para la determinación del volumen de FOP, al igual que en el FOB, se tuvo en cuenta el número de oviductos por grupo y la fase del ciclo estral. El número total de oviductos disecados en esta especie fue de 269.

En el grupo de las hembras púberes (Tabla 24), el mayor volumen de FOP se secretó en la fase folicular tardía (50'62µl/oviducto), lo que se corresponde con el momento cercano a la ovulación. Una vez producida la ovulación (fase luteal temprana), la secreción de FO descendió significativamente ($P < 0'01$) y de forma progresiva conforme el ciclo estral avanzó.

Tabla 24. Volumen de FOP recogido de oviductos de animales púberes. N = número de oviductos en cada fase.

Grupo	Fase	Volumen (microlitros/oviducto)
Púber	Folicular temprana	27'95 ± 0'26 (N= 49) a
	Folicular tardía	50'62 ± 1'26 (N= 48) b
	Luteal temprana	40'16 ± 1'32 (N= 60) c
	Luteal tardía	30'00 ± 0'54 (N= 69) a
P		<0'01

En las cerdas prepúberes en fase folicular temprana se recogieron 23'48 ± 0'57µl de fluido en cada oviducto (Tabla 25).

Tabla 25. Volumen de FOP recogido de oviductos de animales prepúberes. N = número de oviductos.

Grupo	Fase	Volumen (microlitros/oviducto)
Prepúber	Folicular temprana	23'48 ± 0'57 (N= 43)

Teniendo en cuenta el volumen de FOP/oviducto y la concentración de proteínas, se calculó la concentración de proteínas totales (microgramos) por oviducto para cada fase del ciclo. Los valores medios obtenidos fueron 1.354'77 ± 172'78, 2.118'57 ± 200'65, 1.680'49 ± 122'79 y 1.563'20 ± 149'76, respectivamente para las fases folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía. La cantidad de proteínas totales en la fase folicular tardía fue significativamente mayor al resto de las fases (P=0'02).

4.2.5. Correlación entre las enzimas del FOP.

En la Tabla 26 se detallan las correlaciones halladas entre la actividad enzimática específica de algunas enzimas del FO de las cerdas púberes. Al igual que ocurría con el FOB, la actividad β-N-acetil-galactosaminidasa está positivamente correlacionada con la α-D-manosidasa.

Tabla 26. Índices de correlación entre la actividad enzimática específica de las distintas glicosidasas del FOP de animales púberes.

Enzima	r^2	P
α -L-fucosidasa vs. β -N-acetil-glucosaminidasa	0'57	<0'01
β -D-galactosidasa vs. α -D-manosidasa	0'55	<0'01
α -D-manosidasa vs. β -N-acetil-galactosaminidasa	0'82	<0'01