
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



"CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y CUANTIFICACION DE
GLICOSAMINOGLICANOS (GAGS) EN ORINA
DURANTE EL CICLO MENSTRUAL"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
LAURA REBECA DIAZ CASTAÑOS

GUADALAJARA, JAL., 1989

M.C. GUILLERMO PEREZ GARCIA
(DIRECTOR DE TESIS)

QUIM. ARMANDO CARRANCO LOPEZ
(ASESOR DE TESIS)

AGRADECIMIENTOS

AI QUIM. ARMANDO CARRANCO LOPEZ
POR LA VALIOSA AYUDA QUE ME BRINDO A LO
LARGO DE TODO EL TRABAJO ASI COMO LAS
OBSERVACIONES Y CRITICAS QUE ME
PERMITIERON EVOLUCIONAR EN MIS IDEAS Y EN
LA CONTINUIDAD DE MI FORMACION
PROFECCIONAL Y CULTURAL.

AL M. EN C. GUILLERMO PEREZ GARCIA
POR LA DIRECCION DEL TRABAJO.

AGRADEZCO LAS FACILIDADES BRINDADAS A
LAS AUTORIDADES DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL POR
PERMITIR LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO
EN LOS LABORATORIOS DE LA SECCION DE
ESTEROIDES DE LA DIVISION DE BIOLOGIA DEL
DESARROLLO.

AGRADEZCO AL LABORATORIO DE ESTEROIDES
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA
DE OCCIDENTE (IMSS), POR HABER REALIZADO
LAS DETERMINACIONES DE LH Y PROGESTERONA
PLASMATICAS DE ESTE TRABAJO.

CON CARINO, ADMIRACION Y RESPETO PARA

MIS PADRES:

VICTOR RUBEN DIAZ SUAREZ

Y

REBECA CASTANOS DE DIAZ

MIS HERMANOS:

VICTOR, ADRIANA, CARLOS

HECTOR Y MARY.

POR QUE TODO LO QUE SOY ES POR
EL APOYO Y AMOR QUE ME HAN DADO
A LO LARGO DE MI CARRERA.

INDICE

1.- INTRODUCCION	Pag. 1
2.- OBJETIVOS	9
3.- MATERIAL Y METODOS	11
4.- RESULTADOS	25
5.- DISCUSION	29
6.- CONCLUSIONES	33
7.- TABLAS	35
8.- FIGURAS	41
9.- GLOSARIO	51
10.- BIBLIOGRAFIA	57
11.- CARTA DE ACEPTACION DEL PROYECTO DE TESIS ...	64
12.- CARTA DE VISTO BUENO DEL DIRECTOR DE TESIS ..	65

INTRODUCCION

En los mamíferos se encuentran dos tipos de ciclo sexual, el ciclo menstrual y el ciclo del estro, el primero es característico de los primates, o sea, del hombre y de los monos; también lo encontramos en la musaraña arbórea (*turpeia*) y en la musaraña elefante (*elephantulus*). El segundo lo presentan todos los demás mamíferos (Roedores, Cetáceos, lagomorfos etc.). (1).

El ciclo menstrual humano es un sistema repetitivo que depende de variaciones esenciales de los niveles de hormonas en momentos fundamentales. Es decir, es el resultado de un sistema complejo en el que intervienen:

- 1.- El factor de liberación de las hormonas gonadotrópicas (GnRH).
- 2.- Las hormonas gonadotrópicas; que son la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH).
- 3.- Las hormonas sexuales; 17 beta estradiol y progesterona. (2,3,4).

La inter-relación entre estas sustancias forman el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas. Este tiene un efecto regulador en el ciclo, ya que las diversas hormonas y el factor no se secretan en cantidades constantes y uniformes. (2,3,4).

La GnRH juega un papel importante en la regulación de

las funciones reproductivas masculinas y femeninas, esta es un decapeptido sintetizado en el hipotálamo, y es liberado através de los capilares del sistema portal hipotálamo-hipófisiario, y trasportados directamente a la hipófisis; a su vez la hipófisis secreta la FSH y LH en respuesta a la acción de la GnRH. Las Gonadotropinas hipófisiarias actúan sobre las células gonadales para regular la secreción de esteróides sexuales y de un factor proteico; estos factores esteroidal y proteico actúan sobre la Hipófisis e hipotálamo formando un sistema cerrado de retroalimentación (Feed-back) .

En respuesta a la GnRH hipotálmica y a los factores gonadales, la secreción de la FSH y LH hipofisiaria varian a lo largo del ciclo, predominando en la primera fase las altas concentraciones de FSH que provocan el crecimiento folicular en los ovarios y la producción en el folículo de 17 beta estradiol, y en la fase secretora sobresale la LH que va a actuar en el cuerpo lúteo del ovario, para controlar la síntesis de progesterona, al llegar esta hormona sexual a una concentración óptima, bloquea la secreción de GnRH en el hipotálamo; en estos momentos los niveles hormonales son muy bajos, y sin apoyo hormonal el endometrio no puede sostenerse y una porción se desprende, originando así la menstruación.

Este proceso continúa durante toda la vida reproductiva de la mujer. (2,3,4).

En las hormonas gonadotropicas y sexuales existen relaciones precisas y dinámicas que permiten que tenga lugar la naturaleza cíclica de los procesos reproductivos normales. Estas variaciones hormonales están íntimamente correlacionadas con las variaciones morfológicas y bioquímicas del ovario, la estricta coordinación de este sistema es uno de los más notables hechos de la biología. (2).

Los cambios morfológicos del ovario y los niveles hormonales durante todo el ciclo menstrual, lo podemos describir dividiendolo en fase folicular, fase luteínica y ovulación (figura 1).

La fase folicular corresponde a los primeros días del ciclo, hasta antes que ocurra la ovulación. Esta fase se inicia con un incremento de FSH, y es responsable de la estimulación de la maduración del folículo. (figura 1).

La fase luteínica se caracteriza por la presencia del cuerpo lúteo y por los niveles máximos de progesterona en la sangre, estos niveles son superiores a 5 ng/ml en ciclos ovulatorios. Esta fase ocurre después de la ovulación hasta antes de la menstruación.

La ovulación ocurre a mitad del ciclo, no siempre en el

mismo día. El óvulo se desprende del ovario por la ruptura del folículo expulsando al oocito, el promedio de vida del óvulo es de 24 horas. Aquí existe un aumento brusco de LH. (2,3). (figura 1).

El ciclo menstrual tiene un intervalo de 28 ± 3 días, con límites de 18 a 40 días en el 65 % de las mujeres. Por definición el día 1 del ciclo corresponde al primer día del flujo menstrual y el último día es áquel que esta previo al nuevo sangrado. Los primeros ciclos menstruales suelen ser anovulatorios ó esporádicamente ovulatorios durante el primer año ó año y medio. El eje Hipótalamo-Hipófisis-Gónadas es muy sensible, se afecta fácilmente por estímulos provenientes de los niveles cerebrales más altos, estos estímulos pueden ser provocados por las tensiones, las depresiones, los viájes, los cambios de peso, en especial cuando este se pierde considerablemente, etc. Estas perturbaciones en el eje pueden originar ciclos muy irregulares, ó amenorrea, de ahí que la longitud del ciclo varíe cada mes y la ovulación no siempre se presente. (2,3,4).

Podemos detectar que la ovulación ha ocurrido por medio de pruebas directas ó indirectas. Entre las directas podemos mencionar: EL DESARROLLO DEL EMBARAZO, LA RECUPERACION DE LOS OVULOS de los

oviductos, ó la observación directa del cuerpo lúteo por ENDOSCOPIA PELVICA ó LAPAROSCOPIA. (5). Sin embargo, varios métodos se han propuesto para obtener una indicación indirecta de que el fenómeno de la ovulación ha ocurrido. Entre los métodos que se pueden mencionar son las determinaciones hormonales en plasma de LH (6)., ESTROGENOS (7) y PROGESTERONA (8)., así como los procedimientos basados en la TEMPERATURA BASAL CORPORAL (9,10)., LAS MODIFICACIONES HISTOLOGICAS DEL ENDOMETRIO, CITOLOGIA VAGINAL (11,12) y las pruebas QUIMICAS DEL MOCO CERVICAL (13,14,15).

Los Glicosaminoglicanos (GAGs) ó mucopolisacáridos son un grupo heterogéneo de polímeros lineales aniónicos constituidos por secuencias repetitivas de disacáridos formados por un aminoazúcar y un ácido urónico, poseen un elevado peso molecular, con más de 100 unidades monómericas. Cuando estos polímeros se encuentran unidos covalentemente a una proteína (nucleo proteico) se conocen con el nombre de proteoglicanos. (16).

En los estudios realizados sobre los GAGs se han encontrado siete grupos de estos, los cuales se distinguen por:

- 1.- La hexosamina (N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina) y el ácido urónico (Ac. D-Idurónico,

Ac. Glucurónico) que lo constituyen.

2.- Por el tipo de enlace entre estos disacáridos.

3.- Por la longitud de la cadena que forman.

4.- Por el número y la localización de los grupos sulfato que contiene. (16). (Tabla 1).

Entre los GAGs más conocidos se encuentran la Heparina, el Ac. Hialurónico, el Condroitín Sulfato tipo A y C, el Dermatán Sulfato, el Heparán Sulfato y Keratán Sulfato entre otros (17,18). (Figura 1-A). Los GAGs se encuentran en los tejidos y fluidos de todos los animales, principalmente en el espacio extracelular, pero son sintetizados en el interior de la célula, están en forma de proteoglicanos y con excepción del Ac. Hialurónico, están sulfatados. (18).

Experimentos histoquímicos realizados revelan la presencia de GAGs en el líquido folicular (19), el cual esta compuesto de exudados del folículo y de las secreciones del plasma. (19). Los Condroitines Sulfato, Ac. hialurónico y Heparán sulfato son los GAGs predominantes en el líquido folicular de los mamíferos, (20), poseen una masa molecular que fluctúa entre 7.5×10^5 y 2.5×10^6 Daltons. (21,22).

Las GAGs son secretados por células de la granulosa en respuesta a la estimulación del folículo por la

hormona FSH. (23). La concentración de GAGs en el Líquido Folículo depende de la cantidad secretada de FSH, y su inhibición, es provocada por la LH y Progesterona, describiendo de esta manera un probable efecto regulador sobre los GAGs (24,25,26). (Figura 2).

Por otra parte se puede decir que mientras la ovulación se aproxima, la presión del folículo se incrementa, debido en parte a la presencia de los GAGs para facilitar la ruptura del mismo y de esta forma permitir la salida del contenido folículo (27). Así, se podría decir que las hormonas sexuales influyen en el metabolismo de los GAGs (Figura 2).

También se han encontrado los GAGs en los líquidos de desecho del metabolismo, tales como la orina. En esta se han caracterizado el condroitín sulfato tipos A y C, dermatán sulfato, heparán sulfato, y en mucho menor proporción keratán sulfato y Ac. hialurónico (28).

Posiblemente los GAGs urinarios están involucrados en el fenómeno del ciclo menstrual y la ovulación, ya que de alguna forma están relacionados con los procesos de reproducción, por lo que se considera de mucha importancia evaluar la concentración de glicosaminoglicanos urinarios durante todo el ciclo menstrual, así como la caracterización de los mismos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Investigar los niveles de Glicosaminoglicanos urinarios durante todo el ciclo menstrual y correlacionarlos con el probable día de la ovulación y en base a ésto ver la posibilidad de encontrar un método indirecto que pueda predecir dicho fenómeno.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.1. Cuantificar la concentración de Glicosaminoglicanos en orina durante todo el ciclo menstrual, así como los parámetros de Ac. Urónico y Hexosaminas.
- 1.2. Caracterizar los Glicosaminoglicanos urinarios durante todo el ciclo menstrual.
- 1.3. Establecer la posible relación existente entre concentración de Glicosaminoglicanos y el día de la ovulación.

MATERIAL Y METODOS

A las donadoras de quienes se obtuvieron las muestras para el estudio, se les abrió un expediente que contenía la siguiente información: Edad, Menarca, Fecha de última menstruación, Longitud del ciclo, Número de ciclos y Temperatura Basal Corporal (TBC) diaria.

El estudio se realizó en muestras de orina de 24 ciclos menstruales obtenidas de 8 voluntarias en edad reproductiva, clínicamente sanas y sin tratamiento hormonal previo. La edad de las donadoras fluctuó entre los 22 y 36 años. Las muestras incluidas al estudio fueron recolectadas de la primera orina del día.

Las concentraciones de Glicosaminoglicanos (GAGs), Acido Urónico (AU) y Hexosaminas (Hexo), se determinaron diariamente a través del ciclo menstrual. Para la determinación de Progesterona se obtuvo una muestra sanguínea de cada donadora entre los días del ciclo 19 y 27 y la evaluación de LH se hizo en seis muestras de sangre obtenidas en el período comprendido entre los días 12 y 17 de cada ciclo.

Todas las muestras obtenidas tanto de orina como de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm y el sobrenadante así obtenido fue congelado y almacenado a -20°C , sin ningún conservador hasta su utilización.

Los métodos para la cuantificación de las diferentes entidades químicas se describen a continuación.

GLICOSAMINOGLICANOS

a) EQUIPO.

- 1.- Espectrofotómetro ZEISS MOD. PMQ3.
- 2.- Vortex SUPER MIXER.
- 3.- Centrífuga DAMON/IEC.
- 4.- Potenciómetro METTROMHERSIAU MOD. E-388.

b) REACTIVOS.

1.- Curva Estándar de GAGs.

Pesar 0.020 g de Condroitín Sulfato mezclar, disolver y aforar a 20 ml con agua desionizada.

De esta solución tomar volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5 ml, aforar cada uno de ellos a 10 ml con agua desionizada, para tener la concentración final de 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g}/0.1$ ml.

2.- Solución amortiguadora de Acetato de Sodio 0.05 M con Cloruro de Magnesio 0.05 M.

Pesar 6.804 g de Acetato de Sodio, 10.166 de Cloruro de Magnesio, disolver y aforar en 1000 ml con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.8.

3.- Solución de Azul de Alciano 8GX al 0.05 %. (w/v).

Pesar 0.025 g de Azul de Alciano 8GX y disolver en 50 ml de amortiguador de Acetato de Sodio 0.05 M con Cloruro de Magnesio 0.05 M.

c) METODO.

FUNDAMENTO.

Este método esta basado en la formación de un complejo entre el Azul de Alciano y los Glicosaminoglicanos el cual es proporcional a la concentración de los GAGs.

d) PROCEDIMIENTO.

- 1.- Tomar alicuota de 0.2 ml de las diferentes concentraciones de la curva estándar y de las muestras de orina a determinar.
- 2.- Adicionar 2.4 ml de Azul de Alciano 8GX, agitar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 3.- Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm.
- 4.- Trazar la curva estándar y calcular la concentración de las muestras problema.

La Solución de Azul de Alciano 8GX, se prepara al instante.

GOLD EW. (29).

ACIDO URONICO

a) EQUIPO.

- 1.- Espectrofotómetro ZEISS MOD-PMQ3.
- 2.- Baño maría ajustado a 92 °C DUBNOFF METABOLIC,
SHAKING INCUBATOR.
- 3.- Vortex SUPER MIXER.

b) REACTIVOS

1.- Curva Estándar de Acido Urónico.

Pesar 0.01 g de Acido Glucurónico, disolver y aforar en 10 ml de agua desionizada.

De esta solución tomar los volúmenes de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml y aforar cada uno a 10 ml con agua desionizada, para tener la concentración final de 5, 10, 15, 20, 25 µg/0.1 ml.

2.- Solución de Carbazol al 0.1 % en Etanol. (w/v).

Pesar 0.01 g de Carbazol, disolver y aforar a 10 ml con Etanol absoluto.

3.- Ac. Sulfúrico con Tetraborato de Sodio al 0.25 M.

Pesar 95.3425 g de Tetraborato de Sodio, disolver y aforar en 1000 ml de Ac. Sulfúrico Q.P.

c) METODO.

FUNDAMENTO.

Este método esta basado en la formación de un cromóforo de tipo furfural entre el carbazol y el Ac. Urónico en condiciones ácidas, produciendo un color rosa el cual es proporcional a la concentración del Ac. Urónico.

d) PROCEDIMIENTO.

- 1.- Tomar alicuota de 0.1 ml de las diferentes concentraciones de la curva estándar y de las muestras a determinar.
- 2.- Añadir 0.4 ml de agua desionizada.
- 3.- Adicionar 0.1 ml de Carbazol, agitar.
- 4.- Enfriar en hielo por lo menos 5 minutos.
- 5.- Agregar 3 ml de Ac. Sulfúrico, agitar.
- 6.- Incubar en baño maría a 92 °C durante 20 minutos.
- 7.- Enfriar a temperatura ambiente y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm.
- 8.- Trazar la curva estándar y calcular la concentración de las muestras problema.

Bitter T. (30).

HEXOSAMINAS

a) EQUIPO.

- 1.- Espectrofotómetro ZEISS MOD-PMQ3.
- 2.- Baño maría ajustado a 37 °C y a 110 °C,
DUBNOFF METABOLIC SHAKING INCUBATOR.
- 3.- Vortex SUPER MIXER.

b) REACTIVOS

1.- Curva Estándar de Hexosaminas.

Pesar 0.010 g de N-Acetil-D-Glucosamina, disolver y aforar en 10 ml con agua desionizada.

De esta solución tomar los volúmenes de 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 ml y aforar cada una a 10 ml con agua desionizada, para tener la concentración final de 2, 4, 6, 8, 10 µg/0.05 ml.

2.- Solución de Ac. Clorhídrico 0.67 M.

Medir 5.5 ml de Ac. Clorhídrico al 37 % con densidad de 1.19 g/ml y aforar en 100 ml con agua desionizada.

3.- Solución de Nitrito de Sodio al 2.5 %. (w/v).

Pesar 2.5 g de Nitrito de Sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua desionizada.

4.- Solución de Sulfamato de Amonio al 12.5 %. (w/v).

Pesar 12.5 g de Sulfamato de Amonio, disolver y aforar en 100 ml con agua desionizada.

5.- Solución de Clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolona (MBTH) al 0.25 %. (w/v)

Pesar 0.0125 g de MBTH, disolver y aforar en 5 ml con agua desionizada.

7.- Solución de Cloruro Férrico al 0.5 %. (w/v).

Pesar 0.415 g de Cloruro Férrico, disolver y aforar a 50 ml con agua desionizada.

*Las solucines de MBTH y Cloruro Férrico caducan después de 24 Horas.

c) METODO

FUNDAMENTO

Este método esta basado en que las 2,5 anhidrohexosaminas, producidas por la desaminación de las hexosaminas, con Nitrito de Sodio reaccionan con el Clorhidrato del 3 metil-2-benzotiazolona, en condiciones ligeramente ácidas, produciendo un color azul intenso el cual es proporcional al contenido de Hexosaminas.

d) PROCEDIMIENTO.

- 1.- Tomar alicuota de 0.1 ml de cada una de las diferentes soluciones de la curva estándar y de las muestras a determinar.
- 2.- A cada tubo se le adiciona 0.3 ml de Ac. clorhídrico, agitar e incubar a 110 °C por espacio de dos horas.
- 3.- Enfriar y agregar 0.8 ml de Nitrito de Sodio, agitar e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 4.- Añadir 0.4 ml de Sulfamato de Amonio, agitar e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5.- Adicionar 0.4 ml de MBTH, agitar e incubar a 37 °C durante 30 minutos.

- 6.- Agregar 0.4 ml de Cloruro Férrico, agitar e incubar a 37 °C durante 5 minutos.
- 7.- Enfriar y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm.
- 8.- Trazar la curva estándar y calcular la concentración de las muestras problema.

Smith RL (31).

EXTRACCION DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS

a) EQUIPO.

- 1.- Centrífuga DAMON/IEC.
- 2.- Vortex SUPER MIXER.

b) REACTIVOS.

- 1.- Cloruro de Cetil Piridinium (CPC) al 5 %. (w/v).
Pesar 5 g de CPC, disolver y aforar en 100 ml con agua desionizada.
- 2.- n Propanol al 60 %. (v/v).
Medir 6 ml de n-Propanol, mezclar y aforar en 10 ml con agua desionizada.
- 3.- Acetato de Sodio al 0.75 % en Etanol. (w/v).
Pesar 0.75 g de Acetato de Sodio, disolver y aforar en 100 ml con etanol.
- 4.- Eter Etilico Anhidro.

c) METODO.

FUNDAMENTO.

Este método esta basado en la precipitación de las GAGs con un surfactante catiónico (CPC).

d) PROCEDIMIENTO.

- 1.- Tomar 4 ml de muestra de orina.
- 2.- Añadir 1 ml de CPC, agitar e incubar durante 18 hr.
- 3.- Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
- 4.- Agregar 1 ml de agua desionizada y agitar vigorosamente.
- 5.- Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
- 6.- Disolver en 0.2 ml de n Propanol.
- 7.- Adicionar 1 ml de Acetato de Sodio, agitar e incubar a -20°C por 18 hrs.
- 8.- Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
- 9.- Adicionar Eter Etilico Anhidro, agitar y centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos. Secar el precipitado en el vacio.
- 10.- Disolver los GAGs en 0.1 ml de agua desionizada.

Kettelhut BV.(32).

ELECTROFORESIS

a) EQUIPO.

- 1.- Equipo de Electroforésis BECKMAN.
- 2.- Membranas de Poliacetato de Celulosa SEPRAPORE III.
- 3.- Potenciómetro METTROMHERSIAU MOD. E-388.

b) REACTIVOS.

- 1.- Solución amortiguadora de Acetato de Bario 0.1 M.
Pesar 7.6635 g de Acetato de Bario, disolver y aforar a 300 ml con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.8
- 2.- Solución amortiguadora de Acetato de Sodio 0.05 M. con Cloruro de Magnesio 0.05 M.
Pesar 6.804 g de Acetato de Sodio, 10.166 g de Cloruro de Magnesio, disolver y aforar en 1000 ml con agua desionizada. Ajustar el pH a 5.8.
- 3.- Solución de Azul de Alciano 86X al 0.25 % (w/v).
Pesar 0.125 g de Azul de Alciano 86X, disolver y aforar en 50 ml de amortiguador.
- 4.- Soluciones estándares de: Condroitín Sulfato A, Condroitín Sulfato C, Dermatan Sulfato, Heparán Sulfato, Keratán Sulfato, Heparina y Ac. Hialurónico.
Pesar 0.001 g de cada uno de los estándares y disolverlo en 1 ml con agua desionizada.

c) METODO.

FUNDAMENTO.

Este método se basa en el movimiento de las moléculas, de los distintos tipos de GAGs, sobre un campo eléctrico, desplazándose hacia el electrodo de carga opuesta. Esto es debido a las propiedades eléctricas de las moléculas, logrando así su separación y caracterización.

d) PROCEDIMIENTO.

- 1.- Humedecer la Membrana en el Amortiguador de Acetato de Sodio.
- 2.- Colocar la Membrana en la cámara de electroforesis que contiene el amortiguador de Acetato de Bario.
- 3.- Aplicar 2 μ l de cada uno de los estándares y 4 μ l de las muestras a determinar.
- 4.- Aplicar una intensidad de corriente de 10 mA durante 3 horas.
- 5.- Se suspende el suministro de corriente y se procede a tefir la membrana con la solución de Azul de Alciano por espacio de una hora.
- 6.- Lavar la membrana con una solución que contiene amortiguador de Acetato de Sodio-Etanol 1:1.

Wessler E. (33).

RESULTADOS

Las figuras 3,4,5 muestran la correlación existente entre la concentración de Glicosaminoglicanos, Ac. Urónico, Hexosaminas y la Densidad óptica, dando como resultado una relación lineal entre las variables. Las curvas estándar así obtenidas con todos los criterios de validación de los tres métodos mostrados en la Tabla 2, sirvieron para estudiar los niveles urinarios de los GAGs, AU y Hexo.

Todos los datos obtenidos están expresados con respecto al día de la ovulación (DIA CERO) el cual fué validado con la Temperatura Basal Corporal (TBC) y la determinación de LH y Progesterona Plasmáticas. Los niveles de máxima actividad de LH Plasmática, alcanzaron un valor promedio de 180 ± 13.40 mUI/ml de plasma correspondiendo al día cero del ciclo (Figura 6). La longitud de cada ciclo, los valores individuales de Progesterona Plasmática, así como el día del ciclo en que se hizo la determinación hormonal se muestran en la Tabla 3 y en donde se observa que los niveles del esteroide son superiores a 5 Ng/ml de plasma, lo que confirma que los ciclos son ovulatorios.

En la Figura 6 se puede observar la variación ciclica de la concentración de los GAGs urinarios, de los 24 ciclos menstruales estudiados. También podemos ver el valor

promedio de los GAGs contenidos en el día cero es de 106.74 ± 46.16 $\mu\text{g/ml}$ de orina y corresponde a la concentración más elevada a lo largo de todo el ciclo, así como en las fases folicular y secretora, las concentraciones promedio de los GAGs fué de 68.50 ± 2.03 $\mu\text{g/ml}$ de orina y 75.41 ± 44.00 $\mu\text{g/ml}$ de orina (Tabla 4).

Cuando el Ac. Urónico y Hexosaminas fueron estudiadas en los GAGs extraídos de la orina se observó un patrón similar al de los GAGs (Figura 7) y su magnitud se muestra en la (Tabla 4).

En todos los casos, el patrón de GAGs, AU y Hexo se estudió en las mismas mujeres hasta en tres ciclos sucesivos. Es útil hacer notar que en estos casos el patrón característico tiende a mantenerse en los ciclos sucesivos.

Con objeto de realizar los ensayos con mayor prontitud y para ver si el mismo comportamiento era mantenido, el Ac. Urónico y Hexosaminas fueron determinadas directamente en la orina, obteniéndose exactamente el mismo patrón, alcanzando en ambos parámetros un valor máximo en el día de la ovulación y siendo menor en las fases proliferativas y secretora Tabla 5.

La interrogante de que GAGs están presentes en la orina

durante todo el ciclo menstrual, fué esclarecido cuando los GAGs fuerón extraídos de las muestras de orina con CPC y aplicados en membranas de Acetato de Celulosa para lograr con ello su caracterización por medio de una electroforesis. En éstos experimentos el patrón electroforético obtenido corresponde a la imagen mostrada en la figura 8. En (A) se muestran los estandares que corresponden al Ac. Hialurónico, Keratán Sulfato y Condroitín Sulfato A; (B) Heparán Sulfato, Dermatán Sulfato y Condroitín Sulfato C; (F) De la Heparina. En las muestras de orina pertenecientes a los días del ciclo 1, 0, -1 (C,D,E) se distingue la presencia del Condroitín Sulfato A y C, Heparán Sulfato, Keratán Sulfato y en menor proporción el Dermatán Sulfato.

DISCUSSION

El estudio se realizó en muestras de orina por ser excretados en ella los GAGs en forma libre, es decir no están unidos a proteínas por lo que no es necesario utilizar técnicas específicas para su purificación.

Los resultados obtenidos de las curvas estándares de los GAGs, Ac. Urónico y Hexosaminas, indica la existencia de una linealidad, puesto que así lo muestra el coeficiente de correlación al aproximarse a la unidad, (Figuras 3, 4, 5) y junto con los criterios de validación de los tres métodos empleados, se observa un panorama general de la confiabilidad de dichos métodos (Tabla 2). Estos criterios revelan la veracidad de los resultados haciendo notar que estos son reproducibles y confiables.

Debido a la variación en la longitud de los ciclos los datos se analizaron con respecto al día de la ovulación, criterio que fue validado por la obtención de la gráfica difásica de TBC y el valor máximo de LH plasmática (180 ± 13.40) mUI/ml), que indicaron el día exacto de la ovulación, además de confirmar que los ciclos son ovulatorios por tener los valores superiores a 5 Ng/ml de Progesterona plasmática.

Las concentraciones de los GAGs urinarios en el ciclo menstrual, describen claramente un perfil característico

(Figura 6) en donde el valor máximo coincide con el día de la ovulación, posiblemente esto se deba al efecto regulador que ejercen las hormonas sobre los GAGs, (24, 25, 26), Las observaciones validadas indirectamente por el hecho que en el desarrollo de los folículos, la producción de GAGs es incrementada bajo la influencia de FSH y la misma relación ocurre en el útero cuando el efecto comunmente conocido como "estrogen like" incluye un incremento significativo en la producción de GAGs (34). Por lo tanto un paso hacia la clarificación de éste efecto hormonal debe ser la correlación de los niveles hormonales circulantes con el contenido de GAGs urinarios.

Comparando los niveles urinarios de GAGs, tanto de las fases folicular como secretora con las concentraciones en el día de la ovulación observamos que existe diferencias significativas, no así cuando son comparadas las dos fases (Tabla 4).

Por otro lado los valores encontrados de Ac. Urónico y Hexosaminas de los GAGs extraídos de la orina, así como, las determinaciones hechas directamente en ella describen un perfil similar al de los GAGs (Tabla 4,5). Como se puede ver con claridad, la concentración de Ac. Urónico y Hexosaminas encontrada en la orina es más

elevada que en los GAGs extraídos (Figura 7), este hecho es sin lugar a dudas digno de ser considerado, debido a que en el fluido se encuentran esteroides y otros compuestos en forma de glucuronatos y hexosaminas procedentes de varias y diferentes fuentes.

La caracterización de los GAGs hecha por el método electroforético se muestra en la figura 8. En ella, se observa con claridad, los diferentes polisacáridos existentes en la orina durante el ciclo menstrual, destacando la presencia de los condroitines Sulfato C y A, Keratán Sulfato, Dermatán Sulfato y Heparán Sulfato; así como su concentración en los días 0, - 1 y + 1. Cabe señalar, que la mayor concentración observada en la electroforésis corresponde al Condroitín Sulfato C, seguida por el Condroitín Sulfato A, Heparán Sulfato, Keratán Sulfato y una mínima concentración de Dermatán Sulfato, apenas perceptible. Este hecho correlaciona con el descrito en el perfil de los GAGs (Figura 6) puesto que la mayor concentración de estos compuestos corresponde al día de la ovulación (día cero).

CONCLUSIONES

- 1.- El perfil de los GAGs en orina describe un patrón característico encontrando un valor máximo de $196.74 \pm 46.16 \mu\text{g/ml}$ en el día de la ovulación.
- 2.- Al comparar la concentración de los GAGs del día de la ovulación con los encontrados en las fases folicular y secretora, se aprécia una diferencia significativa en todos los casos estudiados.
- 3.- Los niveles de GAGs urinarios en mujeres normales son de $70.04 \pm 43.96 \mu\text{g/ml}$ de orina.
- 4.- Los niveles de Ac. Urónico y Hexosaminas valorados en la orina y en los GAGs extraídos de la misma, describen un patrón similar al de los GAGs urinarios.
- 5.- Con el método electroforético empleado para la caracterización de los GAGs urinarios, se logró identificar con claridad el tipo de polisacáridos existente.
- 6.- Los GAGs urinarios encontrados en todo el ciclo menstrual fuerón; Condroitin Sulfato A y C, Dermatán Sulfato, Heparán Sulfato y Keratán Sulfato.
- 7.- De acuerdo a nuestros resultados la Caracterización y Cuantificación de los GAGs en orina se puede definir como un criterio confiable y preciso para estudiar el ciclo menstrual.

T A B L A S

TABLA I.

CARACTERISTICAS GENERALES DE GLICOSAMINGLICANOS.

GLICOSAMI- GLICANOS.	PESO MOLECULAR	DISACARIDO REPETITIVO	No. SULFATOS POR DISACARIDO	DISTRIBUCION TISULAR
Acido Hialurónico	4000 a 6 8 x 10	(D-glucurónico -N-acetil glucosamina.)	0	Tejidos embrionarios mayor contenido que adultos, car- tilago, piel, líquido si- vial.
Condroitín Sulfato	5000 a 50,000	(D-glucurónico -N-acetil galactosamina)n	0.2-2.3	Cartilago, córnea, hueso piel, arterias.
Dermatán Sulfato	15,000 a 40,000	(D-glucurónico ó L-idurónico- N-acetil galactosamina)n	1.0-2.0	Piel, vasos sanguíneos, válvulas cardiacas.
Heparán Sulfato	5000 a 12,000	(D-glucurónico ó L-idurónico- N-acetil glucosamina)n	0.2-3.0	Pulmón, arterias, super- ficie celular.
Heparina	6000 a 25,000	(D-glucurónico ó L-idurónico- N-acetil glucosamina)n	2.0-3.0	Pulmón, hígado, piel.
Keratán Sulfato	4000	(D-galactosa -N-acetil glucosamina)n	0.9-1.8	Cartilago, córnea, discos intercalares.

TABLA 2

CRITERIOS DE VALIDACION

	N	r	a	b	N	SENSIBILIDAD	EXACTITUD	PRECISION
GAGs	20	0.999	0.0024	-0.002	61	96.05 ± 11.4 % < 10 µg	97.6 ± 5.21	96.3 ± 3.3
A.U.	28	0.999	0.018	-0.0002	61	96.71 ± 4.58 % < 5 µg	97.8 ± 7.89	97.8 ± 2.74
HEXO	37	0.998	0.097	0.0192	61	97.75 ± 2.59 % < 2 µg	98.5 ± 6.91	99.9 ± 0.03

TABLA 3

PACIENTE	EDAD	GTE	TM	LC	P-4
1	29	DIFASICA	25	31	5.99
2	35	DIFASICA	25	29	7.64
3	25	DIFASICA	24	29	8.35
4	36	DIFASICA	24	26	10.70
5	22	DIFASICA	24	26	11.41
6	26	DIFASICA	25	29	16.35
7	24	DIFASICA	22	25	9.76
8	27	DIFASICA	24	28	15.88

27.88 10.76
 ± 2.03 ± 3.73

* P-4 (MEDIA DE TRES VALORES).

* TM (DIA DE MUESTREO).

* LC (LONGITUD DEL CICLO).

TABLA 4

VALORES DE LOS GAGs, AC. URONICO Y HEXOSAMINAS EXTRAIDOS, EN LAS FASE FOLICULAR, FASE SECRETORA Y EN LA OVULACION.

	FASE FOLICULAR N= 169	OVULACION N= 24	FASE SECRETORA N= 229
GAGs	75.41 ± 44.07	106.74 ± 46.15	68.50 ± 42.02
HEXO.	25.09 ± 15.48	39.05 ± 17.14	27.59 ± 16.25
A.U.	24.21 ± 15.22	37.63 ± 17.29	26.57 ± 16.07

TABLA 5

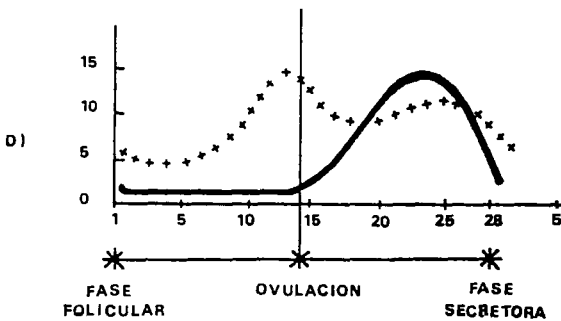
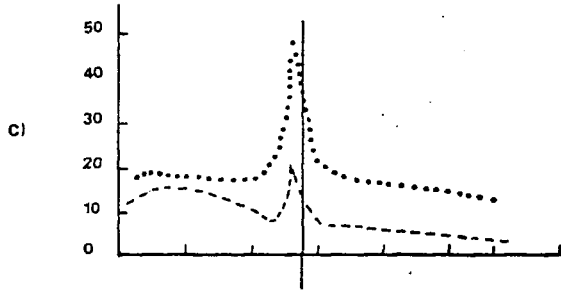
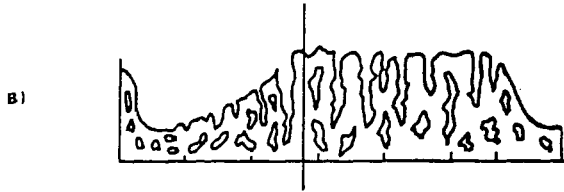
VALORES DE LOS GAGs, AC. URÓNICO Y HEXOSAMINAS EN LAS
 FASE FOLICULAR, FASE SECRETORA Y EN LA OVULACION
 DIRECTOS DE LA ORINA

	FASE FOLICULAR N= 169	OVULACION N= 24	FASE SECRETORA N= 229
GAGs	75.41 ± 44.97	106.74 ± 46.15	68.50 ± 42.02
HEXO.	468.04 ± 259.68	636.87 ± 169.99	483.02 ± 275.16
A.U.	700.26 ± 411.44	1043.42 ± 333.85	716.16 ± 423.13

FIGURAS

FIGURA 1

CARACTERISTICAS GENERALES DEL CICLO MENSTRUAL



A) CAMBIOS MORFOLÓGICOS DEL FOLICULO.

B) PERFIL DEL ENDOMETRIO.

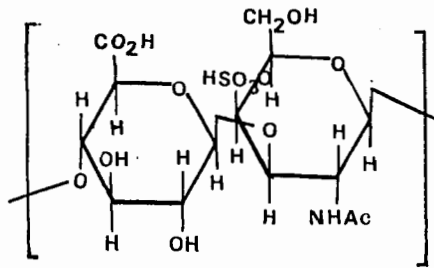
C) PERFIL DE GONADOTROPINAS.

..... LH; FSH (mIU).

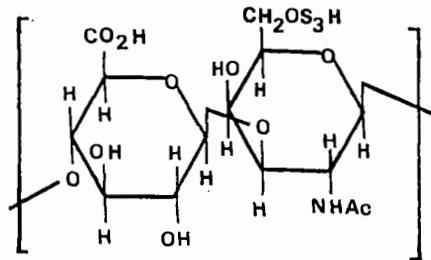
D) PERFIL DE ESTEROIDES.

+++ ESTROGENOS (pg/ml) ——— PROGESTERONA (ng/ml).

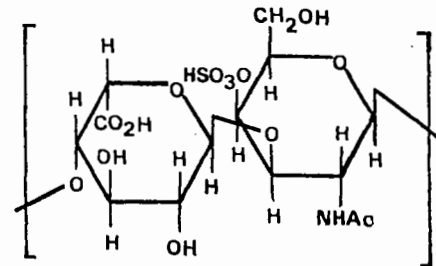
GLICOSAMINOGLICANOS



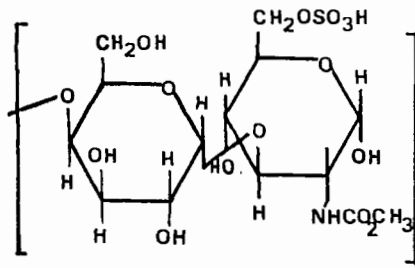
CONDROITIN SULFATO-A



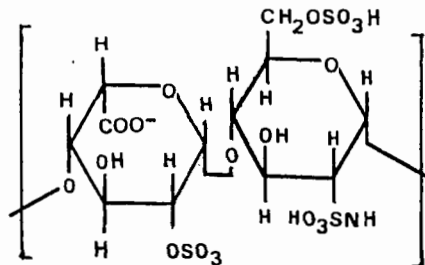
CONDROITIN SULFATO-C



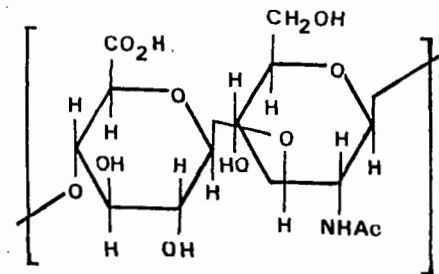
DERMATAN SULFATO



KERATAN SULFATO



HEPARINA



ACIDO HIALURONICO.

FIGURA 2

EFFECTO REGULADOR SOBRE LOS GAG_s EN EL LIQUIDO FOLICULAR

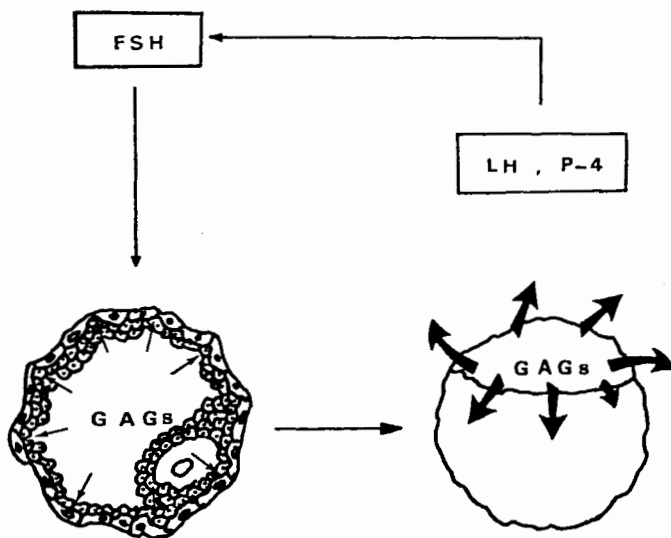


FIGURA 3

CURVA ESTANDAR GLICOSAMINOGLICANOS

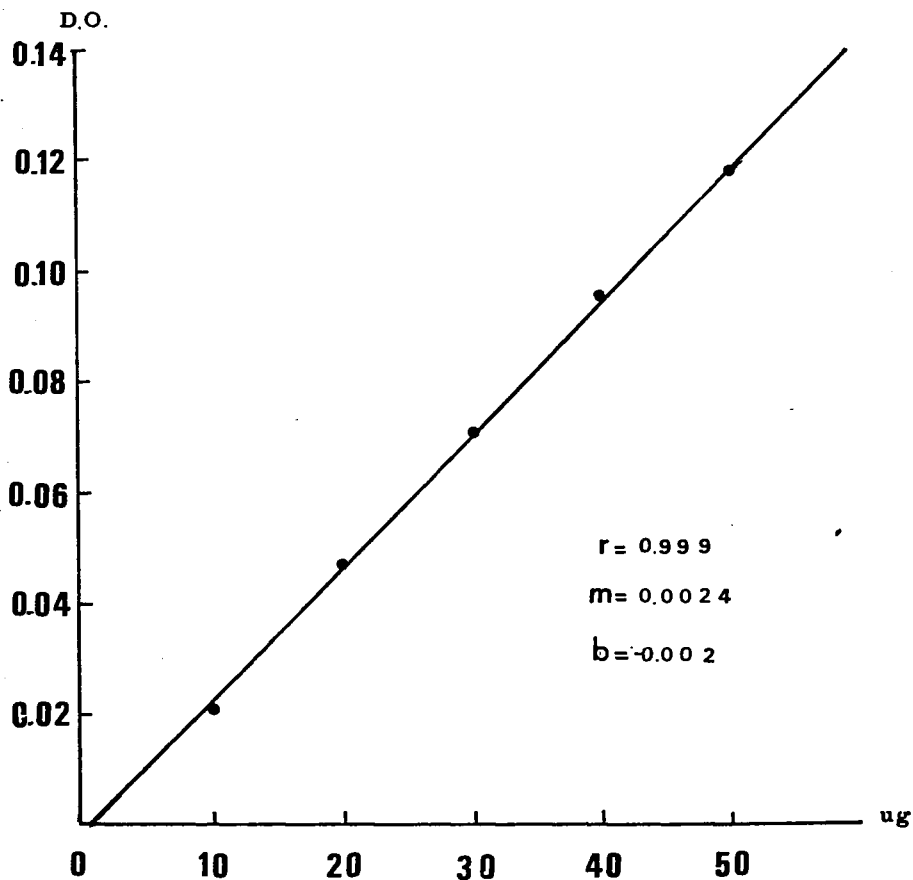


FIGURA 4

CURVA ESTANDAR ACIDO URONICO

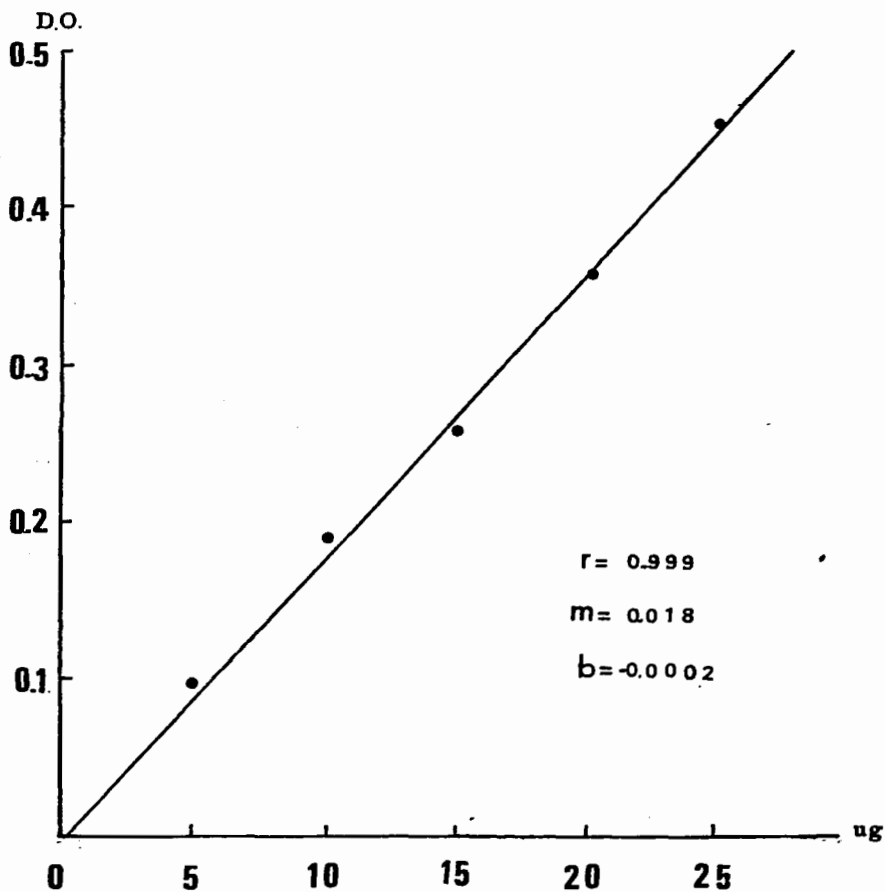


FIGURA 5

CURVA ESTANDAR HEXOSAMINAS

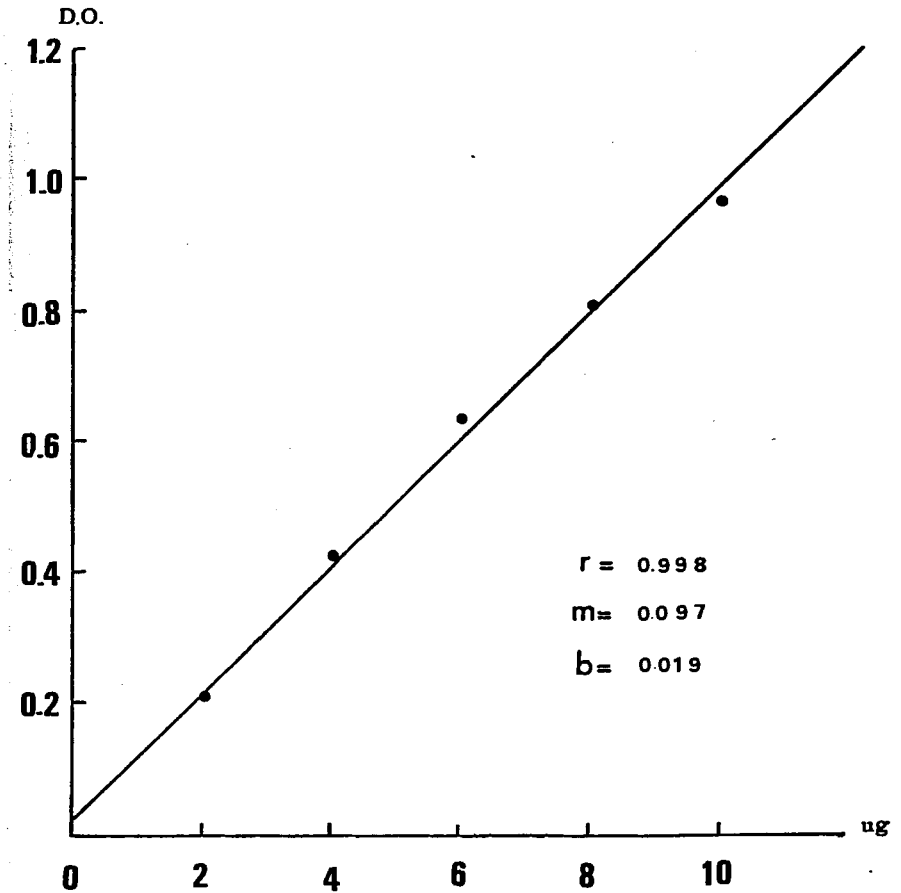
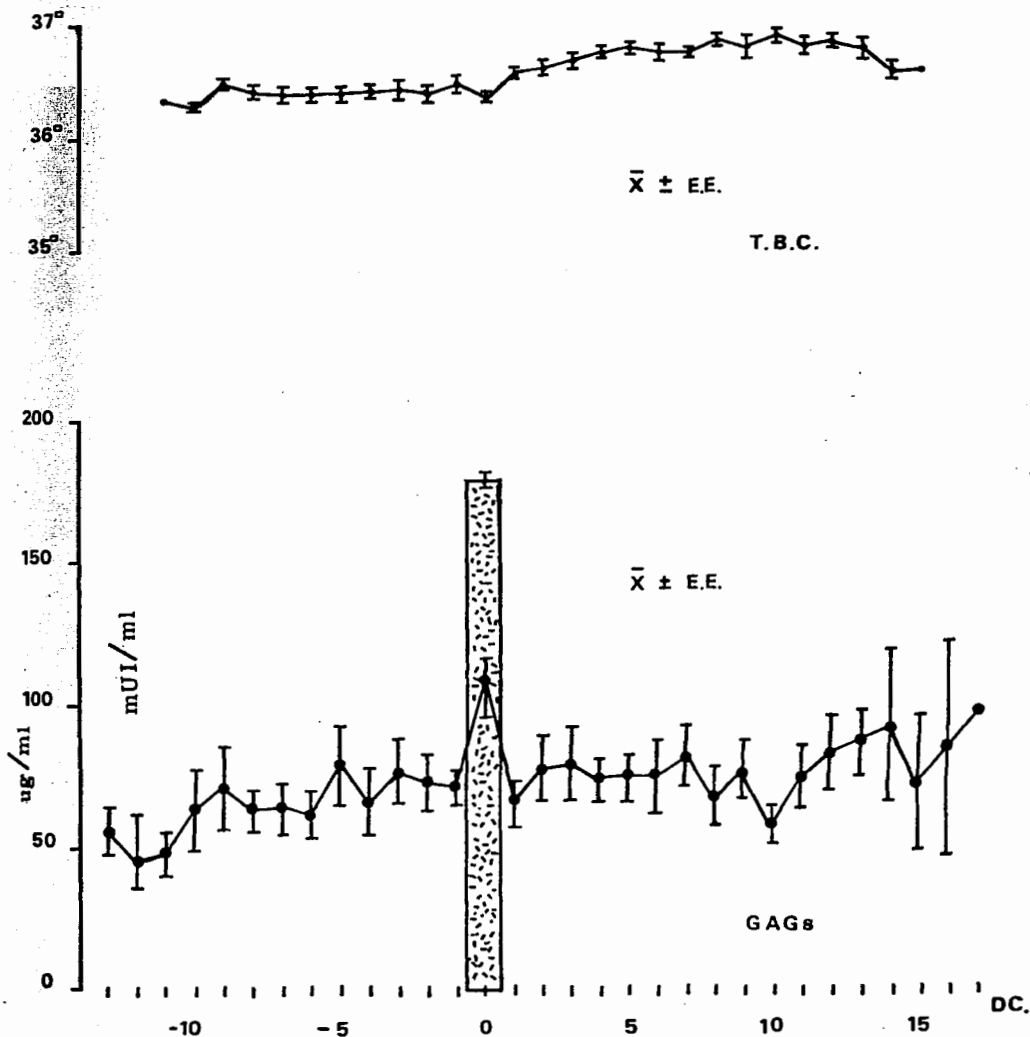
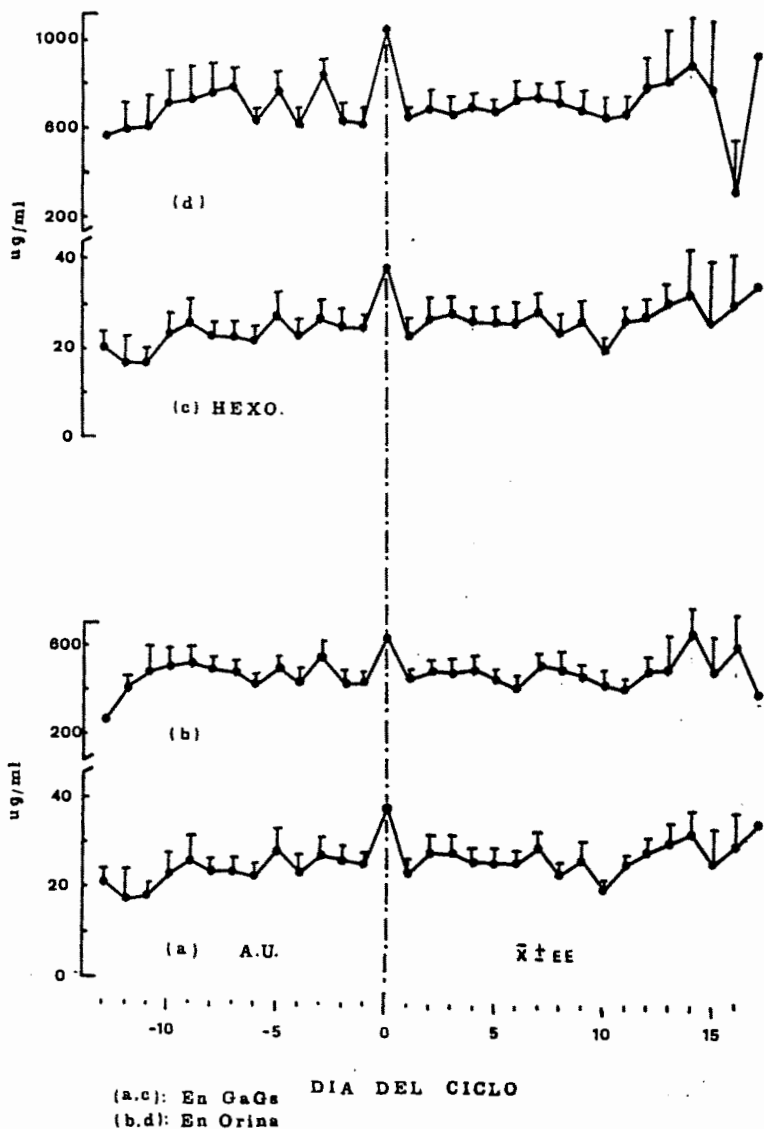


FIGURA 6

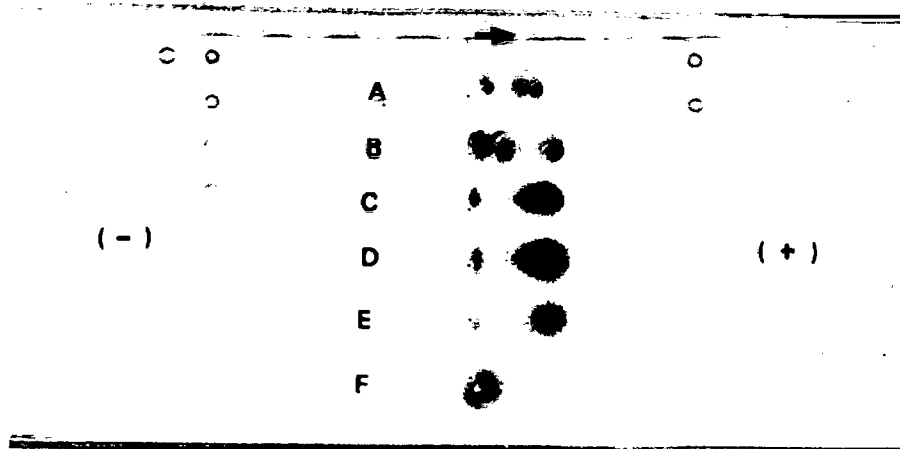
PERFIL DE LOS GAGs, LH Y T.B.C.



PERFIL DEL AC. URONICO Y HEXOSAMINAS



PATRON ELECTROFORETICO



A) Estandares de Ac. Hialurónico, Keratán Sulfato y Condroitín Sulfato tipo A.

B) Estandares de Heparán Sulfato, Dermatán Sulfato y Condroitín Sulfato tipo C.

C) GAGs urinarios correspondientes al día 1 del ciclo.

D) GAGs urinarios correspondientes al día 0 del ciclo.

E) GAGs Urinarios correspondientes al día -1 del ciclo.

F) Estandar de Heparina.

* Los GAGs empleados como estandares se nombran de

izquierda a derecha

G L O S A R I O

- AMENORREA. Ausencia de la menstruación.
- AMINOAZUCAR. Azúcar en el cual un grupo oxidrilo (OH) ha sido remplazado por un grupo amino (NH).
- CELULAS DE LA GRANULOSA. Son un tipo de células específicas del ovario, con una función única, cada folículo primario contiene una célula germinal rodeada por células granulosas.
- CETACEOS. Orden que contiene a los únicos mamíferos marinos completos: Ballenas, delfines marsopas etc.
- CICLO ANOVULATORIO. Corresponde al ciclo menstrual en el cual no ocurre ovulación.
- CUERPO LUTEO. Estructura ovárica que secreta estrógenos y progesterona que se forma temporalmente a partir de la célula remanentes del folículo después de la ovulación.
- DISACARIDO. Azúcar cuyas moléculas están constituidas por dos monosacáridos, se encuentran unidos por enlaces glicosídicos.
- ENDOMETRIO. Membrana mucosa glandular que reviste la superficie interna del útero de los mamíferos.

- ERROR EXPERIMENTAL.** La variación que es de esperar al repetir el experimento excluyendo errores en el diseño.
- ESTEROIDES.** Grupo de compuestos de estructura cíclica básica compleja. Son las hormonas sexuales (Progesterona, andrógenos y estrógenos). entre otras.
- EXACTITUD.** Proximidad de una estimación o medición al valor exacto o verdadero.
- FOLICULO.** Vesícula esférica llena de Líquido que se encuentra en el ovario de los mamíferos y donde se desarrolla el óvulo.
- GLICOSAMINOGLICANOS.** Son un grupo heterogéneo de polímeros lineales aniónicos constituidos por secuencias repetitivas de disacáridos formados por un aminoazúcar y un ácido urónico.
- GLUCANO.** Polisacárido constituido por un solo tipo de unidad de azúcar es decir > 95 %. (constituidos por unidades de Glucosa-D).
- GLUCO.** Formas prefijas del griego glykys, dulce; glucógeno. Observa con mucha razón en Latín que gluco-, gluc- son en realidad formas anómalas. Lo correcto sería glico-, glic-,

ya que la transcripción normal en español del fonema griego es i.

GONADA. Órgano de la reproducción de los animales. Produce las células sexuales (gametos) ovarios ó testículos.

GONADOTROPINAS. Hormona del lóbulo anterior de la hipófisis que actúa sobre las gónadas (LH y FSH).

HIDROLISIS. En general, reacción entre un compuesto y agua, particularmente aquellas en que intervienen iones H^+ y OH^- .

HIPOFISIS. Glándula endocrina del cerebro de los vertebrados, situada debajo de talámo y detrás del quiasma óptico.

HIPOTALAMO. Región del encéfalo de los vertebrados que esta justo debajo de los hemisferios cerebrales, es responsable de la integración de muchos patrones de comportamiento básicos que entrañan correlación de funciones neurales y endocrinas.

HORMONA. Sustancia que se desplaza desde un tejido especial en donde se ha liberado, para ser transportada por la corriente sanguínea

hasta células distantes que responden a la hormona y en donde ésta ejerce su efecto característico.

- LAGOMORFOS. (Lagomorpha) Orden de mamíferos herbívoros que incluye a las liebres y conejos.
- MENARCA. La aparición de la primera hemorragia menstrual.
- MENSTRUACION. Desprendimiento y expulsión del endometrio, junto con gran pérdida de sangre en el fluido menstrual.
- OOCITO. Célula que mediante meiosis origina un óvulo.
- ORINA. Líquido que se elimina a través de la uretra o cloaca. Se produce en los riñones y contiene urea o ácido úrico y numerosas otras sustancias en cantidades pequeñas.
- PLASMA. Componente líquido, transparente e incoloro de la sangre de los vertebrados.
- PRECISION. Una medida del grado en que observaciones repetidas de la misma cosa concuerden entre sí. (Depende de la reproductividad de la medida).
- PROTEOGLICANO. Es la unión covalente de un GAGs con una

proteína (núcleo protéico).

POLIMERO. Es un compuesto de alto peso molecular, formado de varios compuestos más pequeños (Unidades monoméricas).

ROEDOR. Orden de mamíferos más grande que incluye ratas, ratones, ardillas, castores. etc.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Frazer, JFD: EL CICLO SEXUAL DE LOS VERTEBRADOS. Editorial Labor S.A. Barcelona. (1969). Cap. 7. El ciclo sexual en mamíferos.
- 2.- Speroff, L; Glass, RH; Kase, NG: ENDOCRINOLOGIA GINECOLOGICA E INFERTILIDAD. Version española del Dr. Cases A.J. Ediciones Toray S.A. Barcelona. Cap.1 Regulación del ciclo menstrual, (1978).
- 3.- Conn, PM; Hsueh, AJ; Crowley WF: GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE: MOLECULAR AND CELL BIOLOGY, PHYSIOLOGY, AND CLINICAL APPLICATIONS. Federation Proceedings. 43, 2351-2361, (1984).
- 4.- Curtis, H: BIOLOGIA. Editorial Medica Paramericana S.A. Nueva York. (1983). Cap.44. La continuidad de la vida I: Reproducción.
- 5.- Moghissi, K: PREDICTION AND DETERMINATION OF OVULATION. Fertil Steril. 34, 89, (1980).
- 6.- Yussman, MA; Taymor, ML; et al: SERUM LEVELS OF FOLICLE STIMULATING HORMONE, LUTEINIZING HORMONE AND PLASMA PROGESTINS CORRELATED WITH HUMAN OVULATION. Fertil Steril. 21, 119, (1970).
- 7.- Samarajecwa, P; Cooley, G; Kellie, AE: THE RADIOIMMUNOSSAY OF PREGNANEDIOL 3 alfa GLUCURONIDO. J. Steroid Biochem. 11, 1155, (1979).
- 8.- Ross, GT; Cargille, CM; et al: PITUITARY AND GONADAL

- HORMONES IN WOMEN DURING SPONTANEOUS AND INDUCED OVULATORY CYCLE. *Recent Prog Horm Res.* 26, 1, (1970).
- 9.- Morris, NM; Underwood, LE; Easterling, W: TEMPORAL RELATIONSHIP BETWEEN BASAL BODY TEMPERATURE NADIR AND LUTEINIZING HORMONE SURGE IN NORMAL WOMEN. *Fertil Steril.* 27, 780, (1976).
- 10.- Hilgers, TW; Bailey, AJ: NATURAL FAMILY PLANNING. II. BASAL BODY TEMPERATURE AND ESTIMATED TIME OF OVULATION. *Obstet Gynecol.* 55, 333, (1980).
- 11.- Lundy, LE; Lee, SG; et al: THE OVULATORY CYCLE. A HISTOLOGIC, THERMAL, STEROID AND GONADOTROPIN CORRELATION. *Obstet Gynecol.* 44, 14, (1974).
- 12.-Riley, GM; Dostas, E; Gill, B: USE OF SERIAL VAGINAL SEMEARS IN DETECTING TIME OF OVULATION. *Fertil Steril.* 6, 86, (1955).
- 13.- Insler, V; Melamed, H; et al: THE CERVICAL SCORE. A SIMPLE SEMIQUANTITATIVE METHOD FOR MONITORING OF THE MENSTRUAL CYCLE. *Int J. Fertil.* 10, 223, (1972).
- 14.- Moghissi, K; Syner, FN; Borin, B: CYCLIC CHANGES OF CERVECAL MUCUS ENZYMES RELATED TO THE TIME OF OVULATION. I ALKALINE PHOSPHATASE. *Am. J. Obstet Gynecol.* 125, 1044, (1976).
- Moghissi, K; Syner, FN; Borin, B: CYCLIC CHANGES OF CERVICAL MUCUS ENZYMES RELATED TO THE TIME OF

- OVULATION. II. AMINOPEPTIDASE AND ESTERASE. *Obstet Gynecol.* 48, 347, (1976).
- 16.- López, RR; Tsutsum, V; Frixione T; TEMAS SELECTOS DE BIOLOGIA CELULAR. Dirección de Comunicación Social / Cosnet. México D.F. (1986) cap.7 La matriz extracelular en los procesos celulares del desarrollo.
- 17.-Bohinski, R; MODERN CONCEPTS IN BIOCHEMISTRY. Second Edition, allyn and Bacon. Inc: Boston, Massachusets, U.S.A. (1976). Cap. 8 Carbohidrates.
- 18.- David, W; Martín, J, MD; et al: BIOQUIMICA DE HARPER. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. Décima edición. México D.F. (1988) Cap. 33, Glicoproteínas, Proteoglicanos, Glicosaminoglicanos.
- 19- RG. Eduwards: LIQUIDO FOLICULAR. *Fertil Steril.* 37 189-219, (1974).
- 20.- Ax, RL; Bellin, ME; Grimek, HJ; PROPERTIES AND REGULATION OF SYNTHESIS OF GLYCOSAMINOGLYCANS BY THE OVARY. In: Toft, DØ; Ryan, RJ (eds.); *Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop.* Champaign, IL: Ovarian Workshops, pp. 451-80. (1985).
- 21.- Yanagishita, M; Rodbard, D; Hascall, VC; ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEOGLYCANS FROM PORCINE OVARIAN FOLLICULAR FLUID. *J Biochem* 254, 911-20.

- (1979).
- 22.- Grimek, HJ; Ax, RL; CHROMATOGRAPHIC COMPARISON OF CHONDROITIN CONTAINING PROTEOGLYCAN FROM SMALL AND LARGE BOVINE OVARIAN, FOLLICLES. *Biochem Biophys Res Com.* 104, 1401-06 (1982).
 - 23.- Lenz, RW; Ax, RL; et al: PROTEOGLYCAN FROM BOVINE FOLLICULAR FLUID ENHANCES AN ACROSOME REACTION IN BOVINE SPERMATOZOE. *Biochem Biophys Res Com.* 106, 1092, (1982).
 - 24.- Lindner, HR; et al: INTRAOVARIN FACTORS IN OVULATION: DETERMINANTS OF FOLLICULAR RESPONSE TO GONADOTROPHINS. *J. Reprod Fertil.* 51, 215, (1977).
 - 25.- Salomon, Y; ADENYLATE CYCLASE IN THE IMMATURE RAT OVARY: INTRODUCTION OF RESPONSIVENESS TO LUTEINIZING HORMONE. *Fed Eur Biol Soc.* 45, 299, (1977).
 - 26.- Salomon, Y; et al: SYNCHRONOUS GENERATION OF OVARIAN HCG BINDING SITES AND LH SENSITIVE ADENYLATE CYCLASE IN IMMATURE RATS FOLLOWING TREATMENT WITH PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3, 163, (1977).
 - 27.- Gabauer, H; Lindner, HR; Amsterdam, A: SYNTHESIS OF HEPARIN-LIKE GLYCOSAMINOGLYCANS IN RAT OVARIAN SLICES. *Biol Reprod.* 18, 350, (1978).

- 28.- Stanbury, JB; Wyngaarden, JB; Fredrickson, DS: THE METABOLIC BASIS OF INHERITED DISEASE. Third Edition. Mc Graw-Hill., U.S.A. (1972) Chapter 49, The Mucopolysaccharidoses.
- 29.- Gold, EW: A SIMPLE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR ESTIMATING GLYCOSAMINOGLYCAN CONCENTRATIONS. Anal Biochem. 99, 183, (1979).
- 30.- Bitter, T; Muir HM: A MODIFIED URONIC ACID CARBAZOL REACTION: Anal Biochem. 4, 330, (1962).
- 31.- Smith, RL; Gilkerson, E: QUANTITATION OF GLYCOSAMINOGLYCAN HEXOSAMINE USING 3-METHYL-2-BENZOTHAZOLENE HYDRAZONE HYDROCHLORIDE. Anal Biochem. 98, 478, (1979).
- 32.- Kettelhut, BV; Metcalfe, DD: QUANTITATION AND CHARACTERIZATION OF URINARY GLYCOSAMINOGLYCANS IN HEALTHY SUBJECTS AND PATIENTS WITH MASTOCYSTOSIS. Clinica Chimica, 171, 29, (1988).
- 33.- Wesster, E: ANALYTICAL AND PREPARATIVE SEPARATION OF ACIDIC GLYCOSAMINOGLYCANS BY ELECTROPHORESIS IN BARIUM ACETATE. Anal Biochem 26, 339, (1968).
- 34.- Moore, PJ; Rosenquist, TH: SOME EFFECTS OF ON INTRAUTERINE DEVICE ON GLUCOSAMINOGLYCANS OF THE HANSTER UTERUS. Fertil. Steril. 32, 120, (1979).
- 35.- Seco, M: DICCIONARIO DE DUDAS Y DIFICULTADES DE LA

LENGUA ESPAÑOLA. Novena edición. Editorial Espasa
Calpa. Madrid (1987).

36.- Daintith, J; Tootill E: DICCIONARIO DE BIOLOGIA.
Editorial Norma. Bogotá Colombia (1983).



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 427/89

SRITA. LAURA REBECA DIAZ CASTAÑOS
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y CUANTIFICACION DE GLICOSA MINOGLICANOS (GAGs) EN ORINA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como-Director de dicha Tesis el Dr. Guillermo Pérez García.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Mayo 4 de 1989
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.

c.c.p. El Dr. Guillermo Pérez García, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

Guadalajara Jal. a 18 de Octubre de 1989

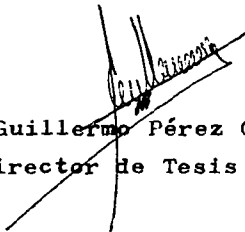
Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cárdenas
Director de la Facultad de Ciencias

P R E S E N T E:

Por medio de este conducto hago de su conocimiento que la pasante de la Licenciatura en Biología LAURA -- REBECA DIAZ CASTAÑOS a concluido el Trabajo de Tesis titulado "CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y CUANTIFICACION DE GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs) EN ORINA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL"; mismo que me fué presentado para su revisión.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la Tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo y no encuentro -- ningun inconveniente para que se imprima, solicitándole -- permita que se realicen los tramites necesarios para su -- exámen correspondiente.

Quedo de usted como Seguro Servidor.


M. en C. Guillermo Pérez García
Director de Tesis