
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



ANALISIS ELECTROFORETICO DE GLICOPROTEINAS EN EL
LIQUIDO FOLICULAR DE CERDO DURANTE LA MADURACION
DEL FOLICULO

MARTIN GERARDO FRANCO CHAVEZ

LICENCIADO EN BIOLOGIA

GUADALAJARA, JALISCO

JULIO 1989

D I R E C T O R D E T E S I S

M. EN C. JUAN MORA GALINDO

A S E S O R E S D E T E S I S

BIOL. NESTOR MANUEL DELGADO PONCE

M. EN C. ROSALINA REYES LUNA

C O N T E N I D O

ANTECEDENTES.

HIPOTESIS.

OBJETIVOS.

MATERIALES Y METODOS.

RESULTADOS.

DISCUSION.

CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

ABREVIATURAS.

FIGURAS Y TABLAS.

CARTA DE ACEPTACION DEL PROYECTO DE TESIS.

CARTA DE VISTO BUENO DEL DIRECTOR DE TESIS.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCION
DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

A G R A D E C I M I E N T O S

Durante la realización de mi tesis me he convertido en deudor de gratitud para todas las personas que me ayudaron de varios modos, de hecho me es imposible incluir una lista de todas ellas, no obstante, las siguientes han contribuido dedicándome gran parte de su tiempo por lo que deseo mencionarlas:

M. en C. JUAN MORA GALINDO.

Quim. ARMANDO CARRANCO LOPEZ.

M. en C. LUIS HUACUJA.

M. en C. ALMA ROSA DEL ANGEL.

M. en C. ESPERANZA DEL CARMEN NUÑEZ DE PONCE.

Debo agregar unas palabras de reconocimiento para el Biol. NESTOR MANUEL DELGADO PONCE y a la M. en C. ROSALINA REYES LUNA, por el estímulo entusiasta que de ambos recibí.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: JOSE DE JESUS Y ANA MARIA

** Por su fuerza de voluntad y nobleza de espíritu **

A MIS HERMANOS:

** Su apoyo y comprensión **

A MIS MAESTROS Y AMIGOS

A ESBEIDE

A JASEMM

A N T E C E D E N T E S

El aparato reproductor femenino en los mamíferos consta de ovarios, oviducto, útero, cuello uterino, vagina y genitales externos (15). El ovario, a diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal; a su vez desarrolla una función exocrina "Liberación del óvulo" y una función endocrina "Esteroidogénesis" (15). La forma y tamaño varía según la especie y la etapa del ciclo estral; en el porcino se asemeja a un racimo de uvas debido a que los folículos sobresalen y los cuerpos lúteos se ocultan en el tejido subyacente (26). El folículo es el compartimiento del ovario que permite efectuar la doble función mencionada. A menudo el desarrollo de los folículos se clasifica de acuerdo a tamaño, número de capas de células de la granulosa, desarrollo de la teca, posición de los óvulos dentro de un cúmulo oífero y la presencia de un antro (15), (Fig. 1).

En los mamíferos el crecimiento y la diferenciación de los folículos se lleva a cabo por medio de procesos selectivos y altamente integrados como se puede ver en las diferentes etapas del desarrollo del folículo. Esta fase de crecimiento del folículo ocurre normalmente en asociación con el proceso ovulatorio y en respuesta a la estimulación de las hormonas gonadotrópicas que le confieren al óvulo la capacidad de ser fertilizado y finalmente desarrollar a un embrión (15).

El tamaño del folículo varía según las especies desde 1 mm en el ratón a 5 cm en el caballo, el volumen varía y es determinado por la cantidad de líquido folicular, éste es separado de la circulación sanguínea por dos clases de tejidos: las células de la granulosa sobre la membrana y la teca interna (3,4,14,28), (Fig. 2); la integridad de los folículos es indudablemente determinado por las propiedades de estos tejidos durante la vida del folículo.

El líquido folicular tiene una importancia fundamental en la fisiología del ovario, incluye el crecimiento de los folículos, maduración de los óvulos, ovulación y transporte por los oviductos; su composición proviene por una parte de las secreciones de las células de la granulosa, de la teca interna y por otra parte del exudado del plasma sanguíneo (11). El líquido es una solución de color pajizo (amarilloso), con un pH 7.33 y de composición química compleja (8,10,27).

Los niveles de varios compuestos químicos en el líquido folicular han sido determinados mediante el uso de varios métodos analíticos y se ha encontrado que la composición y concentración de los mismos son semejantes a los del suero (11).

Entre los componentes inorgánicos se ha reportado la presencia de: magnesio, cloruro, zinc, cobre, calcio y fosfato inorgánico (17,21,22). Dos iones de considerable interés son el

sodio y potasio que aparentemente contribuyen en gran parte a la presión osmótica del fluido (11).

El análisis bioquímico de los carbohidratos del líquido folicular revelan que la glucosa a una concentración de 40 mg por 100 ml comprende cerca de tres cuartas partes del total de carbohidratos, otros componentes como la fructosa están en menor cantidad (17). Entre los lípidos se ha reportado la presencia de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, los cuales se encuentran en concentraciones más bajas que las presentes en suero, también se ha descrito la presencia de gonadotropinas y esteroides, entre las primeras destacan la FSH y LH (9,12), mientras que los esteroides existe una extensa variedad que incluye estrógenos, andrógenos y progestágenos (20,25). Sus concentraciones varían de acuerdo a la especie de que se trate y al estado de desarrollo del folículo; la concentración de éstos es mayor al inicio del crecimiento folicular y disminuye antes de la ovulación. Además de los compuestos químicos anteriormente mencionados se ha reportado la presencia de nucleótidos cíclicos entre los que sobresale el AMPc (10).

El análisis de las proteínas en el líquido folicular indican que muchas de ellas están presentes en plasma sanguíneo y presentan cerca del 50% de la concentración encontrada en suero (18,24). En el cerdo se ha reportado que los folículos en diferentes estados fisiológicos de crecimiento presentan una

concentración semejante de proteínas, así para los folículos pequeños (3.2-4.5 mm de diámetro), se encontró 7.41 ± 0.30 g/100ml y para los grandes (5-10 mm de diámetro), 6.97 ± 0.24 g/100ml (19).

El patrón electroforético resultó ser diferente ya que los folículos pequeños presentaron una banda de alfa globulinas de migración rápida, mientras que el líquido de folículos grandes, presentaron una banda de alfa globulinas de migración lenta (19).

Dentro de los principales cambios en las propiedades físicas y químicas del líquido folicular incluye a los mucopolisacáridos que son porciones de glicosaminoglicanos de una glicoproteína grande. Estos fueron medidos por cromatografía líquida de alta presión en el líquido folicular de cerdo de folículos pequeños (1-2 mm), medianos (3-5 mm) y grandes (6-12 mm). Se identificó material semejante a condroitín y heparán sulfato; el grado de sulfatación de los condroitines incrementó con la maduración folicular (1). Las gonadotropinas y esteroides pueden regular la síntesis y secreción de las glicoproteínas por las células de la granulosa ya que la producción de éstos varía durante la maduración del folículo (1). El papel fisiológico de las glicoproteínas en la maduración folicular y ovárica en la ovulación y en la atresia no se ha determinado. Se ha propuesto que podrían ser mediadores importantes en la acumulación del líquido en el folículo ya que se ha sugerido que la depolimerización de estos compuestos

dentro del folículo genera un incremento en la presión osmótica que provoca la entrada de agua y moléculas pequeñas a través de la pared del folículo, con lo que se facilita la ruptura de la pared folicular y así permitir el escape de su contenido (11).

Las glicoproteínas son proteínas conjugadas las cuales contienen grupos de carbohidratos unidos covalentemente a la cadena polipeptídica. El porcentaje en peso de los grupos de carbohidratos en las diferentes glicoproteínas pueden variar entre el 1% en la ovoalbúmina y el 80% en las mucoproteínas.

Las proteínas con un alto contenido de carbohidratos son llamadas proteoglicanos. La mayoría de los azúcares encontrados en las glicoproteínas son monosacáridos o derivados de ellos, las cadenas laterales (lineales o ramificadas), contienen de dos a docenas de residuos de monosacáridos que por lo general son de dos o más tipos. Frecuentemente la unidad terminal monosacárida es un residuo cargado negativamente del ácido N-Acetil Neuramínico.

Los grupos de oligosacáridos de la mayoría de las glicoproteínas están unidas a los grupos R de residuos de aminoácidos específicos de la cadena polipeptídica. Existen tres diferentes clases de uniones: a.- De la glucosamina del oligosacárido con la amina nitrogenada de un residuo de la asparagina de la cadena polipeptídica, b.- Unión glicosídica con el grupo hidróxido del residuo de la serina o treonina, c.-

La cadena lateral de la glicoproteína (oligosacáridos), se fija a los grupos hidróxido de los residuos de la hidroxilisina.

En el proceso de crecimiento, maduración y formación del líquido folicular aún existe mucho por estudiar ya que para todos los estudios que se han realizado del líquido folicular ha sido colectado de un número limitado de folículos y los resultados sólo han sido relacionados al estado fisiológico del animal más que al proceso de crecimiento folicular. En vista de la diversidad de los estados del folículo presente en el ovario, es importante elucidar el proceso fisiológico en los folículos individuales para entender varios aspectos de la diferenciación folicular; por tal motivo en el presente trabajo se analizan los cambios en el patrón de las proteínas y glicoproteínas en los diferentes estados de maduración del folículo, ya que se ha propuesto que estas moléculas podrían tener un papel importante en la fisiología del folículo.

H I P O T E S I S

Dentro de las múltiples moléculas que se han encontrado en el líquido folicular existe la posible participación de las proteínas y las glicoproteínas en los procesos intrafoliculares para que se lleve a cabo el crecimiento, diferenciación folicular y la maduración de los óvulos.

O B J E T I V O S

Determinar el patrón electroforético de las proteínas y glicoproteínas en los estados fisiológicos del folículo de cerdo.

Analizar la posible existencia de un marcador de maduración folicular en el cerdo.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

OBTENCION DE LA MUESTRA.

EQUIPO

- Vernier.
- Microjeringa de 10 microlitros.
- Jeringa de 1 ml.
- Centrífuga clínica Sorvall GLC-1.

REACTIVOS

Solución salina al 0.09%

Pesar 9 g de cloruro de sodio, diluir y aforar a 1000 ml con agua desionizada.

METODO

Los ovarios de porcino fueron recolectados de animales recién sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara y transportados en refrigeración al laboratorio para

conservarlos en buen estado.

De los 95 ovarios que se recolectaron se seleccionaron los folículos que tuvieron los siguientes diámetros: pequeños (2 mm), medianos (5 mm) y grandes (9 mm), de los que se procesó un total de 43, 45 y 40 folículos respectivamente, las mediciones fueron realizadas con un Vernier. Posteriormente se extrajo el líquido folicular, para los folículos pequeños se utilizó la microjeringa de 10 microlitros y para los medianos y grandes se utilizó la jeringa de 1 ml. El líquido aspirado se colocó en tubos de ensayo que contenían 1 ml de solución salina al 0.09%, las células de la granulosa fueron eliminadas del líquido folicular mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se decantó a tubos y se almacenaron a 0° hasta la determinación de la concentración de proteínas y la corrida electroforética.

DETERMINACION DE PROTEINAS

FUNDAMENTO

Esta determinación está basada en la reacción de reducción del complejo formado entre los residuos triptofano-tirosina y los iones de Cu^{++} por el reactivo de Folin (Acido fosfomolibdico-fosfotúngstico), con lo que se

desarrolla un color azul que es directamente proporcional a la concentración de proteínas (16).

EQUIPO

- Potenciómetro Compensator E 388.
- Espectrofotómetro Coleman Junior II.

REACTIVOS

Solución patrón de proteínas

Pesar 20 mg de albúmina bovina, disolver y aforar a 10 ml con agua desionizada, obteniendo una concentración final de 2 mg por cada mililitro.

Solución amortiguadora de carbonatos pH 10.1

Carbonato de sodio 0.2 M, Bicarbonato de sodio 0.2 M

Pesar 636 mg de carbonato de sodio y diluir con 30 ml de agua desionizada, pesar 336 mg de bicarbonato de sodio y diluir con 20 ml de agua desionizada, mezclar las 2 soluciones y ajustar el pH a 10.1 con hidróxido de sodio 1 N.

Reactivo "A"

Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1 N

Pesar 1 g de hidróxido de sodio, diluir y aforar a 250 ml con agua desionizada. Pesar 5 g de carbonato de sodio diluir en los 250 ml de la solución de hidróxido de sodio 0.1 N .

Reactivo "B"

Sulfato de cobre 0.5% en tartrato de sodio y potasio al 1%

Pesar 2 g de tartrato de sodio y potasio, diluir y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Pesar 1 g de sulfato de cobre, diluir y aforar a 100 ml con agua desionizada.

Para preparar este reactivo se toman volúmenes iguales de estas dos soluciones

Reactivo "C"

Medir 50 ml de reactivo "A" y adicionar 1 ml de reactivo "B"

Reactivo de Folin 1 N

Generalmente el reactivo de Folin comercial viene 2 N medir 1 ml del reactivo de Folin y diluir a 2 ml con agua desionizada.

Nota: Las dos últimas soluciones se preparan al momento

METODO

Se preparó una curva patrón de la solución de albúmina con 0,1 ml de cada estandar para tener concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 microgramos por sistema.

Para la determinación de proteínas en el líquido folicular se utilizaron las siguientes alícuotas en función del diámetro del folículo; grandes (9 mm), 0.005 ml ; medianos (5 mm), 0.010 ml y pequeños (2 mm), 0.020 ml de líquido folicular.

- Adicionar a cada alícuota 0.1 ml del amortiguador de carbonatos pH 10.1 .
- Incorporar 1 ml del reactivo "C" y agitar.
- Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 0.1 ml del reactivo de Folin y agitar.
- Leer en espectrofotómetro a 750 nm .

- Las lecturas así producidas fueron interpoladas en la gráfica tipo (Fig. 3), preparada simultáneamente con la solución de albúmina y con los mismos reactivos.

ELECTROFORESIS

FUNDAMENTO

Este proceso está basado en la separación de proteínas que presentan una carga neta en un campo eléctrico cuando se hace pasar una corriente continua entre dos electrodos en un medio con iones, las proteínas negativas (aniones), se mueven hacia el electrodo positivo (ánodo), mientras que las positivas (cationes) se mueven hacia el electrodo negativo (cátodo), la velocidad de migración de una proteína dependerá entre otras cosas de su peso molecular y a la magnitud de la corriente empleada.

EQUIPO

- Potenciómetro Compensator E 338.
- Cámara electroforética en disco.
- Fuente de poder eléctrica Beckman.
- Negatoscopio.

REACTIVOS

Solución Stock

Acrilamida al 10% y Bis-acrilamida al 3%

Fueron pesados 20 g de acrilamida y 0.75 g de Bis-acrilamida, enseguida se disolvieron y aforaron a 50 ml con agua desionizada.

Amortiguador 10X pH 7.4

Tris 40 mM, Acetato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM

Para preparar esta solución se pesaron las siguientes cantidades: 4.84 g de tris, 1.6406 g de acetato de sodio y 0.745 g de EDTA, se disolvieron en 800 ml con agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4 con ácido acético y se aforó a 1000 ml con agua desionizada.

S D S al 20%

Pesar 20 g de SDS, disolver y aforar a 100 ml con agua desionizada.

TEMED al 5%

Se preparó esta solución (v/v), tomando 0.05 ml de TEMED

y se aforó a 10 ml con agua desionizada.

Persulfato de amonio al 1.5%

Pesar 0.15 g de persulfato de amonio, disolver y aforar, a 10 ml con agua desionizada.

Amortiguador para electroforesis

Se miden 100 ml del amortiguador 10X pH 7.4, enseguida se mezclan con 25 ml de SDS al 20% y se aforan a 750 ml con agua desionizada.

Solución indicadora de corrida

Azul de bromofenol al 1%

Pesar 0.15 g de azul de bromofenol, disolver y aforar, a 10 ml con agua desionizada.

Amortiguador para la muestra

Sacarosa al 20% en amortiguador para electroforesis

Pesar 2 g de sacarosa, disolver a 10 ml con el amortiguador para electroforesis.

Preparación de geles

Medir:

- Solución Stock de acrilamida	8.4 ml
- Amortiguador 10X pH 7.4	6.0 ml
- S D S al 20%	3.0 ml
- Agua desionizada	33.6 ml
- Persulfato de amonio al 1.5%	6.0 ml
- TEMED al 5%	3.0 ml

Colorante para proteínas I

Alc6hol isopropilico al 25%, 6cido ac6tico al 10%, azul de Coomassie al 0.05%

Medir 80 ml de alc6hol isopropilico, a6adir 25 ml de 6cido ac6tico glacial y por 6ltimo agregar 0.125 g de azul de Coomassie disolver y aforar a 250 ml con agua desionizada.

Colorante para proteínas II

Alc6hol isoprop6lico al 10%, 6cido ac6tico al 10%, azul de Coomassie al 0.005%.

Medir 32 ml de alc6hol isoprop6lico, adicionar 25 ml de 6cido ac6tico glacial y 0.0125 g de azul de Coomassie, disolver y aforar a 250 ml con agua desionizada.

Colorante para proteínas III

Acido ac6tico al 10%, azul de Coomassie al 0.0025%.

Medir 25 ml de 6cido ac6tico glacial, incorporar 0.0062 g de azul de Coomassie, disolver y aforar a 250 ml con agua desionizada.

Revelador de proteínas

Acido ac6tico al 10%.

Medir 100 ml de 6cido ac6tico glacial y aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Fijador para carbohidratos I

Alc6hol isopropilico al 25%, 6cido ac6tico glacial al 10%.

Medir 80 ml de alc6hol isopropilico, a6adir 25 ml de 6cido ac6tico glacial, diluir y aforar a 250 ml con agua desionizada.

Fijador para carbohidratos II

Alc6hol isopropilico al 10%, 6cido ac6tico al 10%.

Medir 32 ml de alc6hol isopropilico, adicionar 25 ml de 6cido ac6tico glacial, mezclar y aforar a 250 ml con agua desionizada.

Fijador para carbohidratos III

Acido ac6tico glacial al 10%.

Medir 100 ml de 6cido ac6tico glacial, diluir y aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Acido periódico al 0.5%

Pesar 1.25 g de ácido periódico, disolver y aforar a 250 ml con agua desionizada.

Arsenito de sodio al 0.5%

Pesar 2.5 g de arsenito de sodio, disolver con agua desionizada e incorporar 25 ml de ácido acético glacial y aforar a 500 ml con agua desionizada.

Arsenito de sodio al 0.1%

Pesar 1.0 g de arsenito de sodio, disolver con agua desionizada, agregar 25 ml de ácido acético glacial y aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Acido acético glacial

Reactivo de Schiff

Pesar 2.5 g de fucsina básica, 5 g de metabisulfito de

sodio, disolver con agua desionizada, agregar 50 ml de ácido clorhídrico 1 N y aforar a 500 ml con agua desionizada, agitar esta solución por varias horas, después decolorizar con 2 g de carbón activado por tres veces.

Metabisulfito de sodio 0.1% en HCl 0.01 N

1 g de metabisulfito de sodio se disuelve en agua y se afora a 1000 ml con agua desionizada.

METODO

Preparación de geles

La preparación de los geles se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se preparan los tubos de vidrio de 12 cm de longitud y 6 mm de diámetro interno, éstos se limpian perfectamente con mezcla crómica; se lavan, siliconizan 10 minutos y se secan al horno.
- Se marcan a 1 cm y a 11 cm.
- Se sellan en el extremo inferior en relación a las marcas mencionadas, con parafilm.

- Una vez efectuado esto, se llenan hasta la segunda marca con la mezcla para la elaboración de los geles, el vaciado debe ser con cuidado para evitar la formación de burbujas dentro del gel.
- Finalmente se agregan unas gotas de agua sin mezclar con el fin de que la superficie del gel quede completamente plana y el menisco se forme en la superficie del agua.
- El gel se deja polimerizar toda la noche a temperatura ambiente (13).

Estándares de peso molecular

Se pesó 1 mg de Tripsinógeno (24 000 Daltons); Albúmina (monomero 66 000 Daltons); Albúmina (dimerio 132 000 Daltons) Miosina (200 000 Daltons), se disolvieron en un ml de sacarosa al 20%. Para la corrida electroforética se emplearon 50 microlitros de cada proteína, (50 microgramos).

MUESTRA

Preparación para la corrida electroforética

Se toma un volúmen de la dilución del líquido folicular, equivalente a 0.1 g de proteína, se agregan 0.5 g de sacarosa

al 20% en el amortiguador electroforético y se añade una gota del indicador de corrida (azul de bromofenol).

CORRIDA ELECTROFORETICA

Una vez polimerizados los geles se decantó el agua y se enjuagaron, enseguida se les agregó la muestra y los estándares ya preparados para la corrida electroforética, un gel para cada muestra y para cada estándar, inmediatamente se les agregó amortiguador para electroforesis evitando que se mezcle con la muestra. Posteriormente se procedió a quitar el parafilm del extremo inferior y se acomodaron los tubos en la cámara electroforética, se llenaron con el amortiguador las dos cámaras del aparato de electroforesis hasta cubrir los electrodos, así mismo que los tubos quedaran sumergidos en ambos extremos. Los electrodos de la cámara fueron conectados a una fuente de poder colocando el electrodo positivo en la cámara inferior y el electrodo negativo en la cámara superior (13).

La corriente aplicada fue de 3 ma/tubo hasta la terminación de la corrida electroforética, esto ocurrió cuando el colorante indicador alcanzó la marca de 1 cm del extremo final del tubo. Bajo estas condiciones la duración de la corrida electroforética fue de 3 horas aproximadamente (13).

Los tubos de la corrida electroforética fueron retirados de la cámara, marcados y colocados en hielo durante 10 minutos después de lo cual se procedió a extraer el gel inyectando agua fría a presión con una jeringa entre el gel y las paredes internas del tubo, después que los geles fueron extraídos de sus tubos, se procedió al revelado de proteínas y carbohidratos respectivamente.

REVELADO DE PROTEINAS

Para el revelado de las bandas de proteínas se realizó de la siguiente manera:

- Colorante para proteínas I, toda la noche.
- Colorante para proteínas II, de 6 a 9 horas.
- Colorante para proteínas III, toda la noche.
- Revelador para proteínas, hasta que desaparezca el fondo azul.

REVELADO DE CARBOHIDRATOS

- Revelador de carbohidratos I, toda la noche.
- Revelador de carbohidratos II, de 6 a 9 horas.
- Revelador de carbohidratos III, toda la noche.

- Acido periódico al 0.5%, 20 minutos.
- Arsenito de sodio al 0.5%, 20 minutos.
- Arsenito de sodio al 0.1%, 20 minutos.
- Acido acético glacial, 20 minutos.
- Reactivo de Schiff, toda la noche.
- Metabisulfito de sodio al 0.1% en HCl 0.01N, hasta decolorizar.

La fijación, coloración y decoloración se hizo a temperatura ambiente, los geles se almacenaron en tubos de vidrio para ser analizados a través del negatoscopio y realizar el conteo y medición de las bandas presentes en cada gel de los problemas y los estandares. Con los valores obtenidos se traza una curva patrón para la determinación del peso molecular (Fig. 4).

R E S U L T A D O S

El líquido folicular (LF), fué colectado de 43 folículos de 2 mm de diámetro, 45 folículos de 5 mm de diámetro y 40 folículos de 9 mm de diámetro; para ser analizados en lo referente a volúmen, concentración de proteínas y patrón electroforético de proteínas. El volúmen de los folículos de 2 mm de diámetro fué de 5.3 ± 1.8 microlitros, de los de 5 mm de diámetro, 57 ± 25 microlitros y de los de 9 mm 190 ± 77 microlitros. Dentro de cada uno de los ovarios de donde se pudo colectar el fluído folicular, se pudo observar que por lo general los folículos fueron de tamaño uniforme, prevaleciendo folículos preovulatorios de tamaño grande.

El análisis estadístico demuestra que la correlación entre tamaño y el volúmen folicular es positiva y altamente significativa ($r = 885$; $p < 0.001$). Por lo tanto, en estudios subsecuentes el volúmen folicular podría ser estimado en base al tamaño folicular mediante el uso de regresión lineal y = $30.97X + (-69.97)$ (Fig. 5).

Las variaciones en el tipo de folículos presentes en los ovarios de los diferentes animales, posiblemente podría reflejar diferencias en las etapas del ciclo estral de los animales al tiempo que éstos son sacrificados. Hecho que, a su vez podría reflejarse en la concentración de proteínas,

encontrándose que el promedio de la concentración de proteínas expresada en miligramos por folículos, para los folículos de 2 mm fué de 0.56, para los de 5 mm 3.89 y para los de 9 mm 10.05 y la concentración de proteínas en mg por ml de líquido folicular fue de $106.57^{+96.33}$ mg para los folículos de 2 mm, $68.32^{+47.12}$ mg para los de 5 mm y $52.93^{+21.38}$ mg para los de 9 mm de diámetro, la concentración en g por 100 ml de líquido folicular fué de $10.60^{+9.63}$, $6.83^{+4.71}$, $5.29^{+2.14}$, para los folículos de 2, 5 y 9 mm de diámetro respectivamente (tabla 1).

En la separación de proteínas y carbohidratos de líquido folicular por electroforesis en gel de poliacrilamida se realizaron 30 corridas para cada uno de los diferentes grupos; en los folículos de 2 mm de diámetro se encontró un patrón de 3 bandas de proteínas y ninguna banda de carbohidratos (Fig. 6). Los pesos moleculares se indican en la tabla 2.

En el caso de los folículos de 5 mm de diámetro, presentaron un patrón electroforético de 10 bandas de proteínas y una banda de carbohidratos (Fig. 6). Los pesos moleculares de ambos grupos de compuestos se indican en la tabla 2.

El patrón de proteínas y carbohidratos en el líquido folicular de cerdo de los folículos de 9 mm de diámetro fué de 12 y 2 bandas respectivamente (Fig. 6). En la tabla 2 se indican los pesos moleculares correspondientes.

En los folículos de 5 mm de diámetro la proteína con 66 000 Daltons corresponde a una glicoproteína, ya que se encontraron tanto en el gel de proteínas como en el de carbohidratos. De la misma manera en los folículos de 9 mm de diámetro las bandas con pesos moleculares de 170 128 y 66 000 Daltons corresponden a una glicoproteína, ya que se encontró tanto en el de proteínas como en el de los carbohidratos.

D I S C U S I O N

El líquido folicular está constituido por el exudado del plasma sanguíneo y por las secreciones intrafoliculares; se ha sugerido que el flujo de los constituyentes sanguíneos hacia el folículo en crecimiento se realiza a través de un proceso trasudativo, el cual constituye la explicación más sencilla para dilucidar el mecanismo de la formación del líquido folicular (11). No obstante al comparar la concentración de proteínas de cada uno de los folículos de diferentes tamaños se encontró una concentración elevada en los folículos pequeños para disminuir en los folículos medianos y por último estabilizarse en los folículos grandes (Tabla 1), lo cual implica que los folículos de 2 mm de diámetro mantienen su concentración elevada de proteínas en contra de una concentración más baja presente en suero. Estos resultados concuerdan con los de Shuetz y Anisowicz (23), en donde las concentraciones de proteínas en el líquido folicular son altas en comparación a las del suero de cerdo (107^{+96} vs 75 mg/ml), y también están de acuerdo con los reportados en otras especies como el conejo y en el humano (6,27). Todas estas evidencias hacen imposible pensar en la posibilidad de que exista un mecanismo de trasudación para la formación del líquido folicular.

Por otro lado existen suficientes reportes en apoyo al

hecho de la disminución y estabilización de las concentraciones de las proteínas, ya que existe disminución de la fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico-oxalacética, calcio, colesterol, éster hidrolasa, aminoácidos, fosfolípidos triglicéridos entre otros (10). Más aún, esto último no solamente representa un argumento más en contra del mecanismo de trasudación sino que es una evidencia de que existe un incremento en la síntesis de proteínas y que algunas son liberadas por las células de la granulosa y además de que existe una exportación de proteínas por el folículo, ya que la concentración de las mismas es menor en los folículos grandes.

Al analizar las proteínas del líquido folicular de los folículos de 2, 5 y 9 mm de diámetro por electroforesis en gel de poliacrilamida (13), se puede observar que existe una proteína común en los tres folículos que corresponde a la Albúmina (66 000 Daltons) y la cual sólo en los geles de los folículos de 5 y 9 mm dió positiva la prueba de PAS para los carbohidratos (Fig. 7). Los resultados obtenidos apoyan la teoría de que durante el desarrollo folicular se incrementa la síntesis de proteínas en las células de la granulosa (7), ya que se encontraron bandas de diferente peso molecular al comparar entre sí los geles de las proteínas de los folículos de 2, 5 y 9 mm de diámetro. De esta forma en los folículos de 2 mm de diámetro encontramos dos bandas de proteínas (219 472 y 77 153) que no se presentan en los folículos de 5 y 9 mm de diámetro, mientras que los folículos medianos

encontramos 4 diferentes proteínas (379 507; 162 638; 92 639; 64 256 Daltons), y en los de 9 mm de diámetro encontramos 6 diferentes y de mayor peso molecular (401,356; 313,315;170,128; 152,757; 106,335 y 99,112 Daltons) de las cuales una es una glicoproteína que corresponde a un peso molecular de 170 128 Daltons.

El hecho de que la concentración de proteínas sea mayor en los folículos pequeños y disminuya en los folículos medianos para estabilizarse en los folículos grandes (2,5,9 mm de diámetro) podría concordar con el reporte de que el inhibidor de la maduración folicular (OMI) se libera cuando los folículos alcanza cierto grado de maduración (7). Por otro lado la presencia hasta de 6 proteínas diferentes en los folículos grandes y en los reportes de que en los óvulos de rana y estrella de mar aparece el factor de maduración (MPF) (5), nos permite sugerir que posiblemente una de estas proteínas nuevas se comporte como factor de maduración folicular.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Existe una correlación positiva y significativa entre el tamaño y el volúmen folicular.
- 2.- En la formación del líquido folicular no existe un proceso de trasudación de los constituyentes sanguíneos hacia el folículo.
- 3.- Las proteínas se encuentran en una concentración muy elevada en los folículos pequeños para disminuir en los folículos medianos y por último estabilizarse en los folículos grandes.
- 4.- Existe síntesis y exportación de proteínas del folículo durante la maduración.
- 5.- El patrón electroforético del líquido folicular en los folículos pequeños fué de 3 proteínas, en los medianos 10 proteínas (1 glicoproteína), y los grandes de 12 proteínas (2 glicoproteínas).

6.- El patrón electroforético del líquido folicular fué diferente en cada grupo de folículos, en los folículos pequeños se encontraron 2 proteínas diferentes, en los medianos se encontraron 4 y en los grandes 6 proteínas y una glicoproteína diferente.

7.- Las proteínas y la glicoproteína diferente podrían ser indicadores de maduración folicular y comportarse como marcadores.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ax, R. L. and Ryan, R. J. (1979). The porcine ovarian follicle. IV Mucopolysaccharides at Different Stages of Development. Biol. Reprod. 20, 1123-1132.
- 2.- Bair, S. R. (1972). In Reproduction of Mammals, C. R. Austin and R. V. Short (eds) Cambridge, Cambridge University Press.
- 3.- Björkman, N. (1962). A study of the ultrastructure of the granulosa cells of the rat ovary. Acta Anat. 51, 125.
- 4.- Brambell, F. W. R. (1960). Ovarian Changes. In: Marshall's Physiology of Reproduction, vol. 1, part 1, Chap. 5. Ed. A. S. Parkes. Longmans Green, London.
- 5.- Capony, J. P., Picard, A., Peaucellier, G., Labbe, J. C., and Doree, M. (1986). Changes in the activity of maturation-promoting factor during meiotic maturation and following activation of Amphibian and Starfish oocytes; their correlations with protein

phosphorylation. Dev. Biol. 117, 1-12.

- 6.- Caravaglios, R., and Cilotti, R. J. (1957). A study of the proteins in the follicular fluids of cow. J. Endocr. 15, 273-278.
- 7.- Centola, G. M., Anderson, L. D. and Channing, C. P. (1981) Oocyte maturation inhibitor (OMI) activity in protein granulosa cells. Gamete Res. 4, 451-461.
- 8.- Cerletti, P. and Zichella, L. (1961). Nucleotidasas, nucleotides, vitamins and coenzymes in the follicular, fluid of human ovary. Clin. Acta 6, 581.
- 9.- Chang, M. C., Niwa, K., Hunt, D. N. (1975). Fertilizing capacity of spermatozoa and fertilizable life of egg from immature and mature rabbits and rats. In Again Gametes, edited by R. J. Blandaw, Basel Skanger, A. G. pp 165-178.
- 10.- Chang, S. C. S., Jones, J. D., Ellefson, R. D., Ryans, R., J. (1976). The porcine ovarian follicle: I Selected

chemical analysis of follicular fluid at different, developmental stages. Biol Reprod., 25, 321-328.

- 11.- Edwards, R. W. (1974). Follicular fluid. Reprod. Fertil. 37, 189-219.
- 12.- Eskol, A., Lunerfeld, D. and Peters, H. (1970). Ovarian development, Eds., W. R., Butt, A. C., Crooke and M. Ryle Livingstone, Edinburg. pp 247-286.
- 13.- Fairbanks, G. Theodore, L. Steck, and D. T. H. (1971) Electrophoretic analysis of the mayor polypeptides of the human erythrocyte membrane. Bioch., 10, 2606-2617.
- 14.- Gouézou, J. M. (1969). Fonctions physiqués du follicle, ovarien propriétés du liquide folliculaire. In : L'Ovulation. Ed. R. Moricard, Masson, Paris.
- 15.- Hafez, E. S. E. (1986). Anatomía funcional de la reproducción e inseminación artificial en animales. E. S. E., Hafez (Ed). México, D. F. Editorial Interamericana, p 6-79.

- 16.- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 17.- Lutwak-Mann, C. (1954). Note on the chemical composition of bovine follicular fluid. J. Agric. Sci. Camb. 44, 77.
- 18.- Manarang-Pangan, S. and Merge, A. G. (1971). Immunologic studies on human follicular fluid. Fertil. Steril. 22 367.
- 19.- Mc Gaughey, R. W. (1975). A comparison fluids from small, and large ovarian follicles of the pig. Biol. Reprod. 13, 147-153.
- 20.- Mc Kerns, R. W. (1969). The gonads, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp 363-402.
- 21.- Pascu, T., Dema, A., Mihai, D., Lunca, H., and Salageanu, G. (1968). Values of Ca, Mg and glucose in different phases of the oestral cycle, in the follicular fluid

and in the blood of the same cows, also in the fluid of ovarian follicular cyst and in the same cows. VI Congrès de Reproduction et Insemination Artificielle, Paris. Instituto National de la Recherche, Agronomique, France.

22.- Petrov, K., Antonov, S. and D. Zhurova (1969). Elements, and trace elements in normal and abnormal ovaries from heifers and cows, I, Zn and Cu content in: follicular and ovarian. Cyst Vet. Med. Nauki, Sofia, 6. 91.

23.- Schuetz, A. W. and Anisowicz, A. (1974). Cation and protein composition of ovarian follicular fluid of the pig: relation to follicle size. Biol. Reprod. 11, 64-72.

24.- Shivers, C. A., Metz, C. B. and Lutwakmann, C. (1964). Some properties of pig follicular fluid. J. Reprod. Fertil. 8, 115.

25.- Sommerville, F. (1969). Steroid analysis in the study of ovarian function in; The Ovary, eds. W. Ingulla and

R. B., Greenblant, C. C., Thomas, Sringfiel, p p
183-199.

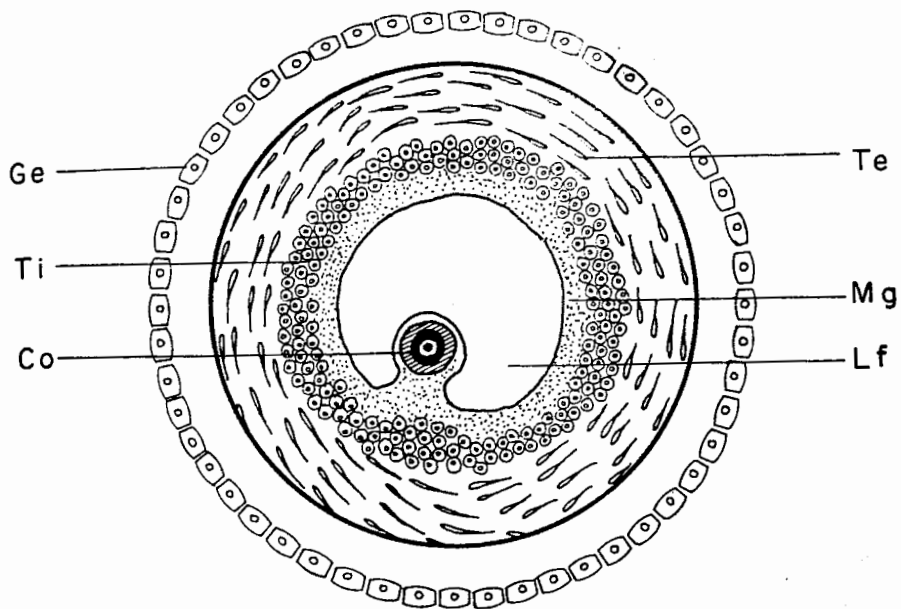
26.- Szybek, K. (1972). In vitro maturation of oocytes from, sexually inmmature mice. J. Endocrinol. 34; 527-527.

27.- Zachariae, F. and Jensen, C. E. (1958). Studies on the mechanism of ovulation histochemical and phisicochemical investigations on genuine follicular fluids. Acta Endocr. Copenh. 27, 345-355.

28.- Zamboni, L. (1972): Comparative studies on the ultrastructure of mammalian oocytes. In: Oogenesis. Eds. J. D. Biggers and A. W. Schuetz. University Park Press, Baltimore; Butterworths, London.

A B R E V I A T U R A S

A M P c	=	Adenosina monofosfato cíclico.
E D T A	=	Acido Etilen Diámico Tetraacético (sal tetrasódica).
F S H	=	Hormona folículo estimulante.
L H	=	Hormona luteinizante.
S D S	=	Dodecil sulfato de sodio.
T E M E D	=	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamino.
T R I S	=	Hidroximetil Amino Metano.



- Ge; Epitelio germinal.
 Te; Teca externa.
 Ti; Teca interna.
 Mg; Membrana granulosa.
 Co; Cúmulus Oopherus.
 Lf.; Líquido folicular.

Figura 1- Folículo Graffiano.

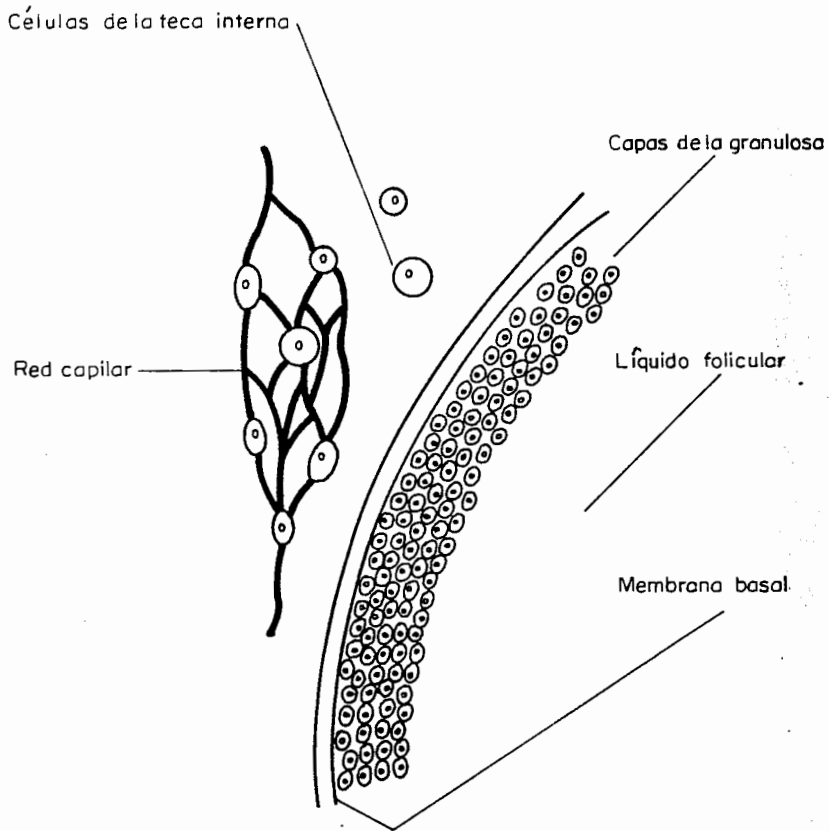


Figura 2.- La estructura de la pared del folículo Graffiano muestra cómo la membrana basal priva de aporte sanguíneo a la célula de la granulosa (2).

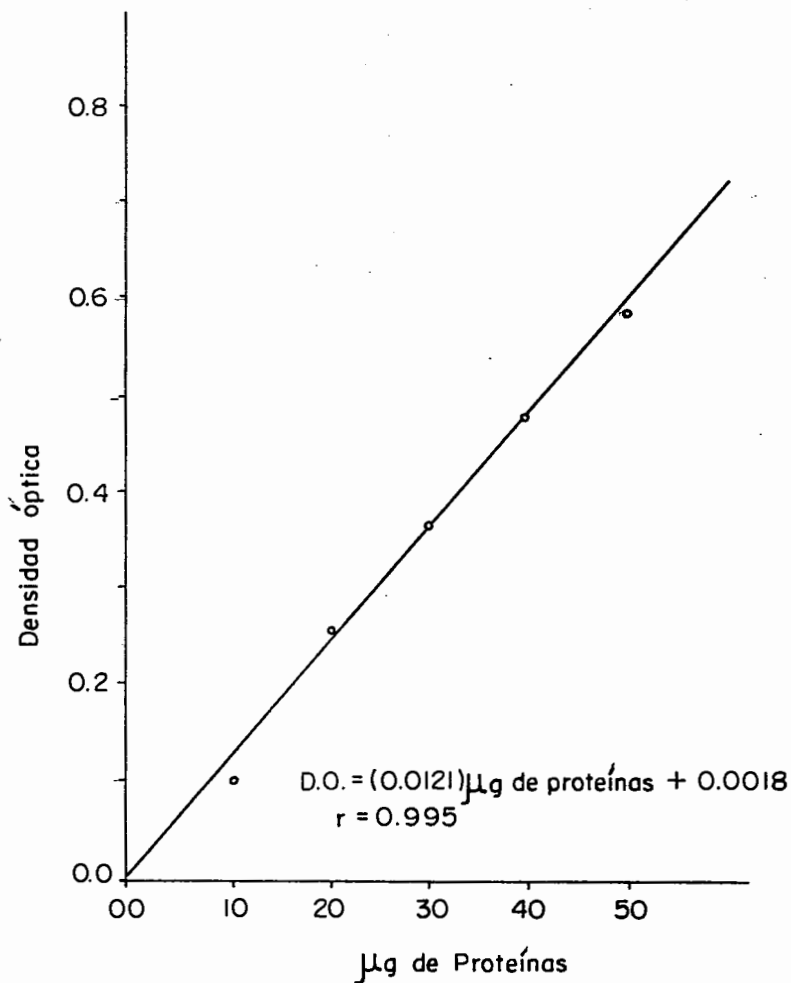


Figura 3.- Curva patrón para la determinación de proteínas.

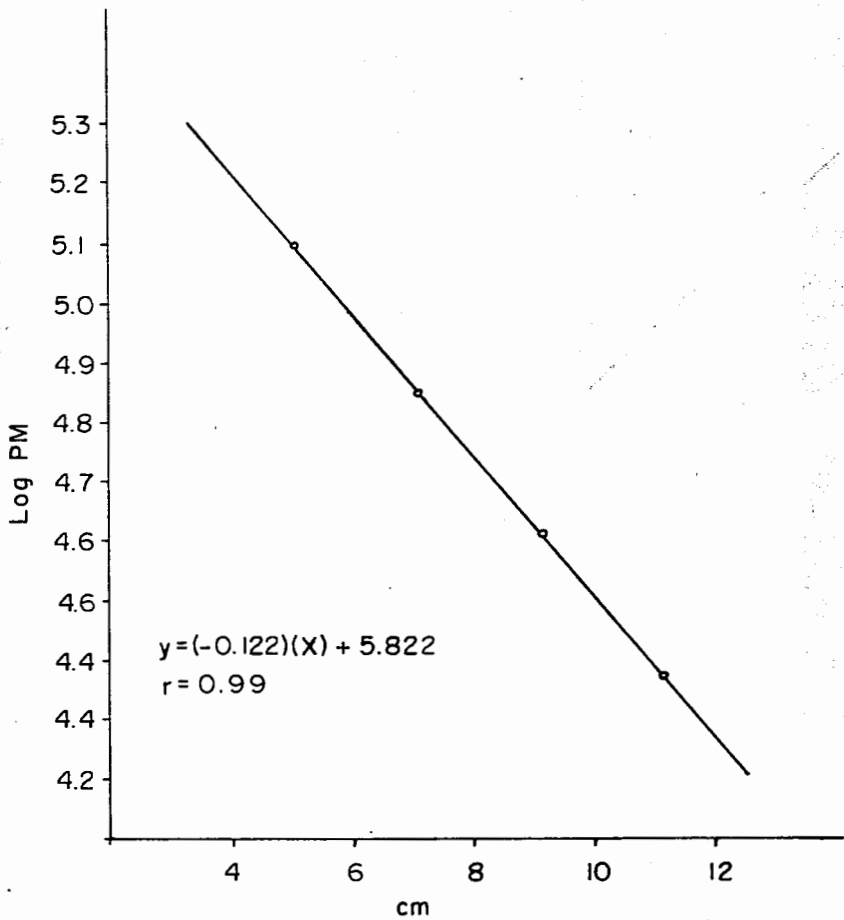


Figura 4- Curva patrón para la determinación del peso molecular de las proteínas.

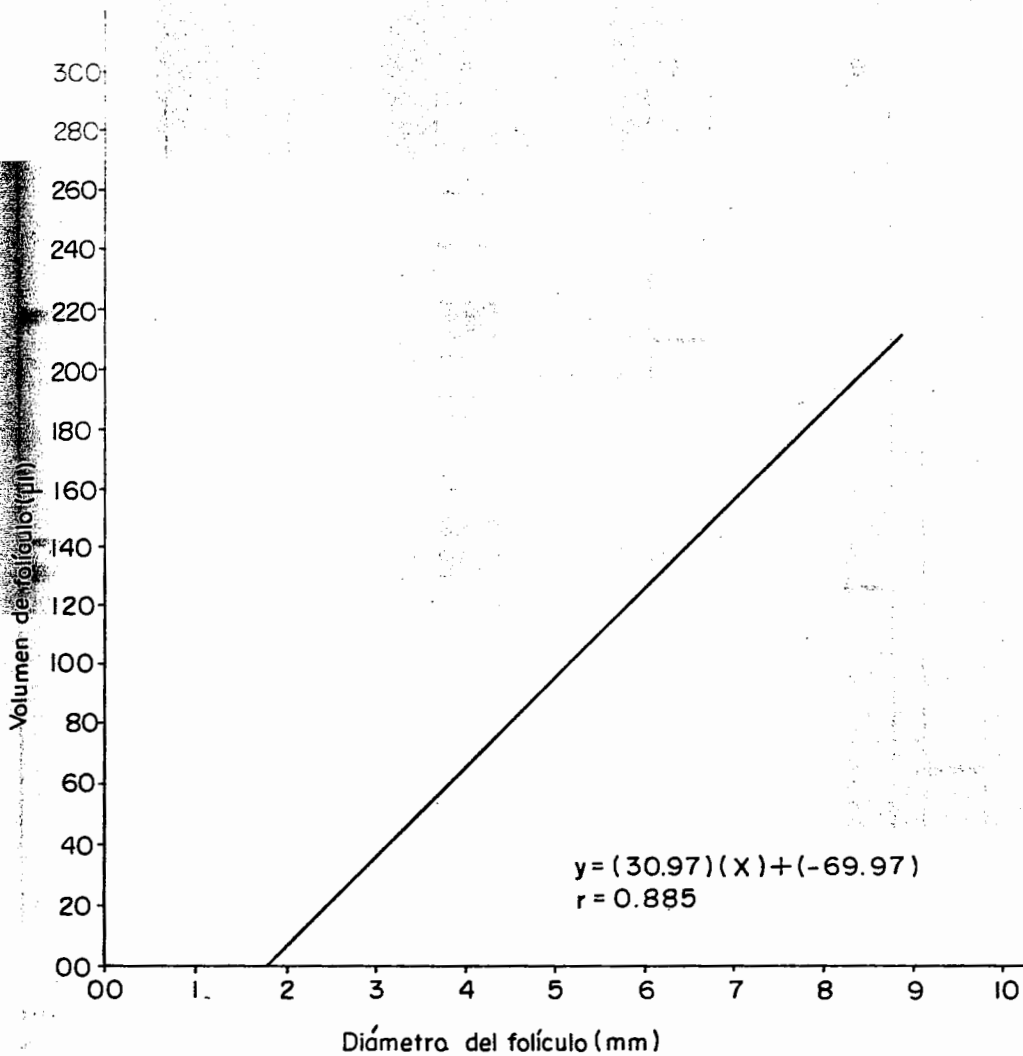
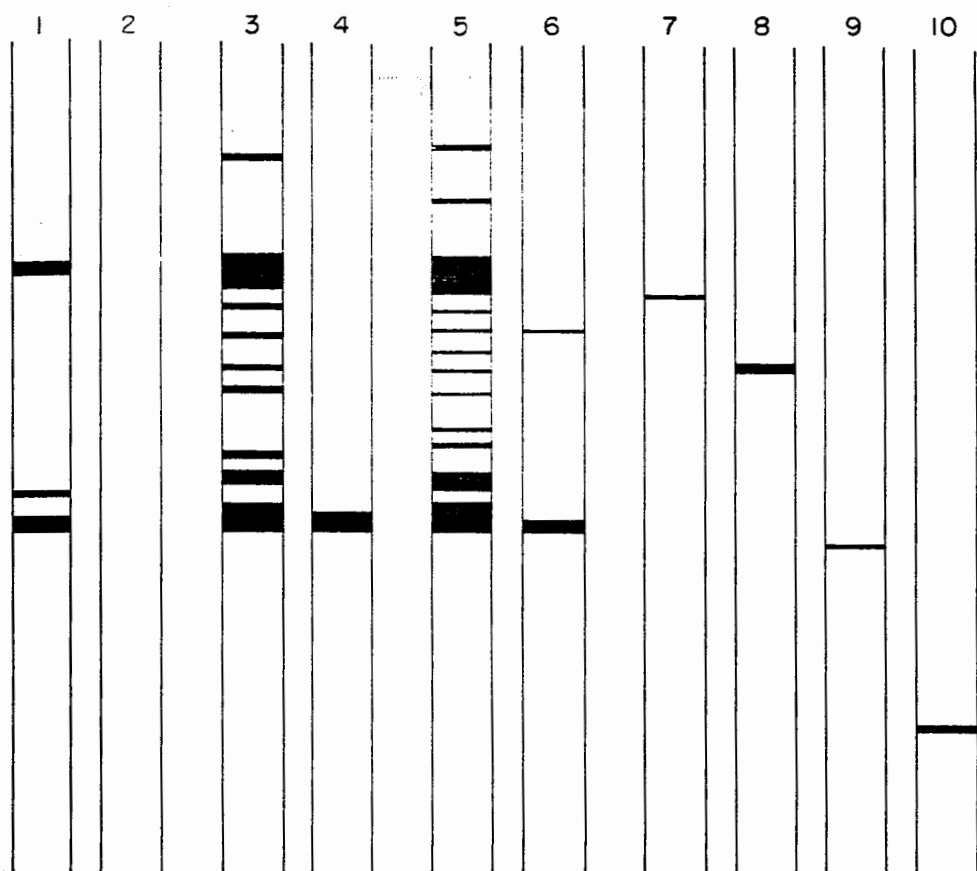


Figura 5- Relación entre el volumen y el diámetro folicular de cada fólculo estudiado en el cerdo.



1: Proteínas de los folículos de 2 mm de diámetro.

3: Proteínas de los folículos de 5 mm de diámetro.

5: Proteínas de los folículos de 9 mm de diámetro.

7: Miosina PM 200000 Daltons.

9: Albúmina (Monomero) PM 66000 Daltons.

2: Carbohidratos de los folículos de 2 mm de diámetro.

4: Carbohidratos de los folículos de 5 mm de diámetro.

6: Carbohidratos de los folículos de 9 mm de diámetro.

8: Albúmina (Dímero) PM 132000 Daltons.

10: Tripsinogeno PM 24000 Daltons.

Figura 6.- Patrón electroforético del líquido folicular del cerdo.

VOLUMEN Y CONCENTRACION DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO FOLICULAR DE CERDO				
Diámetro	Volumen del folículo	Concentración de proteínas		
		mg/ fol	mg/ml	g /100 ml
2 mm	5.13 μ l \pm 11.8	0.56	106.57 \pm 96.33	10.66 \pm 9.63
5 mm	57.00 μ l \pm 25.0	3.89	68.32 \pm 47.12	6.83 \pm 4.71
9 mm	190.00 μ l \pm 77.0	10.05	52.93 \pm 21.38	5.29 \pm 2.14

TABLA I

PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS Y GLICOPROTEINAS DEL LIQUIDO FOLICULAR DE CERDO

DIAMETRO

PROTEINA	2 mm	5 mm	9 mm
	D A L T O N S		
1			401 356 (24)
2		379 507 (13)	
3			313 315 (9)
4	219 472 (10)		
5		205 428 (30)	202 216 (25)
6		187 210 (26)	187 738 (17)
7			170 128*(21)
8		162 638 (27)	
9			152 757 (14)
10		141 249 (19)	138 926 (12)
11		126 249 (12)	126 605 (11)
12			106 335 (14)
13			99 112 (10)
14		92 639 (11)	
15		81 850 (28)	80 480 (23)
16	77 153 (11)		
17	66 000 (26)	66 000 (30)	66 000*(28)
18		64 256 (9)	

(n) = Número de veces que apareció cada proteína de 30 corridas electroforéticas

* = Peso molecular de las glicoproteínas.

TABLA 2



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....

Número 1034/87.

SR. MARTIN GERARDO FRANCO CHAVEZ
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ANALISIS ELECTROFORETICO DE GLICOPROTEINAS EN EL LIQUIDO FOLICULAR DE CERDO DURANTE LA MADURACION DEL FOLICULO" para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación en Recursos Naturales.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Juan Mora Galindo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Septiembre 7 de 1987

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna



FACULTAD DE CIENCIAS

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd

Guadalajara, Jal., Mayo 31 de 1989.

Ing. Adolfo Espinoza de los Monteros Cardenas,
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P r e s e n t e.

Estimado Ing. Espinoza de los Monteros Cardenas:

Por este medio comunico a usted que el señor
MARTIN GERARDO FRANCO CHAVEZ, Pasante de la Licenciatura
en Biología, con número de Código 079046191, ha con-
cluido satisfactoriamente el trabajo de Tesis titulado:
ANALISIS ELECTROFORETICO DE GLICOPROTEINAS EN EL LIQUIDO
FOLICULAR DE CERDO DURANTE LA MADURACION DEL FOLICULO;
realizado en la Division de Biología del Desarrollo de
la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente -I.M.
M.S.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito
de la Tesis y considero que cumple con los requisitos
establecidos por la Facultad de Ciencias a su digno cargo,
para ser impreso y proceder al exámen correspondiente.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para
enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

M. en C. Juan Mora Galindo.
Director de Tesis.