

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

Todos los reactivos químicos empleados en este trabajo fueron adquiridos a Sigma Aldrich Química (Madrid, España) si no se especifica lo contrario.

#### 3.1. Soluciones empleadas.

##### 3.1.1. Solución salina fisiológica (SSF).

Se utilizó como medio de lavado de los oviductos. La SSF se preparó en el laboratorio, agregando a 1 litro de agua bidestilada, 9'0g de NaCl y 0'1g de sulfato de kanamicina. Una vez disueltos los reactivos, la solución se enrasó en botellas de vidrio estéril, conservándose a temperatura ambiente hasta su utilización.

##### 3.1.2. Cetab.

Se usó, junto con la SSF, como uno de los medios de lavado de oviductos. Para la preparación de la solución Cetab se diluyeron 5'0g de cetrimida (Bromuro de hexadeciltri-metilamonio) en 25ml de etanol. Se mezcló bien y se añadió agua bidestilada hasta completar un volumen de 500ml. Ésta fue la solución Cetab stock, que se almacenó en botellas de vidrio estéril. Para el lavado de los oviductos se diluyó 1:25 con agua bidestilada.

##### 3.1.3. Tampón fosfato salino (PBS).

Se utilizó como tampón en el ensayo enzimático tanto en las muestras como en los controles.

EL PBS se preparó en el laboratorio con agua ultrapura (Milli-Q) agregando las sales en el orden que aparece en la tabla 9 y manteniendo en agitación continua. El pH se ajustó a 7'4, se esterilizó utilizando un filtro de 0'22 $\mu$ m (en cabina de flujo laminar) y se conservó a 4°C, hasta su uso y durante un máximo de un mes.

##### 3.1.4. Tampón glicina-carbonato de calcio.

Se empleó para detener las reacciones enzimáticas en el momento deseado. Se preparó en el laboratorio con agua ultrapura (Milli-Q) empleando concentraciones iguales (0'0085M) de glicina y carbonato de calcio. El pH se ajustó a 10, con hidróxido de sodio (NaOH), y se conservó a 4°C hasta su uso y durante un tiempo máximo de cuatro meses.

Tabla 9. Composición del PBS.

Componente	Concentración (g/l)
NaCl	8'0
KCl	0'2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1'15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0'2
Piruvato de sodio	0'036
Glucosa	1'0
Kanamicina	0'007

### 3.2. Material biológico.

Los oviductos utilizados en este estudio se obtuvieron a partir de genitales de animales sacrificados en el matadero. Las hembras bovinas sacrificadas fueron principalmente de razas de aptitud cárnica (Asturiana, Charolés, Limousine) y mixta (Simmental), de edades comprendidas entre los 14 y 20 meses. Por su parte, las hembras porcinas fueron cruce de razas Landrace x Large White, y de edad comprendida entre 6 y 18 meses. Las muestras se recogieron a lo largo de un año encontrándose los animales en diferentes estadios del ciclo estral en el momento del sacrificio puesto que ambas especies son poliéstricas continuas.

Los genitales se transportaron al laboratorio en un termo en el plazo máximo de 2 horas desde el sacrificio y se separaron los oviductos, unidos siempre a sus correspondientes ovarios y manteniendo siempre identificados los dos ovarios de un mismo aparato genital. Los ovarios se lavaron dos veces en Cetab y dos veces en SSF y se clasificaron las muestras de acuerdo al momento del ciclo estral en el que se encontraban los animales. Para ello se observó meticulosamente la morfología del ovario correspondiente a cada oviducto, en especial el desarrollo de los folículos y el aspecto del cuerpo lúteo (CL).

#### 3.2.1. Clasificación de los oviductos bovinos.

Los ovarios bovinos con sus correspondientes oviductos se evaluaron de acuerdo al criterio establecido por Orsi et al., (2005) (Tabla 10). Debido a la edad de sacrificio de las novillas, todas las muestras procedían de animales que habían llegado a la pubertad. Los tractos reproductivos bovinos se dividieron en dos grandes grupos: animales en fase folicular y animales en fase luteal. Dentro del primer grupo se incluyeron aquellos animales que mostraron ovarios con presencia de un folículo

dominante (>12mm) o preovulatorio (~15mm), ya fuera con/sin CL regresivo o cuerpo *albicans* (Figura 2). En el grupo de animales en fase luteal se incluyeron aquellos ovarios de animales con cuerpo hemorrágico o CL reciente vascularizado, con/sin cuerpo *albicans*, y cuyos folículos en crecimiento fueran <4mm (Figura 3). Los aparatos reproductores de animales gestantes o con quistes ováricos se descartaron para el estudio (Figura 4).

Tabla 10. Clasificación de los **oviductos bovinos** de acuerdo a la morfología ovárica.

Grupo	Fase ciclo estral	Morfología ovárica
<b>Púberes</b>	Folicular	Presencia de folículo dominante (>12mm de diámetro) o a punto de ovular (~15mm de diámetro). Presencia/ausencia CL regresivo de color rosado o CA.
	Luteal	CH reciente o CL vascularizado en la periferia con estigma de color rojo oscuro. Presencia/ausencia de CA. Folículos en crecimiento <4mm.

Adaptado de Orsi et al., (2005)

CH: cuerpo hemorrágico

CL: cuerpo lúteo

CA: cuerpo *albicans*

**Figura 2. Genitales y ovarios bovinos de hembras en fase folicular.** **1)** Ovarios con folículos dominantes (flecha). **2)** Ovario con su correspondiente oviducto sin disecar rodeado del mesosalpinx. Se ha remarcado el trayecto oviductal mediante un trazado paralelo a éste desde la unión uterotubárica (uut) hasta la ampolla oviductal (a). El corchete señala el punto de unión del hileo ovárico al mesosálpinx. Genital bovino de un animal prepúber en fase folicular temprana.

**Figura 2 (continuación).** **3)** Genital de un animal con un folículo dominante (ovario a la izquierda). **4)** Genital de un animal con un folículo a punto de ovular (ovario a la izquierda). **5)** Genital de un animal con un folículo dominante (ovario a la derecha). El oviducto aparece canulado. La aguja señala la unión uterotubárica. En el ovario contralateral hay un cuerpo albicans de un ciclo anterior. **6)** Genital de un animal con un folículo dominante (ovario a la derecha) y un cuerpo albicans en el ovario contralateral.

**Figura 3. Genitales y ovarios bovinos de hembras en fase luteal.** 1) Ovarios en fase luteal mostrando: a) un cuerpo hemorrágico, b) un cuerpo lúteo reciente con el estigma de color rojo oscuro y c) un cuerpo lúteo tardío con la presencia de folículos de pequeño tamaño. 2) Ovario con cuerpo hemorrágico adherido a su correspondiente oviducto. 3) Ovario con cuerpo lúteo reciente adherido a su correspondiente oviducto.

**Figura 3 (continuación).** **4)** Genital de un animal con un cuerpo hemorrágico (ovario a la derecha). **5)** Genital con un cuerpo lúteo ligeramente vascularizado (ovario a la derecha). En el ovario contralateral se observan pequeños folículos ováricos en crecimiento. **6)** Genital con un cuerpo hemorrágico (ovario a la derecha). El oviducto aparece canulado. La aguja señala la unión uterotubárica. **7)** Genital con un cuerpo lúteo ligeramente vascularizado (ovario a la derecha). Se ha retirado totalmente el mesosalpinx y el oviducto aparece disecado y canulado.

**Figura 4. 1)** Ovario bovino poliquístico con su correspondiente oviducto canulado. **2)** Genital bovino de una hembra preñada.



### 3.2.2. Clasificación de los oviductos porcinos.

Los oviductos porcinos se clasificaron de acuerdo a la morfología ovárica, siguiendo los criterios establecidos por Anderson (2002) (Tabla 11). Inicialmente se dividieron en dos grupos: animales prepúberes y púberes. Los prepúberes incluyeron aquellos aparatos reproductores que no mostraban señales de haber tenido ciclos estrales (sin cuerpos hemorrágicos o carencia total de CL o *corpus albicans*). En el grupo de animales púberes se reunieron aquellos aparatos reproductivos que revelaban señales de haber tenido, al menos, un ciclo estral (con cuerpos hemorrágicos o CL y/o cuerpos *albicans*).

En el grupo de animales prepúberes sólo se consideró la fase folicular temprana ya que no fue posible obtener de matadero oviductos de este grupo de animales en fase folicular tardía. Así pues, en la fase folicular temprana se incluyeron aquellos oviductos adheridos a ovarios con folículos en crecimiento (de 2-5mm de diámetro) (Figura 5).

Por otra parte, los ovarios provenientes de hembras púberes se repartieron en cuatro grupos de acuerdo a las fases del ciclo estral: fase folicular temprana, fase folicular tardía, fase luteínica temprana y fase luteínica tardía (Figura 6). En la fase folicular temprana se clasificaron los oviductos adheridos a ovarios con características similares a las descritas para las hembras prepúberes, pero con signos de haber tenido al menos un ciclo estral (presencia de CL regresivos y/o cuerpos *albicans*). En fase folicular tardía se incluyeron aquellos animales con ovarios que mostraban varios folículos en su fase final de crecimiento (8-11mm de diámetro) o folículos a punto de ovular (>11mm) y con signos de haber tenido al menos un ciclo estral. En el grupo de la fase luteínica temprana se incorporaron los animales con cuerpos hemorrágicos o CL recientes. La fase luteínica tardía comprendió a aparatos reproductivos con CL poco vascularizados y rosados o mostrando regresión hacia un cuerpo *albicans*.

Al igual que en la especie bovina, se desecharon los aparatos reproductores que presentaron quistes ováricos o procedían de animales gestantes.

Tabla 11. Clasificación de los **oviductos porcinos** de acuerdo a la morfología ovárica.

<b>Grupo</b>	<b>Fase ciclo estral</b>	<b>Morfología ovárica</b>
	Folicular temprana	Folículos en crecimiento (2-5mm de diámetro).
<b>Prepúberes</b>	Folicular temprana	Folículos en crecimiento (2-5mm de diámetro), con/sin CL regresivos no vascularizados en la superficie y con/sin cuerpos <i>albicans</i> .
	Folicular tardía	Presencia de varios folículos preovulatorios (8-11mm de diámetro) o folículos a punto de ovular (>11mm), con CL regresivos no vascularizados en la superficie
<b>Púberes</b>	Luteínica temprana	Cuerpos hemorrágicos recientes o CL muy vascularizados en la periferia y estigmas de color púrpura. Folículos pequeños. Presencia o ausencia de CA.
	Luteínica tardía	Con CL regresivos rosados o cuerpos <i>albicans</i> y folículos <2 mm.

Adaptado de Anderson (2002)

CH: cuerpo hemorrágicos

CL: cuerpo lúteos

CA: cuerpo *albicans*

**Figura 5. Ovarios porcinos de hembras prepúberes.** **1)** Ovario y oviducto de una cerda prepúber. Se aprecia la presencia en el ovario de numerosos folículos de 2-5 mm diámetro (flecha) y ausencia de signos de un ciclo anterior. Para una mejor visualización se ha introducido una cánula por la ampolla oviductal. **2)** Aspecto de la misma muestra de la imagen 1 mostrando el ovario aislado y el oviducto disecado.

**Figura 6. Ovarios porcinos de hembras púberes.** **1)** Ovarios porcinos de hembras púberes en distintas fases del ciclo estral: fase folicular tardía (a), luteal temprana (b), luteal tardía (c) y folicular temprana (d). **2)** Ovarios de una cerda púber en fase folicular temprana donde se aprecian cuerpos lúteos regresivos y poco vascularizados (flecha) y folículos en crecimiento (asterisco). **3)** Ovarios de una cerda púber en fase folicular tardía mostrando cuerpos albicans y folículos en fase final de crecimiento (asterisco). **4)** Ovario de una cerda púber en fase luteínica temprana con varios cuerpos hemorrágicos (flecha) y cuerpos albicans (asterisco) de un ciclo anterior. **5)** Ovarios de una cerda púber en fase luteínica tardía con cuerpos lúteos (flecha) y cuerpos albicans.

### 3.3. Obtención y almacenamiento de fluido oviductal (FO).

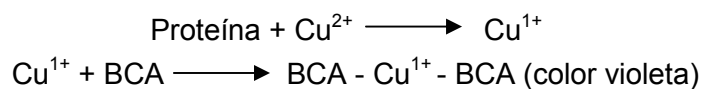
Una vez catalogados, los oviductos se colocaron para su conservación en un recipiente sobre hielo. En una placa de Petri de 60 mm de diámetro con PBS y sobre un baño de hielo se procedió a su disección, desde el istmo hacia la ampolla e infundíbulo, con la ayuda de pinzas y tijeras apropiadas, liberándolos de los tejidos adyacentes, mesosálpinx y ovario (Figura 7).

El FO se recogió mediante aspiración, con la ayuda de una pipeta automática de 200µl, conectada a una punta e introducida por la ampolla oviductal y la simultánea presión manual de las paredes oviductales, en dirección istmo-ampolla (Figura 8). Se mezcló el FO procedente de oviductos del mismo grupo hasta alcanzar un volumen por muestra suficiente para realizar el ensayo enzimático y la determinación de proteínas. Se anotó el número de oviductos aspirados por cada muestra y el FO recogido se centrifugó a 7.000g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los posibles restos de células. Tras la centrifugación, se aspiró el sobrenadante con cuidado de no pipetear restos celulares presentes en el pellet. Se midió el volumen neto recogido después de la centrifugación para calcular con posterioridad el volumen medio de FO obtenido por oviducto en cada una de las muestras de las diferentes fases del ciclo estral. Finalmente, las muestras de FO se almacenaron a -80°C hasta su análisis enzimático que en todos los casos fue en tiempo inferior a 3 semanas.

### 3.4. Determinación de proteínas del fluido oviductal.

Para determinar la cantidad total de proteínas en el FO se utilizó el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), usando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). Ésta es una prueba empleada para la detección colorimétrica y la cuantificación de proteínas. Este método combina la reducción del ión cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) a ión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la detección de este catión ( $\text{Cu}^{+1}$ ) usando un reactivo que contiene el ácido bicinconínico. El producto final de la reacción es de un color púrpura formado por la unión de dos moléculas de BCA con una del ión cuproso (Smith et al., 1985). Este complejo hidrosoluble puede ser detectado mediante absorbancia a una longitud de onda de 560 nm.

Ensayo del ácido bicinconínico (BCA) para la determinación de proteínas.



**Figura 7. Disección de oviductos.** **1)** Matrazes con hielo conteniendo los oviductos adheridos a su correspondiente ovario. Pinzas y tijeras de disección. **2)** Comienzo de la disección del oviducto en dirección istmo-ampolla. **3)** y **4)** Oviductos porcinos de distinta fase del ciclo estral con sus correspondientes ovarios. **5)** Corte del oviducto por la ampolla. **6)** Oviductos ya disecados en un matraz con hielo (izquierda) esperando a ser aspirados para obtener el fluido oviductal.

**Figura 8. Obtención de fluido oviductal.** **1)** Introducción de la punta de la pipeta automática en la ampolla del oviducto disecado. **2)** Manipulación mecánica ascendente presionando en dirección istmo-ampolla. **3)** y **4)** Obsérvese la acumulación del fluido oviductal (flechas) conforme se va presionando el oviducto. **5)** Aspiración del fluido oviductal (flecha). **6)** Detalle de la pipeta automática con el fluido oviductal aspirado de un oviducto (flecha).

**Figura 8 (continuación).** **7)** Recogida en tubo eppendorf del fluido oviductal procedente de oviductos de un mismo grupo. **8)** y **9)** Centrífuga refrigerada empleada para centrifugar las muestras obtenidas. **10)** Muestra de fluido oviductal tras la centrifugación donde se observa el fluido (eppendorf izquierda) separado de los restos celulares (eppendorf derecha).



#### 3.4.1. Ensayo proteico.

Las muestras de FO se distribuyeron en 3 tubos de ensayo en volúmenes de 4, 8 y 12µl respectivamente, agregando a cada uno agua ultrapura hasta completar un volumen final de 200µl por tubo. Para iniciar la reacción, se adicionaron 2ml del reactivo de trabajo a cada tubo. Siguiendo las indicaciones establecidas por el fabricante (Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL.), el reactivo de trabajo se preparó en el momento del ensayo mezclando 50 volúmenes del reactivo A (incolore) y 1 volumen del reactivo B (azul). Las muestras se mezclaron adecuadamente y se incubaron a 37°C en baño maría durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos e inmediatamente se realizó la lectura de absorbancia.

#### 3.4.2. Medición de la absorbancia.

Las muestras se midieron a 560nm con la ayuda de un espectrofluorímetro Fluostar Galaxy (BMG Lab. Technologies, Durham, Carolina del Norte, EEUU) provisto de una placa de 96 pocillos (Nunc, Roseville, Dinamarca) y colocando volúmenes de 100µl muestra/pocillo.

Se realizó una curva estándar usando BSA a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 mg/ml en agua ultrapura, empleando agua como blanco. Con los patrones se hizo una recta con la que se calculó posteriormente la concentración de proteínas de las muestras (µg proteína/µl FO).

### **3.5. Ensayo enzimático.**

Se determinó el nivel de actividad de 7 enzimas glicosidasas, siguiendo para todas ellas el protocolo descrito por Abascal et al. (1998), para α-L-fucosidasa. Para ello se emplearon sustratos sintéticos (α y β glicósidos) unidos al grupo cromóforo 4'metilumbeliferil (Tabla 12).

#### 3.5.1. Preparación de sustratos.

Los sustratos empleados para determinar la actividad de las enzimas en el FO se elaboraron en el laboratorio con agua ultrapura (Milli-Q), y en condiciones estériles. A partir de soluciones stock 0'1M, se obtuvieron las soluciones de trabajo de cada uno de los sustratos a una concentración de 1mM que se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

El día del ensayo se descongelaron tanto las muestras de FO como los sustratos y se prepararon, en un baño de hielo y por duplicado, sendos tubos de ensayo donde se añadieron por este orden 40 $\mu$ l de PBS, 20 $\mu$ l de sustrato (1mM) y 10 $\mu$ l de FO. En el caso de que la enzima esté activa en el FO, se hidroliza el enlace y se libera el glicósido (sustrato) del cromóforo, la 4´metilumbeliferona (4MUB). La 4MUB liberada emite una fluorescencia que puede ser medida. La actividad de las glicosidasas fue cuantificada a partir de la cantidad de 4MUB liberada por unidad de tiempo.

Tabla 12. Sustratos empleados para la determinación de enzimas en FO.

<b>Enzima</b>	<b>Sustrato</b>
$\alpha$ -L-fucosidasa	4´metilumbeliferil- $\alpha$ -L-fucopiranosido
$\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa	4´metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamínido
$\beta$ -D-galactosidasa	4´metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopiranosido
$\alpha$ -D-galactosidasa	4´metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galactopiranosido
$\alpha$ -D-manosidasa	4´metilumbeliferil- $\alpha$ -D-manopiranosido
$\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa	4´metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosamínido
Neuraminidasa	4´metilumbeliferil-N-acetil-neuramínico

### 3.5.2. Controles.

Se realizaron tres tipos de controles. Por un lado, un control negativo del sustrato que contenía el mismo volumen final (70 $\mu$ l) que los ensayos con FO, pero con la particularidad de que sólo tenía el sustrato de la enzima (20 $\mu$ l) en 50 $\mu$ l de PBS. Se empleó para conocer la posible emisión espontánea de fluorescencia del sustrato, pues algunos de ellos se disocian sin necesidad de la enzima según el pH del medio. Por otro lado, un control del tejido conteniendo únicamente 10 $\mu$ l de FO en 60 $\mu$ l de PBS. Igualmente, se empleó con la finalidad de conocer la propia autofluorescencia que emite la muestra biológica y no se corresponde con actividad enzimática. Por último, un control positivo con plasma seminal humano (10 $\mu$ l de plasma seminal y 20 $\mu$ l de sustrato en 40 $\mu$ l de PBS) ya que este fluido presenta actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa (Alhadeff et al., 1999),  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa (Yoshida et al., 1987),  $\beta$ -D-galactosidasa (Corrales et al., 2002),  $\alpha$ -D-galactosidasa (Spiessens et al., 1998)  $\alpha$ -D-manosidasa (Corrales et al., 2002) y  $\beta$ -N-acetil-galactosaminidasa (Kapur y Gupta, 1985). Para neuraminidasa se emplearon 10 $\mu$ l (0´05 UI) de la enzima, 20 $\mu$ l de sustrato

y 40µl de PBS, puesto que no existen referencias de actividad neuraminidasa en el plasma seminal humano.

### 3.5.3. Incubación.

Tras la inmediata adición de la muestra todos los tubos se incubaron durante 4 horas a 37°C en baño maría. Al finalizar este tiempo, las muestras se colocaron de nuevo sobre hielo y se detuvo la reacción agregando, a cada una, 350µl de tampón glicina-carbonato de calcio, pH 10.

### 3.5.4. Medición de fluorescencia.

La cantidad de fluoróforo liberado (4MUB) se determinó por fluorescencia con la ayuda de un espectrofluorímetro Fluostar Galaxy (BMG Lab. Technologies, Durham, Carolina del Norte, EEUU) a una longitud de onda de 340nm de excitación y una de 450nm de emisión. Tanto las muestras como los controles se dispusieron, para su medición, en una placa de 96 pocillos (Nunc, Roseville Denmark) con 200µl de muestra/pocillo.

### 3.5.5. Cálculo de la actividad enzimática y actividad enzimática específica.

A partir de los datos brutos de fluorescencia y de concentración de proteínas obtenidos, se calcularon los datos finales de actividad enzimática y actividad enzimática específica mediante los siguientes pasos:

- Valor medio de fluorescencia para cada enzima: se realizó una media entre los dos tubos de la misma enzima de cada muestra para obtener los datos medios de fluorescencia.

- Restar autofluorescencia: los datos brutos de fluorescencia se corrigieron restando los valores de fluorescencia obtenidos para el control del tejido y el control negativo del sustrato de la misma enzima de cada muestra.

- Transformación de los valores de fluorescencia en cantidad de 4MUB producida: se estimó la concentración del sustrato liberado en cada muestra haciendo una recta con 4MUB a concentraciones de 0, 0'01, 0'02, 0'03, 0'04, 0'05, 0'06, 0'07, 0'08 y 0'09 mg/ml en agua purificada, empleando agua como blanco. A partir de la recta se calcularon las concentraciones de 4MUB en cada muestra liberada en las 4h de ensayo enzimático.

- Cálculo de actividad enzimática: se calculó la actividad de cada una de las 7 glicosidasas expresada en unidades, considerando que 1 Unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1pmol de 4MUB en las condiciones del ensayo o, lo que es lo mismo, hidrolizar 1pmol de sustrato (4'metilumbeliferil-glicósido)/minuto a 37°C y pH=7.

- Cálculo de actividad enzimática específica: se calculó teniendo en cuenta la cantidad de proteína de cada muestra. Así pues, 1 Unidad de actividad enzimática específica se corresponde con el número de Unidades de actividad enzimática de la muestra/cantidad de proteína de la muestra (mg).

Debido a la disparidad de criterios observada en la bibliografía en cuanto a la medida a utilizar para evaluar la actividad de las diferentes enzimas, se decidió expresar los resultados del presente trabajo tanto en unidades de actividad enzimática como en actividad enzimática específica. Esta decisión, si bien nos obligó a presentar la información en cierto modo duplicada, ofrece la ventaja de que facilita la tarea de discusión y comparación con los diferentes datos encontrados en la literatura.

### **3.6. Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico Systat v. 11 (Systat Software Inc., San José, California, EEUU) para Windows.

Los resultados de las variables estudiadas (actividad enzimática, actividad enzimática específica, concentración de proteínas y volumen de fluido oviductal), se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía teniendo en cuenta la fase del ciclo estral como factor fijo (FOB), o bien el grupo para poder comparar los datos entre animales prepúberes y púberes (FOP). Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo los valores fueron comparados por el Test de Tukey, considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad  $P < 0.05$ . Igualmente se realizó un test de correlación de Pearson entre la actividad enzimática de las distintas glicosidasas.