



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE VETERINARIA

**ACTIVIDAD DE SIETE EXOGLICOSIDASAS,
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y CAMBIOS
DE VOLUMEN, EN EL FLUIDO OVIDUCTAL DE
LAS ESPECIES BOVINA Y PORCINA A LO
LARGO DEL CICLO ESTRAL**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Luis César CARRASCO VILLAMIZAR

Murcia, Noviembre 2007

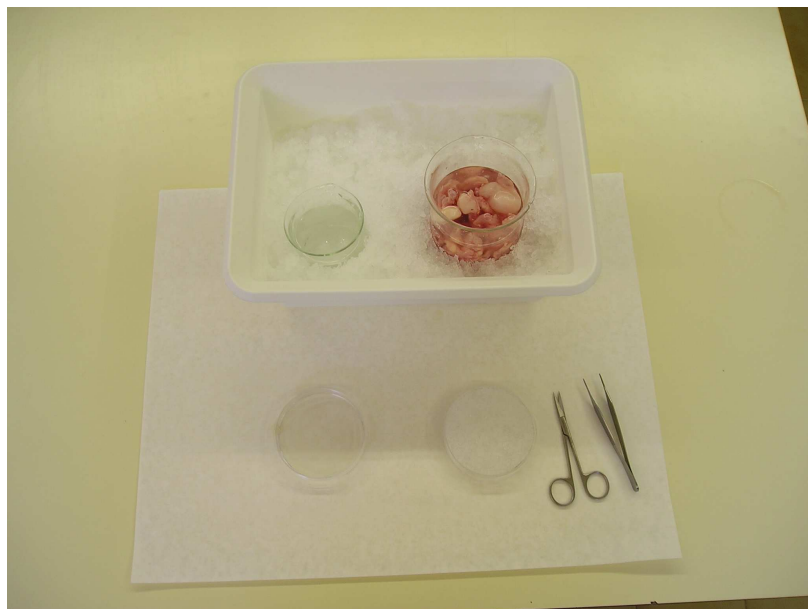
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



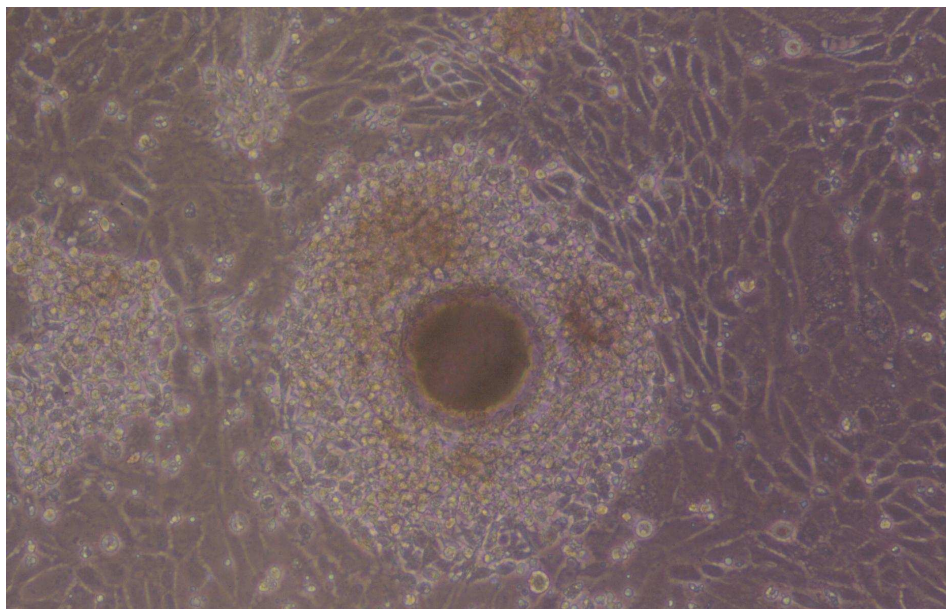
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



3. MATERIAL Y MÉTODOS



4. RESULTADOS



5. *DISCUSIÓN*



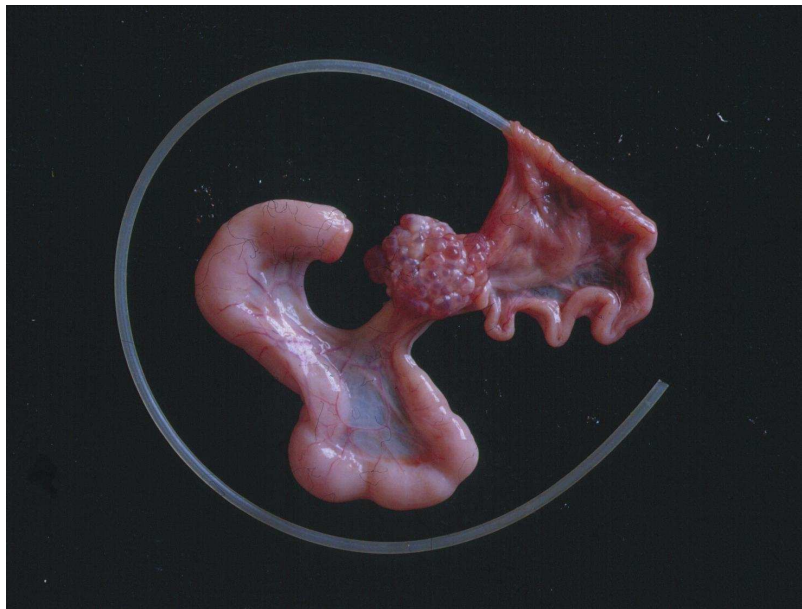
6. CONCLUSIONES



7. RESUMEN



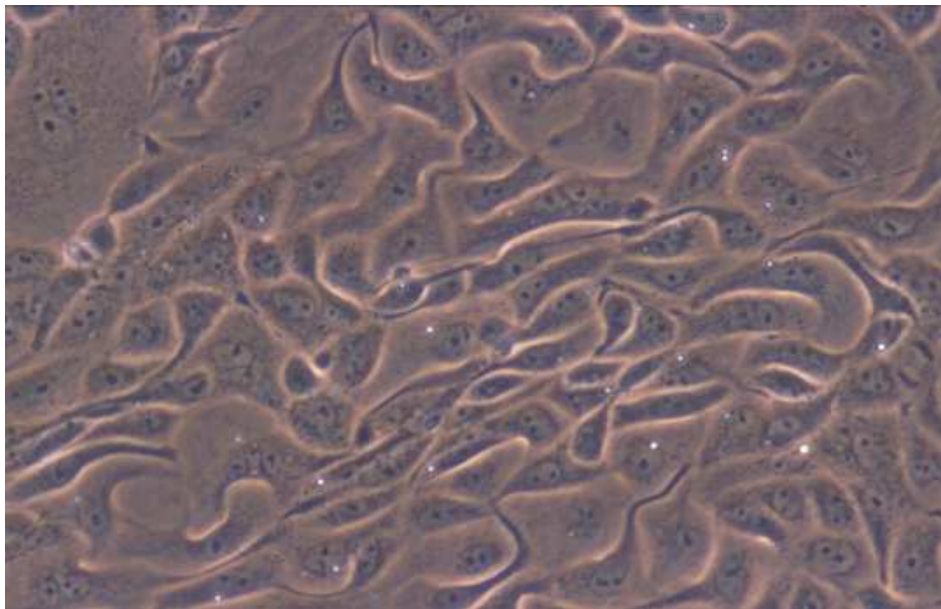
8. SUMMARY



9. ABREVIATURAS



10. BIBLIOGRAFÍA





UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

D. Francisco Javier Salazar Aparicio , Catedrático de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA y Director del Departamento de FISIOLÓGÍA, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen, en el fluido oviductal de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral“, ha sido realizada por D. Luis César Carrasco Villamizar, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. Raquel Romar Andrés y D^a. Pilar Coy Fuster, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 12 de Septiembre de 2007


UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE FISIOLÓGIA

D^a. Pilar Coy Fuster, Profesor Titular de Universidad del Área de FISILOGIA en el Departamento de FISILOGIA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen, en el fluido oviductal de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral“, realizada por D.

Luis César Carrasco Villamizar , bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de FISILOGIA, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de septiembre de 2007

D^a. Raquel Romar Andrés, Profesor Contratado Doctor de Universidad del Área de FISILOGIA en el Departamento de FISILOGIA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen, en el fluido oviductal de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral“, realizada por D.

Luis César Carrasco Villamizar , bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de FISILOGIA, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 10 de septiembre de 2007

Este trabajo experimental ha sido financiado por la Fundación Séneca de la Región de Murcia (Proyecto 03018/PI/05) y por el Ministerio de Educación y Ciencia de España y FEDER (Proyecto AGL2006-03495/GAN).

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta tesis deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todos los que coadyuvaron en su realización, así como a los que contribuyeron para que mi permanencia en este país fuera más grata.

- A mis directoras, las Doctoras Pilar Coy Fuster y Raquel Romar Andrés, por su dirección, su constante apoyo y, sobre todo, por la inagotable paciencia que me dispensaron durante el desarrollo de esta tesis.

- Al Rector de la Universidad de Pamplona, Colombia, Dr. Alvaro González Joves por el apoyo y estímulo brindado para emprender esta empresa.

- A Manuel Avilés Sánchez por su amistad, la orientación recibida para el desarrollo de la investigación y por la revisión de este manuscrito.

- A Joaquín Gadea Mateos por su valiosa ayuda en el análisis estadístico.

- A Salvador Ruiz López por los permanentes diálogos sobre la actualidad deportiva.

- A Carmen Matás Parra por su generosidad al compartir los frutos dulces de su granja.

- A Luis, por su amistad y desinteresada participación en la extracción del fluido oviductal y en la clasificación del material biológico.

- A David, por las inyecciones dominicales de vida durante los encuentros de fútbol. Aunque sus asistencias de gol fueron pocas!

- A Fran por sus deferencias durante nuestra visita a la Toscana.

- A Sebastián, por las voces de aliento recibidas durante los momentos difíciles.

- A Aitor y su familia por los agradables ratos colombo-venezolanos compartidos.

- A María Dolores y a Karen, quienes estuvieron siempre dispuestas a colaborar.

- A Soledad y a mi "pariente" Juan Antonio, por el excelente apoyo técnico.

- A Juana y a Toñi, en el SACE, por su invaluable colaboración durante el uso del fluorímetro.

- A mi esposa Carolina porque además de excelente madre y esposa y estar desarrollado su tesis doctoral tuvo tiempo para "echarle una mano" a la mía.

- A mi hermana Mercedes por la decisión y perseverancia en el cobro de mi mesada y por la agilidad para enviar el giro, amén de otros favores.

ÍNDICE

| | Págin |
|--|------------------------|
| 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... | a 1 |
| 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 2.1. Consideraciones generales sobre enzimología..... | 6 |
| 2.1.1. Nomenclatura y clasificación de enzimas..... | 7 |
| 2.1.2. Factores que afectan a la actividad enzimática..... | 9 |
| 2.1.3. Formas de expresar la actividad enzimática..... | 10 |
| 2.2. Importancia de las enzimas en el proceso de fecundación..... | 11 |
| 2.2.1. Espermatozoides..... | 11 |
| 2.2.1.1. Proteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide que podrían actuar como ligandos para el ovocito. | 12 |
| 2.2.1.2. Interacción espermatozoide-células oviductales..... | 20 |
| 2.2.2. Ovocitos..... | 24 |
| 2.2.2.1. Foliculogénesis y crecimiento del ovocito..... | 24 |
| 2.2.2.2. Carbohidratos que podrían actuar como receptores para el espermatozoide en la zona pelúcida..... | 28 |
| 2.2.2.3. Interacción ovocito-oviducto..... | 35 |
| 2.3. Enzimas y fluido oviductal..... | 36 |
| 2.3.1. Histología del oviducto..... | 37 |
| 2.3.2. Fluido oviductal (FO)..... | 38 |
| 2.3.2.1. Métodos de recogida del fluido oviductal..... | 40 |
| 2.3.2.2. Composición del fluido oviductal..... | 42 |
| 2.3.2.2.1. Enzimas presentes en el fluido oviductal..... | 50 |
| 2.3.2.2.1.1. Glicosidasas en el fluido oviductal..... | 52 |
| 2.3.2.2.1.1.1. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad enzimática de las glicosidasas..... | 61 63 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 64 64 |

| | |
|--|-------------------|
| 3.1. Soluciones empleadas | 64 |
| 3.1.1. Solución salina fisiológica (SSF)..... | 64 |
| 3.1.2. Cetab..... | 64 |
| 3.1.3. Tampón fosfato salino (PBS)..... | 65 |
| 3.1.4. Tampón glicina-carbonato de calcio..... | 72 |
| 3.2. Material | 76 |
| biológico | |
| 3.2.1. Clasificación de los oviductos bovinos..... | 76 |
| 3.2.2. Clasificación de los oviductos porcinos..... | 80 |
| | 80 |
| 3.3. Obtención y almacenamiento de fluido oviductal (FO) | 80 |
| 3.4. Determinación de proteínas del fluido oviductal | 80 |
| 3.4.1. Ensayo proteico..... | 81 |
| 3.4.2. Medición de la absorbancia..... | 82 |
| | 82 |
| 3.5. Ensayo enzimático | |
| 3.5.1. Preparación de sustratos..... | 82 |
| 3.5.2. Controles..... | |
| 3.5.3. Incubación..... | 83 |
| 3.5.4. Medición de fluorescencia..... | |
| 3.5.5. Cálculo de la actividad enzimática y actividad enzimática | 84 |
| específica..... | 85 |
| . | 85 |
| | 85 |
| 3.6. Análisis estadístico | 87 |
| | 88 |
| 4. RESULTADOS | 88 |
| | |
| | 89 |
| 4.1. . | Especie 89 |
| bovina | 93 |
| 4.1.1. Unidades de actividad enzimática en el FOB..... | 97 |
| | 98 |
| 4.1.2. Actividad enzimática específica en el FOB..... | 99 |

| | | |
|---|---|-----|
| 4.1.3. | Concentración de proteínas en el FOB..... | 101 |
| 4.1.4. | Volumen de FOB recogido en cada fase..... | 103 |
| 4.1.5. | Correlación entre las enzimas del FOB..... | 104 |
| | | 108 |
| | | 113 |
| 4.2. Especie | | 115 |
| porcina..... | | 117 |
| 4.2.1. | Unidades de actividad enzimática en el FOP..... | 120 |
| 4.2.2. | Actividad enzimática específica en el FOP..... | 123 |
| 4.2.3. | Concentración de proteínas en el FOP..... | 125 |
| 4.2.4. | Volumen de FOP recogido en cada fase..... | 129 |
| 4.2.5. | Correlación entre las enzimas del FOP..... | 133 |
| | | 135 |
| 5. DISCUSIÓN..... | | |
| 5.1. Neuraminidasa y β-D-galactosidasa..... | | |
| 5.2. α-L-fucosidasa..... | | |
| 5.3. β-N-acetilglucosaminidasa..... | | |
| 5.4. β-D-galactosidasa..... | | |
| 5.5. α-D-manosidasa..... | | |
| 5.6. β-N-acetilgalactosaminidasa..... | | |
| 5.7 Proteínas y volumen de fluido oviductal..... | | |
| 6. CONCLUSIONES..... | | |
| ... | | |
| 7. RESUMEN..... | | |
| ... | | |
| 8. SUMMARY..... | | |
| ... | | |

9. ABREVIATURAS.....

10. REFERENCIAS