

01669

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PERFIL DE
GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs) EN SALIVA DE
CERDAS DURANTE EL CICLO ESTRAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL: REPRODUCCIÓN

PRESENTA:

M.V.Z. NOEMÍ GARCÍA AGUILAR

ASESORES:

MVZ. Ph.D. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ.
QUIM. ARMANDO CARRANCO LÓPEZ.
MVZ, M.C. ENRIQUE M. CASTRO GÁMEZ.

MÉXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALDA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La presencia de sustancias de origen polisacárido unidos a proteínas en las matrices extracelulares, antes conocidos como mucopolisacáridos ácidos o proteoglicanos, se conocen actualmente como Glicosaminoglicanos (GAGs). Estos GAGs han sido encontrados en el líquido folicular de varias especies animales y en el humano, en este último también se han encontrado como constituyentes de algunos fluidos corporales como la orina, moco cervical y saliva, utilizándolos actualmente como método alternativo de detección de ovulación. El objetivo del presente estudio fue investigar la presencia y caracterización bioquímica de los GAGs en la saliva de cerdas híbridas (Yorkshire x Landrace), como una posible herramienta de detección del estro en cerdas púberes y destetadas. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de GAGs en saliva de cerda, donde la concentración promedio evaluada por espectrofotometría, mostró en hembras púberes una elevación altamente significativa ($P < 0.01$) en el día del estro con estimadores de regresión lineal y cuadrática ($P < 0.05$). Sin embargo, en las concentraciones por individuo se detectó una alta variabilidad a lo largo del ciclo estral. En las hembras destetadas el promedio de GAGs en el día del estro, fue altamente significativo ($P < 0.01$) con relación al número de parto. La caracterización de GAGs por electroforesis indicó la presencia de tres Glicosaminoglicanos; el Heparan sulfato (Hs), Dermatan sulfato (Ds) y Condroitin sulfato C (CsC), de estos, el Ds se encontró el día anterior al inicio de las manifestaciones clínicas del estro en los grupos de hembras muestreadas, el Ds puede estar relacionado directamente con la descarga preovulatoria de LH y los procesos bioquímicos que suceden cerca de la ovulación. Estos resultados sugieren que la presencia de Ds en muestras de saliva de cerdas púberes y destetadas puede ser utilizada para la identificación del inicio del estro y consecuentemente mejorar la eficiencia reproductiva de empresas porcícolas.

Palabras clave: Glicosaminoglicanos, GAGs, Dermatan sulfato, Heparan sulfato, Condroitin sulfato, ciclo estral, cerdas púberes, cerdas destetadas, saliva, electroforesis.

S U M M A R Y

The presence of polysaccharide substances bind to proteins in the extracellular matrix was previously known as acid mucopolysaccharides or proteoglycans are nowadays called Glycosaminoglycans (GAGs). These GAGs have been found in the follicular fluid of several animal species, and in humans, they have been found to be constituents of body fluids such as urine, cervical mucus and saliva, these findings have being the basis for an alternative method of ovulation detection. The objetive of the present study was to investigate the presence and biochemical characterization of GAGs in the saliva of hybrid (Yorkshire-Landrace) sows as a possible tool for the detection of oestrus in gilts and sows. The results obtained confirmed the presence of GAGs in the sows saliva where the mean concentration evaluated by spectrophotometry showed a highly significance ($P < 0.01$) increased on the day of oestrus in gilts, using a lineal and quadratic regressions ($P < 0.05$). However, high variability of GAGs concentration was detected from individuals along the oestral cycle from the weaned sows, the mean of GAGs obtained was highly significant ($P < 0.01$) on the oestrus day in relation with the number of parturition. The electrophoretic characterization of GAGs from the samples evaluated in this study showed the presence of three Glycosaminoglycans; Heparan sulfate (Hs), Dermatan sulfate (Ds), and Chondroitin sulfate C (CsC). The Ds was found the day before the beginning of clinical manifestations of oestrus in both groups of animals sampled, and it could be related with pre-ovulatory discharge of LH as well as the biochemical processes taking place near to the period of ovulation. These results suggest that the presence of Ds in samples of saliva from gilts and sows may be used for the identification of the beginning of oestrus and consequently improve the reproductive efficiency in pig farms.

Key words: Glycosaminoglycans, GAGs, Dermatan sulfate, Heparan sulfate, Chondroitin sulfate, oestrus cycle, gilts, sows, saliva, electrophoresis.

1. INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva es uno de los componentes más importantes en la economía de la producción porcina, sin embargo, puede ser influenciada por algunos factores que afectan diferentes áreas del proceso reproductivo (86, 97), como la edad a la pubertad, la edad al primer servicio, la detección de estros, y el porcentaje de concepción. Estos determinarán el máximo de lechones por cerda por año, lo cual, es el principal objetivo por alcanzar en la industria porcina (24, 25, 63, 85).

La correcta detección del estro es uno de los factores más relevantes, ya que su deficiencia se traduce en grandes pérdidas económicas (32). La habilidad en la detección del estro, celo o calor (que se encuentra íntimamente relacionado con el proceso de ovulación) es lo que permite efectuar la inseminación natural o artificial (IA) en el momento apropiado (33, 63). La IA es la técnica más importante que se ha desarrollado en el mejoramiento genético de animales (32).

En una granja porcina la detección del estro se basa principalmente, en la observación de los cambios morfológicos de la vulva (edematización y enrojecimiento), relacionándolos con el comportamiento de inmovilidad (prueba de cabalque), como indicadores de receptividad de la hembra (102).

La detección del inicio del estro o la predicción de la ovulación, representan la parte integral tanto en el control de la fertilidad, como en el manejo de la infertilidad de hembras en producción (23, 79, 99). A este respecto los signos del estro pueden darnos información. Sterning, *et al.* (1994) observaron que en el primer estro después del destete, los signos externos son débiles en las cerdas primíparas. Uno de los mayores problemas en la producción porcina, es el anestro posdestete, ya que sólo de un 45 al 60% de las cerdas primíparas destetadas, expresan su primer estro dentro de los diez días posteriores al destete, y de éstas, sólo del 66 al 71% reinician la actividad cíclica de los ovarios, dentro del mismo tiempo (101).

Los reportes sobre la duración del estro de la cerda, señalan un intervalo de uno a siete días (tomando los signos vulvares como parámetros). Esta amplitud puede deberse a diferencias genéticas, pero también atribuibles a deficiencias metodológicas (86, 102). Observaciones realizadas por Houngh-Vu, *et al.* (1987) citado por Sternig (1990) de cerdas con calor espontáneo, describen la existencia de grandes variaciones en los niveles máximos de estrógenos, el pico de LH y la disminución en los niveles de progesterona (77).

La expresión del estro no siempre es claramente identificable, ya que se tienen hembras en estro sin manifestaciones de comportamiento receptivo y de las que si lo tienen, al menos en primíparas destetadas, el porcentaje de hembras capaces de concebir es bajo (102).

La utilización de la IA requiere de un excelente sistema de detección de estros y para que esta se lleve a cabo, se recomiendan rangos óptimos de 12 horas antes de la ovulación (11, 28, 32, 38, 103).

El momento de la ovulación no es conocido por el personal de la granja, por eso es que la detección de calores se sitúa en la observación vulvar y el reflejo de inmovilidad, este último, sólo se presenta en menos del 50% de las hembras en estro, sin la presencia del macho (11, 40). Se ha calculado que cada ciclo estral que pasa desapercibido, equivale a la pérdida de un lechón, y se conoce que la inseminación artificial puede causar una disminución del 10 % en la fertilidad y 0.7 lechones menos, en el tamaño de la camada (15, 32).

Soede, *et al.* (1994, 1995) mencionan que los resultados de fertilización están fuertemente relacionados con el intervalo entre inseminación y ovulación; el periodo de tiempo que ellos recomiendan es de 0 a 24 horas antes de la ovulación. Desafortunadamente el intervalo entre estro y ovulación es extremadamente variable, la ovulación puede empezar entre 24 y 52 horas después de que se presentan los signos de estro y puede durar solamente de 4 a 8 horas (112). Como consecuencia, frecuentemente ocurren fertilizaciones parciales (98).

Soede, *et al.* (1995) informan que el momento de la ovulación durante el estro, está fuertemente relacionado con la duración de este. Observaciones sobre el tiempo de ovulación después del inicio del estro mostraron gran variabilidad, pero conociendo el largo total del estro el tiempo relativo a la ovulación fue más constante (98).

Sería de gran utilidad, el tener registros de la duración total del estro por hembra y así conocer los tiempos de ovulación temprana o tardía, permitiendo de manera sencilla, segura y económica la detección de estos eventos. Para lograr este objetivo, es necesario conocer el inicio y el final del estro, o la predicción de la ovulación. Este tipo de conocimientos se han logrado con la utilización de métodos como la ultrasonografía transrectal, que puede dar información exacta de lo que ocurre a nivel del ovario, pero este método no es práctico ni económico, además, su uso se limita a la investigación (112). Existen otros métodos utilizados en la predicción de la ovulación, sin embargo, es necesario el conocimiento de los procesos reproductivos de la especie porcina para poder evaluar la aplicabilidad de dichos métodos (71).

La posibilidad de un método seguro y práctico, que permita la detección de procesos dentro de los ciclos menstrual y estral, ha motivado el estudio de los constituyentes fisiológicos y bioquímicos de algunos fluidos corporales (orina, moco cervical y la saliva), relacionados con el proceso reproductivo (23).

A partir de estos constituyentes fisiológicos y bioquímicos se encontraron unos mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos (GAGs) que están involucrados en la reproducción (22). Estudios por Oldeblat, (1952, 1954) y Zacharie (1958), citados por Ax (1979), sobre el fluido folicular empleando tinciones con azul de toluidina o autoradiografías de SO_4 , han mostrado que los mucopolisacáridos varían durante los ciclos ovulatorios, observándose una respuesta lineal relacionada entre la hormona foliculo estimulante (FSH) y la incorporación de sulfatos dentro de macro moléculas en ovarios de rata (8).

La participación de los GAGs en la reproducción, se ha observado en la maduración de los folículos ováricos (123). Bushmeyer, *et al.* (1985a) informaron que los GAGs durante la fase folicular en bovinos, representan un sensible indicador de la foliculogénesis.

La posibilidad de relacionar estas sustancias (GAGs) encontradas en un fluido corporal de fácil acceso (saliva), con el ciclo estral, podría ofrecer un conocimiento más cercano de los procesos bioquímicos en la reproducción porcina.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA REPRODUCCIÓN PORCINA

La cerda es un animal poliéstrico, es decir que repite estros o calores, a lo largo de todo el año en ausencia de gestación, lactación o algún trastorno endocrino o infeccioso (30, 59, 64). Con una duración del ciclo estral de 21 ± 3 días y gestación de 114 ± 3 días (38) (Figura 1).

Determinación del sexo: El sexo genético determina el desarrollo del sexo gonadal (59, 64). La corteza ovárica prolifera y las células germinales (ovogonias) se transforman en ovocitos y entran en fases tempranas de premeiosis, antes de separarse del mesénquima por una capa sencilla de células foliculares diferenciadas. Los folículos primarios permanecen en esta etapa hasta la pubertad (59).

Pubertad: En la práctica, un animal alcanza la pubertad cuando es capaz de liberar gametos y manifestar secuelas completas del comportamiento sexual (32, 59). La pubertad es el resultado de ajustes graduales entre el incremento en la actividad gonadotrópica y la capacidad de las gónadas, para iniciar en forma simultánea la gametogénesis y la esteroidogénesis (47).

Comúnmente la cerda exhibe el primer estro entre los cuatro a nueve meses de edad, usualmente en un peso de 85-90 kg. (67). Es durante el periodo prepuberal cuando aparecen los primeros folículos, sin embargo el desarrollo folicular completo y la reanudación de la meiosis de los ovocitos, así como la ovulación, se observan únicamente cuando las hormonas foliculo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH) han alcanzado los niveles de adulto (59).

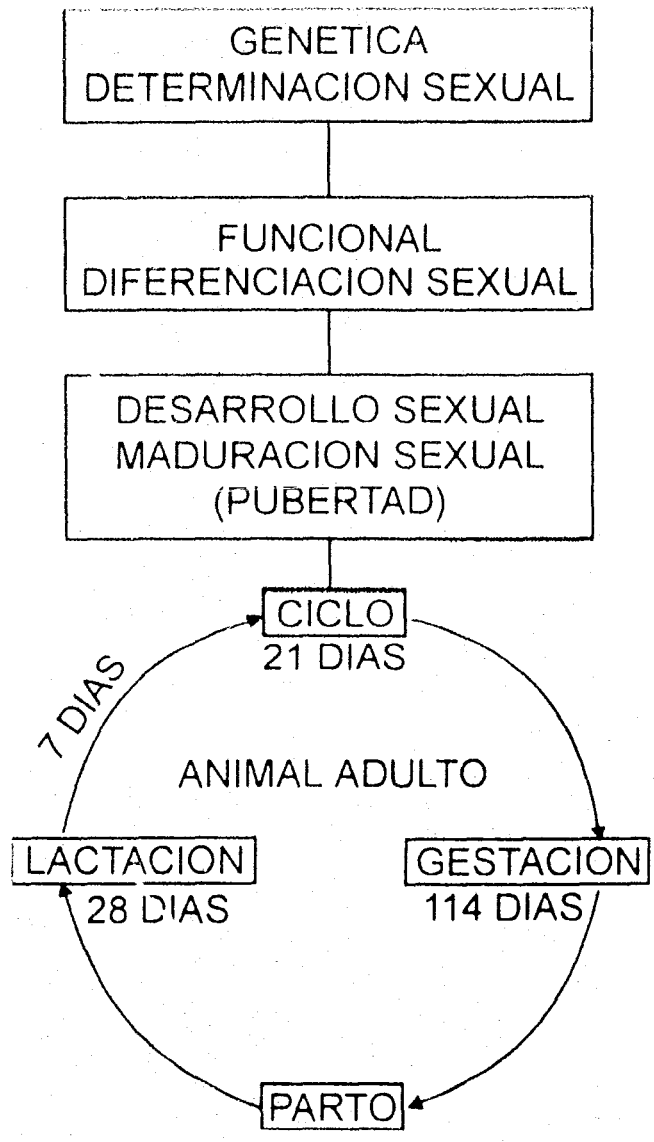


FIGURA 1. ESTADIOS DE LA REPRODUCCIÓN EN PORCINA, ELLENDORFF (40).

En el aspecto de selección de hembras púberes y la introducción de alguna raza más prolífica, como la Meishan, la caracterización de los eventos durante el estro es crucial; al respecto el periodo de los estados de foliculogénesis, maduración del ovocito y ovulación así como los eventos del desarrollo embrionario temprano, dependen de la habilidad para predecir exactamente el tiempo de la ovulación relativo al inicio del estro (66).

Se ha observado que la influencia de la edad a la pubertad en los hatos Europeos (27) afectan la precocidad sexual en todo el hato de reproductores.

Faillace *et al*, (1994b) Menciona que en la raza Meishan el intervalo entre estro y ovulación se presenta consistentemente con respecto a la edad reproductiva, estudios al respecto recalcan el hallazgo de que el intervalo de tiempo de la ovulación, permanece más grande en cerdas púberes que a edades reproductivas avanzadas (≥ 13 ciclos de estros). Wilmunt *et al*, (1992) y Signoret (1992) encontraron mayor periodo en cerdas Meishan el intervalo más grande es atribuible al hecho de que el pico de LH ocurre más tardíamente en esta raza, demostrando consistentemente que la duración del inicio del estro a la ovulación en razas europeas es más corta.

Por lo que la cronología de los eventos durante el estro en las cerdas púberes es crucial para estudios de prolificidad, donde la mayoría de los experimentos dependerán de la especialización y habilidad para predecir exactamente el tiempo de inicio del estro, ovulación y subsecuente fertilización (47).

CICLO ESTRAL

El estro se caracteriza por cambios graduales en los patrones de comportamiento (inquietud, montar a otras hembras, reflejo de inmovilidad), manifestaciones en vulva (edematización y enrojecimiento) y la presencia de secreción mucosa en algunas ocasiones (59). La ciclicidad es usualmente cada 20 - 22 días pero el

intervalo puede extenderse de 18 - 24 días, esta duración puede ser alterada además de factores fisiológicos (preñez, disfunción endocrina) o infecciosos, factores medio ambientales como la temperatura, manejo y condiciones extremas de alimentación (96).

Las cerdas jóvenes presentan un periodo cíclico más corto que las adultas, usualmente este periodo es de 40 - 70 horas. Durante este tiempo, además de llevarse a cabo una serie de manifestaciones morfológicas, es la etapa en la cual la hembra es receptiva al macho y acepta la monta (64, 66).

El ciclo estral suele dividirse en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro; otros autores prefieren dividirlo en dos fases: folicular y luteínica. En cualquiera de las dos clasificaciones el estro es el momento que señala el inicio del ciclo (66). La primera clasificación se desglosa como:

Proestro: Es cuando el animal exhibe un incremento en la excitación sexual bajo la influencia del aumento en las secreciones de estrógenos foliculares debido al rápido crecimiento de los folículos ováricos (102).

Estro: Corresponde al periodo de receptividad y es especialmente manifiesto por el reflejo de inmovilidad. La etapa del servicio de inseminación del Internamente es cuando los folículos alcanzan su mayor tamaño y hacia el final de esta etapa ocurre la ovulación (85, 102).

Metaestro: Es el más corto, es la fase pos-ovulatoria y es cuando el comportamiento sexual se ve disminuido por la influencia de la progesterona y se desarrolla el cuerpo lúteo (14).

Diestro: Sin manifestaciones de comportamiento sexual, la hembra es refractaria al macho. Constituye la porción más larga del ciclo. Es cuando el cuerpo

lúteo alcanza su máximo desarrollo y hacia el final de esta fase se inicia el proceso de regresión del mismo (14).

Clasificación por fases desde el punto de vista ovárico:

Fase folicular: Esta fase dura de cinco a seis días, abarca proestro y estro, desde la involución del cuerpo lúteo hasta la ovulación. Esta corta fase no refleja la duración prolongada del crecimiento de los folículos de Graaf. Durante este periodo los folículos de Graaf incrementan su diámetro de 4 - 5 mm. en el día 15 del ciclo, al diámetro pre-ovulatorio de 9 - 11 mm en el día 21 (64). El número folículos pre-ovulatorios almacenados en un ciclo, se reducen durante la ovulación, y el tiempo en que transcurre la selección ovulatoria es en el que se establece el estro (59).

La concentración de estrógenos en plasma periférico se incrementa de 10-30 pg ml⁻¹ a 60-90 pg/ml⁻¹, es en este periodo de seis días, durante el cual ocurre la maduración de los folículos (66). El pico pre-ovulatorio de LH puede alcanzar concentraciones en suero de 4-5 ng/ml⁻¹, ocurriendo la ovulación de 40-48 horas después de este pico. La mayoría de los estudios mencionan que la ovulación ocurre de 35-36 horas después de establecerse el estro, esto puede ser compatible con lo mencionado anteriormente de 40-48 horas, pero puede ser un error en detectar el inicio del estro (65).

Fase luteínica: Tiene una duración de 14- 15 días, durante esta fase los cuerpos lúteos se desarrollan y se mantienen, abarca el metaestro y diestro. La concentración de progesterona se incrementa desde valores pre-ovulatorios <1.0 ng/ml⁻¹ a niveles de 20-35 ng/ml⁻¹ durante la fase lútea en el plasma periférico, declinando nuevamente en forma abrupta durante los días 15 y 16 del ciclo, durante esta fase se traslapa el desarrollo temprano de los folículos. Así la duración del ciclo estral esta estrechamente relacionada con la duración de la fase lútea (65).

ENDOCRINOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL

El ciclo estral está regulado por mecanismos endócrinos y neuroendócrinos, por hormonas hipotalámicas, gonadotropinas y esteroides secretados por el ovario (64) (Figura 2).

La regulación de la secreción de las gonadotropinas durante el ciclo, necesita de un balance entre las diversas interacciones de los complejos hormonales. El componente principal es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), secretada en el hipotálamo, la liberación y velocidad de degradación, son factores que modifican adicionalmente su papel en la liberación de gonadotropinas hipofisarias (58, 59).

Acerca de éstas, los cambios en las concentraciones sanguíneas de la hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona lúteinizante (LH) evidencian que las gonadotropinas juegan un papel en la iniciación y mantenimiento del crecimiento folicular, selección de los folículos dominantes y su maduración hasta el estado pre-ovulatorio y también las alteraciones en el número y tipo de receptores para gonadotropinas en las células de la granulosa y teca, así como de la secreción de productos esteroidales y no-esteroidales de estas células en respuesta a la estimulación de las gonadotropinas (107).

Se conoce que la FSH provoca el desarrollo folicular y la LH el crecimiento y maduración de los ovocitos, lo que permite que estos lleguen a la ovulación. El pico preovulatorio de la LH coincide con el inicio del estro, y el momento en el que ocurre es utilizado como una buena predicción del tiempo de la ovulación (98).

En el ovario, el ciclo estral se caracteriza por una secreción elevada de estrógenos a partir de los folículos preovulatorios de Graaf (65). La modificación de la acción de las hormonas esteroidales en el útero parece estar regulada por la

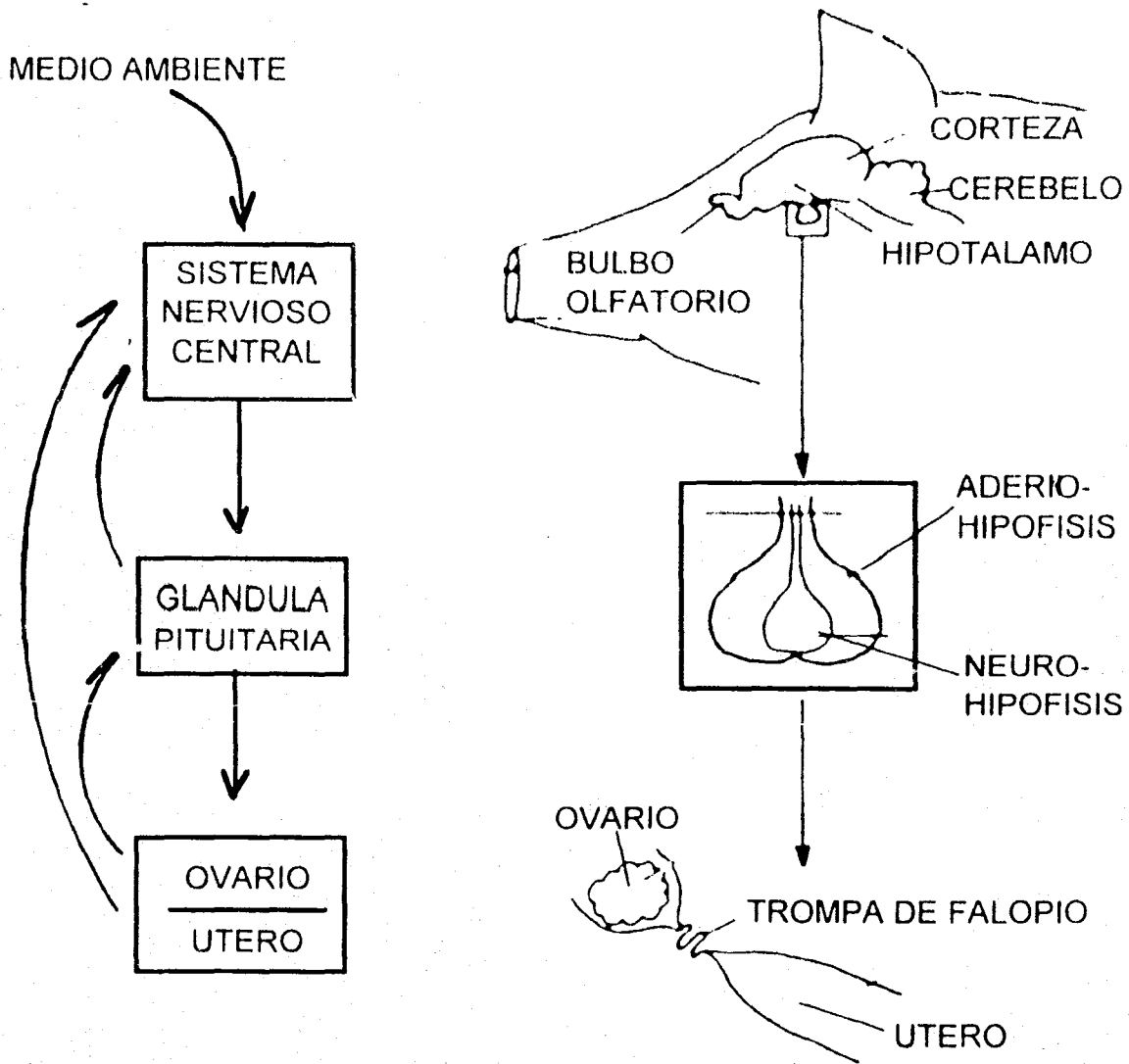


FIGURA 2. REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA CERDA, ELLENDORFF (40).

concentración de receptores de estrógenos y progesterona que varían a lo largo del ciclo estral. Desde el periodo del proestro hasta el inicio del metaestro hay gran concentración de receptores citoplásmicos endometriales de estrógenos (esta hormona provoca que la cerda entre en celo e induce la liberación de LH) (65).

Al final del estro ocurre la ovulación seguida de la formación del cuerpo lúteo lo que propicia la síntesis de progesterona, el nivel de esta hormona es bajo durante el proestro y estro, aumentando gradualmente. Presenta un pico de secreción a la mitad del diestro (59, 64). Los niveles de hormonas en sangre fluctúan continuamente, lo cual refleja la condición dinámica del sistema reproductivo durante el ciclo. Estos cambios se muestran en la Figura 3.

No obstante el crecimiento folicular no puede ser explicado enteramente solo por los cambios en las concentraciones de gonadotropinas. En este contexto las gonadotropinas son necesarias, pero no suficientes por ellas mismas en la explicación del ciclo ovárico (105).

En años recientes, varios reguladores intragonadales se tienen bien identificados y caracterizados (Inhibina, Activina, Folistatina, Proteínas reguladoras del folículo, Factores de crecimiento, Activador del Plasminógeno y Glicosaminoglicanos) pero su función aún es incierta (37).

Inhibina: Esta fue identificada en el fluido folicular de cerdas y de otras especies (120). La inhibina es producida *in-vitro* por células de la granulosa de folículos de cerda (3). En la cerda los niveles de la inhibina se incrementan en suero durante la fase folicular, continuando por aproximadamente seis días (60). Las concentraciones de FSH en suero son inversamente relacionadas a los valores de inhibina durante la fase folicular. Las concentraciones de inhibina disminuyen con la aparición de la LH y posteriormente muestran dos picos durante la fase lutea, indicando que la adición del CL a las células de la granulosa son la fuente de la

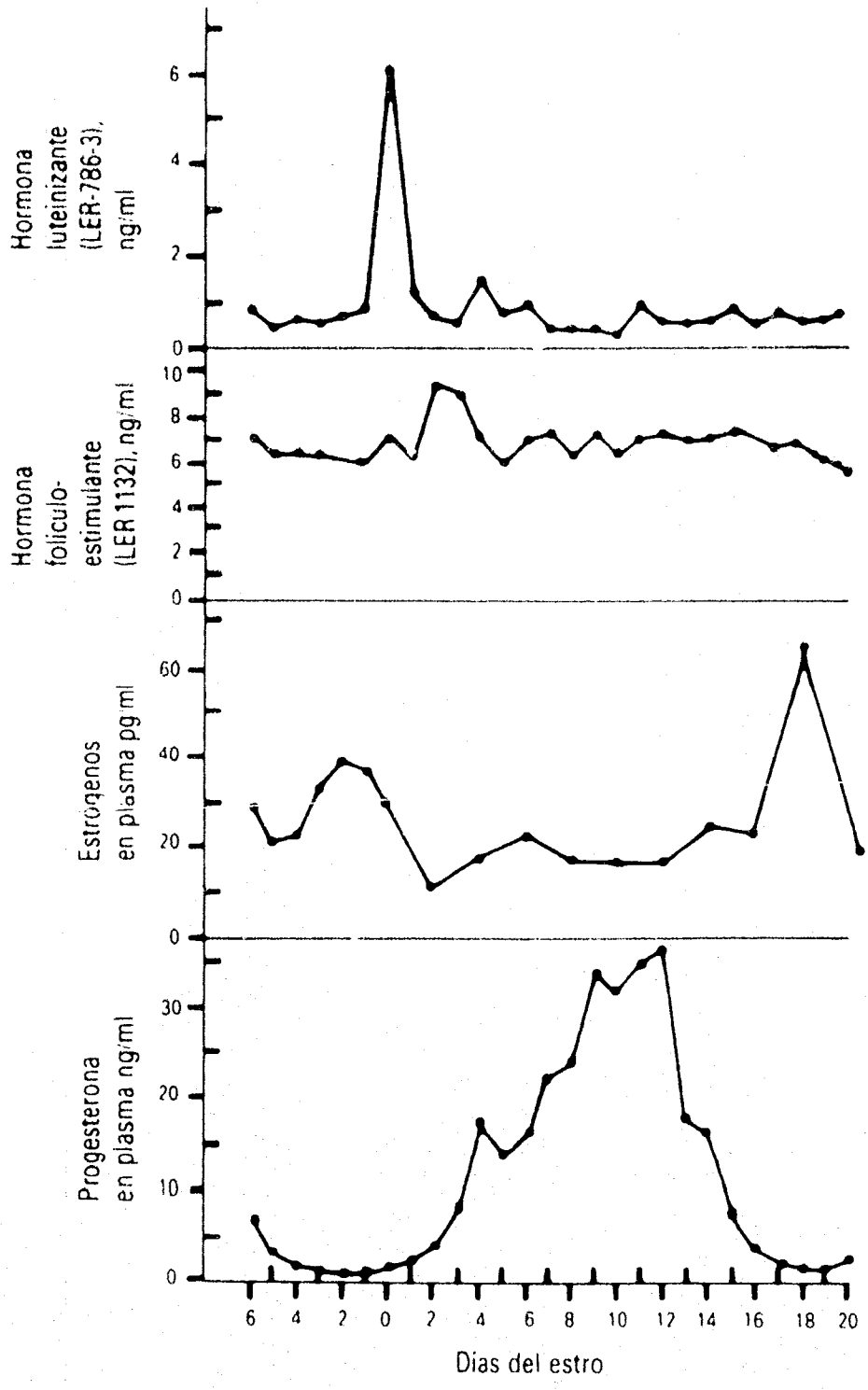


FIGURA 3. NIVELES HORMONALES DEL CICLO ESTRAL, VALENCIA (109).

inhibina. El papel fisiológico extragonadal de la inhibina es desconocido, pero ella puede regular la actividad celular local (107).

Activina: En purificaciones de fluido folicular para inhibinas se produjo un efecto estimulador de FSH en pituicitos *in vitro*. Esto descubrió que la actividad estimuladora estaba en dímeros de la inhibina (76). Se les llamó Activina y Activina-A, las cuales forman equipo y tienen la habilidad de aumentar la secreción de FSH a manera de dosis dependiente *in vitro*, afectando la secreción de LH, ella puede alterar los eventos de estímulo-gonadotropinas (68). La función fisiológica de esta proteína en la maduración folicular aún es incierta (107). Receptores para Activina en las células de la granulosa de rata generalmente aumentan en número después de la estimulación con gonadotropinas (76).

Folistatina: La Folistatina es una cadena simple de péptidos, que ha sido aislada del fluido folicular de cerdas (120). Después de la exposición de los pituicitos de rata a la folistatina, los niveles de FSH intracelular disminuyen, pero no al grado como sucede con la inhibina, esto sugiere que la folistatina está involucrada en la supresión de la liberación de la FSH, por lo tanto la regulación de síntesis y secreción de FSH está regulada por GnRH del hipotálamo y por factores esteroidales y no esteroidales del ovario (106).

Proteínas reguladoras del folículo: Una proteína referida como proteína reguladora del folículo (FRP), la cual inhibe la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa, ha sido identificada en el fluido folicular de cerdas y otras especies (37).

Altos niveles de FSH intrafolicular reducen la acción de FRP y pueden incrementar la aromatización granulosa y producción de estrógenos (106). La FRP puede modular otras actividades FSH - responsables en las células de la granulosa de las cerdas (inducción de receptores de LH/HCG, formación de AMPc) la exposición

a cantidades elevadas de FRP resulta en supresión de la maduración folicular(106) La habilidad del FRP de modular la respuesta folicular es consistente con la hipótesis de que los efectores paracrinos son mediadores principales de la foliculogénesis en presencia de gonadotropinas (106).

Factores de crecimiento: Factores de crecimiento similares a la Insulina (IGFs) encontrados en el líquido folicular de cerdas, promueven la replicación de las células de la granulosa cultivadas (106)

Las gonadotropinas, estrógenos y AMPc , estimulan la secreción inmunoreactiva de IGF por las células del ovario. Los Factores de crecimiento producidos por la teca y granulosa surgen localmente durante la esteroidogénesis y la diferenciación folicular (106).

Activador Plasminógeno: El tipo tejido (T-PA) y tipo uroquinasa (U-PA) activadores plasminogenos, son producidos por las células foliculares. Las células de la granulosa producen predominantemente (T-PA) y las células de la teca secretan (U-PA), esta producción es regulada por gonadotropinas.

La ovulación parece necesitar ambos tipos de activadores de plasminógeno para la ruptura del folículo y permitir el paso del ovulo fuera del ovario (106).

Glicosaminoglicanos: Los primeros glicosaminoglicanos (GAGs), identificados en el fluido folicular fueron: el Condroitin sulfato, Heparan sulfato y el Dermatan sulfato (7). Las concentraciones de GAGs difieren durante el desarrollo folicular. El Heparan sulfato se une más a las células de la granulosa de los folículos pequeños que a células de los folículos más grandes (17), mientras que concentraciones de Condroitin sulfato decrecen con el incremento de la talla folicular en vacas y cerdas y altas concentraciones se mantienen cuando estos animales no muestran el pico de la LH (12).

Wise and Maurer (1994) describen la importancia de los glicosaminoglicanos en el desarrollo del crecimiento celular, la maduración del ovocito, y la respuesta de los receptores para la FSH y LH. Los niveles de GAGs son inversamente proporcionales a las concentraciones de estradiol y progesterona del fluido folicular (7), las concentraciones de Heparan y Condroitin sulfato decrecen antes del momento en que el estradiol se incrementa y así una reducción en las concentraciones de GAGs puede ser necesaria para el crecimiento folicular y maduración del ovocito (7).

FOLICULOGÉNESIS

El folículo es un compartimiento ovárico que permite al ovario cumplir con su doble función, la gametogénesis (producción cíclica de óvulos fecundables) y la esteroidogénesis (producción de hormonas esteroides en una relación equilibrada) (59, 67).

El crecimiento del ovocito puede dividirse en dos fases; la primera, en la cual el ovocito crece hasta su máxima talla, simultáneamente la multiplicación de las células foliculares ocurren. En la segunda fase el ovocito incrementa su talla muy lentamente, pero el folículo crece rápidamente en tamaño. La secreción folicular comienza a partir del crecimiento folicular y el espacio intracelular se desarrolla (antro) (30).

Los folículos ováricos se han podido clasificar en:

Folículo primario: Un ovocito encerrado en una sola capa de células foliculares, rodeados de tejido intersticial.

Folículo en crecimiento: Ovocito con aumento en diámetro y número de células foliculares.

Folículo secundario: Las células de la granulosa adquieren un aspecto poliédrico.

Folículo terciario: Influenciado por las gonadotropinas hipofisarias, células de la granulosa inician su secreción de líquido folicular, formándose el antro. La zona pelúcida se encuentra rodeada por una masa sólida de células foliculares que forman la corona radiada.

Folículo de Graaf: Las células foliculares aumentan de tamaño; el antro se llena de líquido folicular. el ovocito es rodeado por células foliculares (cúmulo ooforo), se encuentran ya formadas las capas de la granulosa, teca interna y teca externa.

Folículo pre-ovulatorio: Cuando una estructura sale del ovario en forma de vesícula, el ovocito se sitúa en el líquido folicular y se le encuentra rodeado de una masa irregular de células. Se detectan cambios marcados, particularmente en el aparato de Golgi, que intervienen en la formación de la zona pelúcida y granos corticales, en el ovocito se reanuda la meiosis varias horas antes de la ovulación.

Cuerpo Hemorrágico: La cavidad folicular se llena de sangre y de linfa proveniente de los vasos rotos de la teca. Esto actúa como un tapón, sellando la cavidad.

Cuerpo lúteo: Después de la ovulación la transformación de un folículo roto en cuerpo lúteo incluye la formación de pliegues característicos de la granulosa hacia la porción central de la cavidad; la luteinización ocurre por la influencia de la LH. Poco después de la ovulación existe una rápida proliferación de la granulosa primaria y de algunas células de la teca que cubren la pared folicular, estas células se luteinizan formando el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo mantiene la producción de progesterona durante el

ciclo hasta el día 16 y después disminuye rápidamente hacia la regresión formando el cuerpo albicans (59, 64).

Cuerpo albicans: En la fase terminal del ciclo existe un incremento en el número de lisosomas, en la vacuolización del retículo endoplásmico liso y la invasión de tejido conectivo, lo que conforma el cuerpo albicans, tejido fibroso blanco formado en el cuerpo lúteo posterior a las ovulaciones (64).

Existen reportes indicando que en cerdas el incremento de folículos preovulatorios o la presencia de numerosos folículos pequeños durante el ciclo estral no afectan los niveles de LH en suero (50, 57). La evolución de los folículos hasta la ovulación continua durante la fase folicular, por lo que se promueve el desarrollo de los más pequeños y no es inhibido por los grandes. El crecimiento del folículo hasta la etapa de formación del antro no es estrictamente dependiente de gonadotropinas (59). Análisis de esteroides sexuales no revelaron una relación entre el promedio de las concentraciones hormonales y los tipos de ovarios (16).

La fase del crecimiento folicular esta caracterizada por la secreción del fluido folicular, particularmente de mucopolisacáridos (GAGs) producidos principalmente por las células de la granulosa, y estos muestran la secuencia de incorporación de radicales sulfatados por los folículos. El rápido crecimiento preovulatorio es caracterizado por las modificaciones de la permeabilidad en la barrera sangre-fluido folicular (30).

La habilidad de los folículos grandes para ovular es debido a una adecuada relación entre el volumen del antro y la masa celular (65). El líquido folicular del antro esta separado de la teca vascularizada por la membrana basal y contiene esteroides y glicosaminoglicanos, así como muchos metabolitos KA^+ y Na^+ . Algunos componentes son activos desde el punto de vista fisiológico, y entre ellos se encuentra el ácido condroitin-sulfúrico (65).

El líquido folicular que se encuentra entre las células de la granulosa es viscoso y rico en ácido hialurónico, heparina y sus sulfatos (GAGs), este líquido se acumula a medida que se acerca la ovulación (59). Sólo algunos folículos con antro diferenciado crecen hasta llegar a la ovulación; los otros sufren atresia y degeneración. Se ha observado que la concentración de FSH cerca del término de la fase folicular tiene relación con el grado de atresia (64).

La FSH puede prevenir o bien estimular la atresia folicular, la LH tiene una acción más potente que la FSH en el crecimiento folicular, incrementando los receptores de FSH a partir de estrógenos en folículo (30).

Rayford y col. (1974) observaron que en cerdas existía un segundo aumento de FSH 20-30 horas después de la producción súbita preovulatoria de FSH y LH, este aumento pre-ovulatorio induce la formación del antro del segundo grupo de folículos con antro, y el tiempo que transcurre desde la formación de este a la ovulación es de 17-24 días.

La capacidad del folículo en desarrollo, de segregar altas concentraciones de estrógenos que estimulan el crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa son aspectos importantes en la selección de un folículo dado para que madure y termine en ovulación. La interrupción en la producción de estrógenos en cualquier etapa del ciclo estral causa atresia de los folículos (56).

Atresia folicular: Los folículos ováricos sufren cambios degenerativos en los que pierden su integridad. Casi todos los ovocitos se pierden en etapas variables de su crecimiento así como durante todas las fases del ciclo ovárico; pérdida que se presenta con mayor frecuencia en etapas avanzadas del desarrollo folicular (59). La atresia se relaciona con diversos cambios morfológicos, bioquímicos e histológico que varían mucho con la etapa del crecimiento del folículo. La

degeneración se acompaña de pérdida del ovocito, células de la granulosa y receptores de diversas hormonas, que dejan como residuo a las células tecales, que son células glandulares con características de tejido esteroideógeno (56).

Los cambios a nivel de ovario son visibles objetivamente sólo a través de los signos de estro, manifestándose más claramente durante las fases de proestro, estro y diestro (85).

OVULACIÓN

La ovulación es un fenómeno espontáneo en cerdas. La FSH inicia la formación y maduración del folículo de Graaf; al mismo tiempo induce el incremento en la síntesis de estrógenos ováricos. El resultado del aumento en los estrógenos circulantes es el disparar la descarga de LH preovulatoria la cual induce la ovulación. Esta respuesta ovulatoria del folículo consiste en tres componentes básicos:

- 1) Alteraciones en la esteroidogénesis, lo que convierte al folículo de una secreción primeramente de estrógenos a una secreción de progesterona.
- 2) Reanudación de la meiosis en el ovocito primario.
- 3) Ruptura del folículo seguido por expulsión del huevo encerrado en la masa del cúmulus (1).

Se observan a través de toda la pared del folículo las modificaciones en la red vascular, con una progresiva hemorragia y degradación capilar que coincide con la invasión de las capas de la granulosa posteriores al rompimiento de la membrana basal, y esto promueve el arranque de las gonadotropinas hipofisarias preovulatorias, seguido de una degradación progresiva de la región apical del folículo dando una apertura con o sin la formación superior de un estigma, que le continúa por una descarga rápida de un fluido no viscoso y después la salida de

una porción viscosa del fluido folicular junto con la masa del cumulus que rodea al huevo (59).

La ruptura del folículo fuera del ovario implica interacciones entre el epitelio del órgano y la pared folicular subyacente. Antes de la ovulación los lisosomas se diferencian y crecen en las células epiteliales que cubren al folículo. Al romperse los lisosomas, el estigma se adelgaza haciendo protusión hacia la superficie del ovario. Durante la ovulación, el estigma saliente se rompe de su ápice y libera algo del líquido folicular y la masa de glucoproteínas viscosa que rodea al ovocito (30, 59) Figura 4.

SIGNOS DEL ESTRO

Los signos de estro son aquellas manifestaciones de comportamiento sexual y cambios morfológicos del aparato genital femenino que muestran la inminencia del periodo de receptividad a la cópula (102).

Las cerdas no muestran normalmente signos de estro y ovulación durante la lactación. Es después del destete cuando el desarrollo folicular es muy rápido culminando con el reflejo de cabalgue y la ovulación (90). Las cerdas expresan su primer estro dentro de la primera semana pos-destete, las concentraciones del 17 β -estradiol en la vena utero-ovárica se incrementan de 24 - 56 horas después de este (90).

Los síntomas del primer estro pos-destete son débiles y esto podría explicarse en parte por la alta frecuencia de cerdas primíparas que no muestran estro detectables en la primera ovulación posterior al destete. A partir de estudios sobre los signos de estro en cerdas jóvenes (39), se conocen que los cambios vulvares de enrojecimiento y edematización difieren con el número de estros, y en adultas

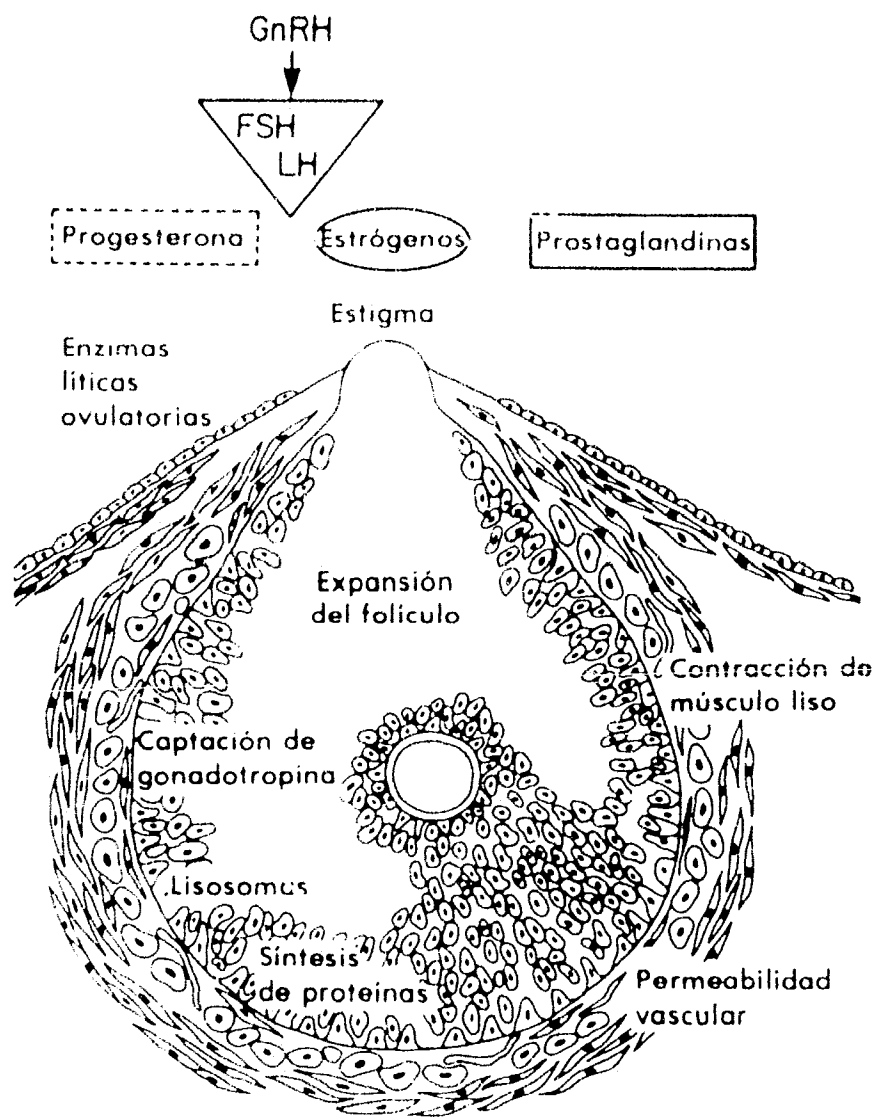


FIGURA 4. SÍNTESIS DE LOS PROCESOS BIOQUÍMICOS EN LA OVULACIÓN. HAFÉZ (58).

(más de dos partos) son poco notorios (15) y casi imperceptibles cuando la lactancia dura menos de tres semanas (85).

La secreción del moco cervical y vaginal es escasa y muestra poca variación a lo largo del ciclo. Con relación a los aspectos etológicos de la conducta sexual, se conoce que las hembras tienen mayor actividad locomotriz, la cual se incrementa al doble, durante el inicio del celo, tienen menos apetito y emiten vocalizaciones específicas (85).

La hembra en estro, busca el contacto con el macho, el cortejo sexual incluye una serie de contactos: naso-nasal, naso-genital e intentos de erotización por el macho que golpea moderadamente con el hocico los flancos de la cerda (109), en respuesta, la hembra muestra el reflejo de inmovilidad. En ocasiones se observan movimientos rítmicos de las orejas (96). Durante el cortejo el verraco saliva profusamente y emite feromonas de las glándulas salivales submaxilares que junto con las secreciones prepuciales contribuyen a la inducción del reflejo de inmovilidad (97). Secuencia observada en la Figura 5.

El celo alcanza su máxima actividad conductual hacia el segundo día, el reflejo de inmovilidad es más intenso (97), esto ha sonado siempre como una regla a seguir, pero estudios posteriores han demostrado que no todas las hembras presentan al segundo día este reflejo ya que la relación reflejo inmovilidad-ovulación están estrechamente relacionados con lo largo de la duración del estro (101). Motivo por el cual se han desarrollado métodos de detección del estro, para su utilización en combinación con la experiencia del encargado del área de reproductores.

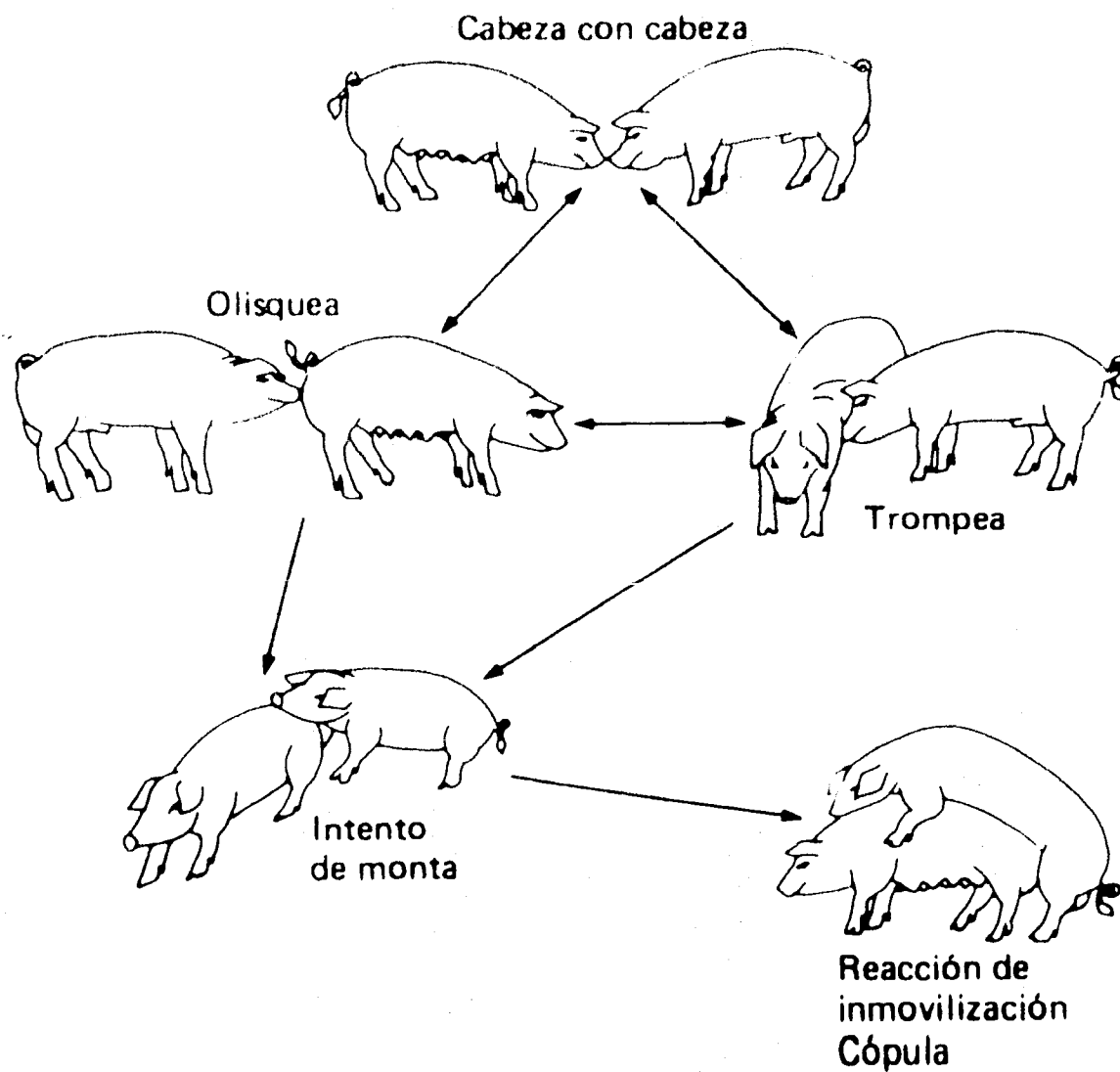


FIGURA 5. CORTEJO SEXUAL, VALENCIA (109).

MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE ESTRO Y OVULACIÓN

La detección del estro tiene como objetivos:

- 1) Que las actividades de inseminación artificial o monta controlada se realicen en un momento apropiado con relación a la ovulación.
- 2) La oportuna incorporación de animales jóvenes que han madurado y las hembras post-parto para que reanuden sus ciclos productivos (85). El conocer el inicio del estro con una mayor exactitud, ofrece una mejor predicción de la ovulación y se puede adecuar el momento del servicio, con el consiguiente aumento en las tasas de concepción (29). Asimismo, la identificación oportuna del calor en relación al parto o destete, posibilita un primer servicio tendiente a mantener el intervalo parto-concepción dentro de los márgenes recomendados (99). Por lo que el estudio de la detección del estro o la ovulación, continúa y se pueden dividir en:

VISUALES

Que se apoyan en el comportamiento sexual y los cambios morfológicos de los genitales externos de la hembra.

a) Comportamiento: La receptividad sexual es manifiesta por la búsqueda del macho, el reflejo de inmovilidad (actitud de no moverse de la hembra si recibe empuje en el tren posterior), posición de las orejas, montas a otras hembras. De estos signos el más utilizado por los encargados del área de reproductores, es el reflejo de la inmovilidad pero solo el 50% de las hembras en celo lo manifiestan sin presencia del macho adulto, por lo que es importante relacionar estos signos con los cambios vulvares (102).

b) Cambios vulvares: La edematización y enrojecimiento de la vulva es un indicativo de gran importancia en el estro de las cerdas, pero estos cambios difieren con el número de estros, y el número de partos de cada cerda, siendo poco notorios en hembras multiparas (72).

c) Viscosidad del moco cervical: El moco cervical es un hidrogel que tiene una composición heterogénea debido a los componentes de alta y baja viscosidad, la fracción de baja viscosidad se conoce que al inicio del estro es fluido, acuoso a la mitad del ciclo y viscoso al final. La disminución de viscosidad ocurren durante el estro y la ovulación y se invierte durante la fase lútea, cuando se inhibe la penetración del espermatozoides al cuello uterino (59). Estas características presentan variabilidad por individuo.

d) Cristalización del moco cervical: El moco cervical durante el estro muestra un patrón de cristalización en forma de helecho al someterlo al secado sobre un portaobjetos (59), la secreción del moco cervical es estimulada por estrógenos e inhibida por la progesterona (85). Resulta difícil la interpretación diferencial al inicio y al final.

INSTRUMENTALES

Utilización de equipo o aparatos para la detección de ovulación.

a) Temperatura: La temperatura rectal es utilizada para determinar el momento de la ovulación en humanos, pero esta puede ser influenciada por el estado de salud, temperatura ambiental y la hora del día. Sus valores por si solos no dan predicciones de ovulación exactos en animales, por lo que es necesario relacionarlo con otros signos (71).

b) Resistencia eléctrica: Los cambios ocasionados por el cloruro de sodio y otros electrolitos presentes en el moco vaginal, modifican la respuesta eléctrica (RE), encontrando la posibilidad de detectar estos cambios no solo a lo largo del estro sino también durante este, ya que la resistencia eléctrica es más baja durante el celo y una disminución mayor parece coincidir con el momento óptimo de la inseminación (89). Estudios de mediciones durante el ciclo estral en la vaca, han demostrado que existe una relación directamente proporcional entre los niveles de progesterona y las lecturas de la resistencia eléctrica (19, 71).

En un estudio comparativo de dos instrumentos para medir la RE, el Walsmeta MKIV (producto de importación) y el Ovogest (de fabricación nacional), refieren que existe la ovulación en cerdas de 16 a 32 horas de iniciado el estro, estos instrumentos no se han utilizado en forma rutinaria en la práctica de las granjas, por su alto costo y la probabilidad de diseminación de enfermedades (71).

c) Resistencia eléctrica vaginal y salival (humanos): Los cambios en la resistencia eléctrica vaginal (REV) y salival (RES), se han medido para determinar el tiempo de la ovulación en humanos. Se observó la presencia de una elevación en la RES de 7 a 6 días antes del pico de LH, por otra parte se observó una elevación en REV que coincidió con el día del máximo nivel de LH y fue positivamente significativo correlacionado con el día de máxima temperatura rectal.

El pico de RES y REV ofreció un tiempo correcto de inseminación de 93.3% en 14/15 ciclos hormonalmente normales. Estos reportes indican la existencia de altas relaciones entre RES, REV y ovulación (48).

d) Ultrasonografía: La sonografía transcutánea y transrectal son métodos confiables, y repetibles para observar los cambios ováricos en las cerdas con estro espontáneo. Es necesario hacer énfasis que su uso principalmente está dirigido a la investigación y clínica (112). Soede *et al.* (1995) observaron en cerdas púberes utilizando la ultrasonografía transrectal que el tiempo óptimo de la

inseminación es de 0 a 24 horas antes de la ovulación. Estos métodos no se han difundido mucho en la práctica por su alto costo y poca aplicación al trabajo en granjas.

LABORATORIO

Análisis de los cambios hormonales en suero y saliva para predecir la ovulación.

a) Radio-inmunoensayo (en suero sanguíneo): La técnica de radio-inmunoensayo ha representado el avance más significativo en la endocrinología durante los últimos treinta años (22), permite la rápida revisión de un número elevado de muestras que contengan bajas concentraciones de hormonas (59).

La oportunidad de medir la descarga de LH da una buena predicción del tiempo de ovulación, la cual ocurre 30 ± 3 horas después (99). Una elevación en la concentración de progesterona 1 ng/ml , por encima de las concentraciones basales, también da un estimado relativamente bueno retrospectivamente al tiempo de la ovulación, la cual ocurre 13 ± 4 horas después de esta elevación (87). Estos análisis son muy efectivos pero su uso es muy costoso, poco práctico y es necesario personal especializado en la toma, manejo y lectura de las muestra que principalmente se trabajan con suero sanguíneo tomado por veno-punción (87).

b) Radio-inmunoensayo (en saliva): El potencial de ventajas en la medición de concentraciones de algunas hormonas en saliva son principalmente:

1. No es un método invasivo (veno-punción).
2. Es libre de estrés.
3. Las colecciones son simples y fácilmente repetibles.
4. Reflejan la actividad biológica.

La saliva no se forma únicamente por ultrafiltración pasiva del plasma, sino más bien por un proceso activo de consumo energético. Células acinares que forman la pieza final de la glándula salival, bombea iones de potasio de la sangre al lumen de estas células, el resultado de las diferencias en la presión osmótica, causa el flujo de agua desde la sangre. Esta primera secreción es isotónica con el plasma. Muchos compuestos orgánicos están presentes en saliva como la urea, glucosa, esteroides y lípidos, que usualmente muestran concentraciones menores a los encontrados a nivel plasmático (88, 110).

El transporte de proteínas dentro de la saliva ha sido estudiado por Young (1978) y menciona que las proteínas más abundantes en saliva son, las enzimas y las glicoproteínas específicas, pero hasta el momento solo se han encontrado en niveles traza (110).

El transporte de hormonas de la sangre a la saliva se realiza por difusión pasiva intracelular, ultrafiltración y secreción activa (110). Estudios con inyección intravenosa de cortisol y aldosterona en la relación con su presencia en saliva, demostraron para ambas hormonas que en saliva se incrementan los niveles de estas dentro de un minuto posterior a la inyección (110).

Las respuestas biológicas de las hormonas esteroides están medidas por un sistema de receptores específicos en los tejidos blancos (74). Estudios de Lain y Tenovuo (1983) reportan la presencia de receptores para estrógenos en las glándulas salivales de la rata, pero esto no es conocido en el humano (74).

Los factores que controlan las interrelaciones dinámicas entre las concentraciones en plasma y saliva quedan por determinarse (88). generalmente es aceptado que la transferencia es por una rápida y análoga ultrafiltración. Basándonos en el modelo de Ekins (1981) citado en Riad-Fahmy, 1982 (88), la velocidad de

liberación de algunos tejidos, es gobernada por la concentración de hormona libre en plasma, que se a medido in-vitro.

Por lo que la transferencia de hormona a la glándula salival depende de las concentraciones de las hormonas libres y las ligadas a proteínas (88). Las más abundantes proteínas en saliva son, enzimas y las glicoproteínas específicas de la saliva (110).

Las posibles rutas por las cuales algunas hormonas son detectadas en saliva se resumen en:

1. Difusión intracelular pasiva: Materiales altamente solubles en lípidos (entre ellos esteroides), que pueden difundirse dentro de las células acinares de las piezas finales secretoras en la glándula salival por virtud de la solubilidad en las células de las membranas ricas en lípidos.
2. Ultrafiltración: El peso molecular es el factor más determinante de la proporción de saliva.
3. Secreción activa: Un mecanismo de transporte activo, claramente ópera en muchos electrolitos y algunas proteínas como las IgA (110).

Intentos por determinar los posibles efectos de los cambios hormonales durante el ciclo menstrual en la secreción de la saliva y algunos de sus componentes han sido realizados. La actividad de la fosfatasa alcalina en saliva ha mostrado incrementos durante la ovulación (104), los estrógenos no conjugados están presentes en la saliva humana en las glándulas parótidas y submaxilares. En ratas adultas la distribución y tamaño de los túbulos glandulares en la glándula submaxilar son afectados por los estrógenos (104). Considerable variación en muchos componentes ha sido observada durante los ciclos menstruales, el incremento de la actividad tiende a coincidir con el incremento en suero de los niveles de estrógenos (26, 104).

Los estudios de niveles de progesterona requieren de múltiples muestreos y las mediciones en saliva facilitan enormemente la medición de esta hormona. Un grupo numeroso de investigadores han examinado la relación entre los niveles de progesterona en plasma y saliva, donde ellos encontraron una excelente correlación entre los dos fluidos, concluyendo que las mediciones en saliva tienen un gran potencial para reemplazar las mediciones plasmáticas en la aplicación clínica y de investigación representando este tipo de muestreo una alternativa muy práctica (110). Esto para la clínica humana, pero en Medicina Veterinaria es necesario encontrar métodos sensibles y de aplicación práctica.

c) Actividad enzimática: La actividad salival de la n-acetil- β -D-glucosaminidasa muestra un patrón característico de cambios durante el ciclo menstrual con una elevación marcada durante los días 13, 14 y 15 anteriores a la próxima menstruación. Esta elevación de la actividad enzimática en ciclos normales, coincidió con la máxima temperatura corporal basal y estuvo ausente en las mujeres con ciclos anovulatorios, esto sugiere que pueden utilizarse las enzimas como un posible indicador de ovulación (91).

d) Glicosaminoglicanos: También llamados GAGs o mucopolisacáridos ácidos, encontrados en todo el cuerpo de algunos mamíferos (humano, rata, cerda, novilla y primates), han mostrado relación con los ciclos reproductivos en estas especies. Bajo la suposición de que los GAGs en el tracto reproductor femenino, son regulados por la circulación sistémica de las hormonas; Carranco y col. (1992), observaron que la concentración de GAGs urinario, mostraba un patrón comparable a las variaciones hormonales del ciclo menstrual con un pico distintivo en el día 0, validado esto por ultrasonografía y observando la correspondencia al día de la ovulación, con lo que ellos sugieren este método como una alternativa en la detección de ovulación en humanos.

LOS GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs).

Son un grupo heterogéneo de polímeros lineales aniónicos constituidos por secuencias repetitivas de disacáridos, formados por un aminoazúcar y un ácido urónico. Su alta capacidad hidrofílica les permite formar geles hidratados muy porosos que ocupan un gran volumen (5, 108). Los glicosaminoglicanos se encuentran en los tejidos y fluidos corporales formando macromoléculas. Cuando estas últimas se estructuran en agregados mayores formando complejos, es lo que constituye las matrices extracelulares al igual que las glicoproteínas, proteínas y proteoglicanos (5).

Estas son sustancias gelatinosas, pegajosas o resbaladizas; antes se pensaba que su funcionamiento era como lubricantes algunas y otras como cemento intracelular flexible (5). No hace muchos años se consideraba que este micromedio extracelular, que constituye cerca del 50% de los organismos vertebrados adultos, era una entidad estática, y que servía únicamente como cemento intracelular proporcionando soporte a las células (5). Este concepto se ha modificado substancialmente y hoy se cuenta con suficientes evidencias dadas por la investigación en biología celular, embriología y patología experimental, donde se muestra la interacción recíproca con las células (70). Cuando estos polímeros se encuentran unidos covalentemente a una proteína (núcleo proteico) se conocen con el nombre de proteoglicanos (5, 108), antes mucinas o mucoproteínas.

Los proteoglicanos además de estar unidos a un núcleo proteico covalentemente tienen adheridas cadenas de GAGs, las cuales representan el 80% de la masa total de la molécula del proteoglicano (7, 51).

ocurren en "condiciones normales", la expresión del genoma celular se ve modulada por las condiciones del micro-ambiente (106). Este micro-ambiente a nivel celular es el ámbito donde las células realizan sus funciones (106). Ha sido bien demostrado por varios estudios durante la década pasada, la presencia de glicosaminoglicanos en la superficie de las células (7). Debido a esta localización los proteoglicanos han sido postulados en las interacciones célula-célula, célula-substrato (62).

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS GAGs

Clases de glicosaminoglicanos: Para propósitos de estudio, los GAGs han sido subdivididos en cuatro categorías: Heparan sulfato (incluyendo heparinas), Condroitin sulfato (A, B y C), Ácido hialurónico y Keratan sulfato. Los GAGs son compuestos de unidades repetidas de disacáridos, usualmente ácido urónico y hexosamina, excepto el keratan sulfato, el cual contiene galactosa en lugar del ácido urónico (7, 108).

Heparinas y Heparan sulfato (HS), son estructuralmente similares; las heparinas son producidas por las células cebadas. (7). Una definición clásica de la heparina es que posee una actividad anticoagulante intrínseca, pero las heparinas y el HS son ahora químicamente definidos sobre las bases de tener sulfatos (53). La existencia de la distribución de heparinas o HS, rico o deficiente en sulfato será lo que domine en la contribución de sus propiedades físico-químicas en las moléculas (35). HS existe en todo el reino animal y teóricamente provee una oportunidad casi ilimitada de heterogeneidad (36).

El ácido hialurónico no es sulfatado, se caracteriza por su gran tamaño hidrodinámico distinguiéndose de los otros GAGs (7). El ácido hialurónico, es probablemente responsable de la viscosidad del fluido folicular y contribuye en

algún grado a la presión osmótica, también está implicado en la diferenciación celular (36).

Los condroitin sulfatos (A y C), son químicamente distinguidos de los otros GAGs, por que su primer amino-azúcar es la galactosamina. Condroitin sulfato-B es comúnmente referido como Dermatan sulfato (DS). Este DS difiere de los otros Condroitin sulfatos por la sustitución del ácido glucurónico (7). Los Condroitin sulfato son los principales GAGs adheridos a los proteoglicanos en el fluido folicular (119).

Indices de Galactosamina y glucosamina en proteoglicanos: Jensen and Zachariae (1958) analizaron las proporciones de galactosamina, compuesto de GAGs aislado en el fluido folicular donde observaron que el índice se incrementaba con el crecimiento folicular. Esto sugirió que la fuente de galactosamina y glucosamina fueran el Condroitin sulfato y el Acido hialurónico (7). La importancia fisiológica del alto contenido de galactosamina no se conoce, pero se sugiere que puede contribuir al incremento en la potencialidad del Dermatan sulfato, para los folículos grandes y las uniones en la superficie de la granulosa (55).

La N-acetil- β -D-glucosaminidasa mostró un incremento al tiempo de la ovulación, este incremento en la actividad de la glucosaminidasa parece ser bastante significativo para ser evaluado como un método práctico para predecir la ovulación (91).

Existen reportes que afirman sobre la correlación entre la composición salival y el estado hormonal y algunos muestran los patrones característicos del comportamiento de los componentes de la saliva (fluido más accesible del cuerpo) y su relación con el momento de la ovulación, de esos componentes la N-acetil B-D glucosaminidasa es la que mantiene esas correlaciones con las fluctuaciones hormonales en los ciclos menstruales en el humano (91).

Metabolismo de los GAGs: Yanagashita and Hascall (1984), llevaron a cabo un experimento para observar la distribución de sulfato en las cadenas de GAGs. El 90% de GAGs sintetizados fueron transportados en 13 minutos, como tiempo de transporte a la superficie celular, 30% del Heparan sulfato secretado dentro de un medio de cultivo presentó 4 horas de vida media, 70% fue internalizado y degradado, también con cuatro horas de vida media (7). Los patrones de secreción son consistentes con los reportes de que el tamaño grande de las moléculas de Dermatan sulfato tienen una actividad hidrodinámica, como producto de secreción de las células de la granulosa (7).

Aunque el metabolismo esteroidal en el tejido folicular ha sido bien dilucidado en respuesta las gonadotropinas y el segundo mensajero (AMPc), poco es conocido sobre el metabolismo de los GAGs. La FSH estimula la biosíntesis de los GAGs (52) estos efectos pueden ser imitados por AMPc de la granulosa (8, 12, 119) y las células del cúmulus (10, 12).

Las células de la granulosa tienen un sistema dependiente-calmodulina para ambos, en los esteroides y la biosíntesis de GAGs (12,75), e indican la evidencia de que la adenilciclasa posee también dependencia a la calmodulina. Detalles de estas interrelaciones aún no son claramente entendidas, acerca de los pasos o cambios que ocurren en el desarrollo folicular hacia un último destino de ovulación o atresia (12).

Química de los GAGs foliculares: Los GAGs representan la mayoría de los constituyentes del fluido folicular (17). El principal glicosaminoglicano en el fluido folicular es el Dermatan sulfato (>75%) y los Condroitines A y C, el resto de los GAGs en el fluido folicular es el Heparan sulfato (7, 18).

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS GAGs EN LOS PROCESOS FOLICULARES.

Ligadores de Gonadotropinas: Los glicosaminoglicanos pueden funcionar con una capacidad dual para modular las interacciones de las gonadotropinas con las células de la granulosa, ellos pueden inhibir las uniones para gonadotropinas, y también permiten la aparición de los receptores para estas mismas (7). La inhibición de las uniones de LH y activación de la adenilciclase en preparaciones de cortes de células de la granulosa, ocurre después de la adición de fluido folicular bovino, y el fluido de pequeños folículos es más potente, que el fluido de los folículos grandes (2).

De las concentraciones de GAGs, en el fluido antral, la heparina efectivamente inhibe las uniones de LH y la activación del adenilciclase en la granulosa de la membrana plasmática (9, 92), pero efectos similares no se han reportado en células intactas de la granulosa.

Dilución de las concentraciones de GAGs permiten las uniones de LH y FSH, la presencia continua de concentraciones altas de estos en el fluido folicular deprimen las uniones de FSH y LH (9, 83) más específicamente el Condroitin sulfato (A y C), observado en ovarios de bovinos (10) y porcinos (8). A pesar del tamaño del folículo, niveles elevados de Condroitin sulfato, han sido encontrados en estudios de folículos atrésicos de bovino, usando histología y el criterio de los niveles de esteroides (75). Sin embargo, el Condroitin sulfato ha sido propuesto como un bioquímico marcador de la atresia folicular (17).

Varios estudios designan que las concentraciones de GAGs en fluido folicular, decrecen con el crecimiento folicular, esta disminución se creía era debido al incremento en la acumulación de agua, pero más bien resulta que las

concentraciones de GAGs decrecen substancialmente con el crecimiento folicular (7).

Las concentraciones del Heparan sulfato y Condroitin sulfato, disminuyen antes de que los estrógenos se incrementen, una reducción en la concentración folicular de ambos GAGs puede ser importante en el crecimiento folicular (17).

La disminución de las concentraciones de Condroitin sulfato, el incremento en el tamaño del folículo y el incremento en las concentraciones de estrógenos, soportan la relación entre las concentraciones de Condroitin sulfato y la atresia folicular (12).

Las altas concentraciones de GAGs en folículos atrésicos (12, 17) pueden ser responsables de la baja capacidad de unión de las gonadotropinas, inhibiendo la diferenciación continua de las células de la granulosa (7). De esta manera los GAGs pueden perturbar la membrana de la granulosa para descubrir los sitios de unión de las gonadotropinas, pero a menos que las concentraciones de GAGs disminuyan, la óptima unión de gonadotropinas a las células de la granulosa, no se puede lograr (7).

El papel de los GAGs en el crecimiento de las células de la granulosa y su diferenciación, se puede observar más claro, ya que son el mayor producto secretado por las células de la granulosa, y ellos son los principales candidatos para la modulación de los efectos de gonadotropinas y esteroides en el desarrollo de los folículos (7). Bushmeyer *et al* (1985 b) demostraron que los cambios en el Heparan sulfato así como en el Condroitin sulfato durante la foliculogénesis soportan el papel de que los GAGs son un sensible indicador de la foliculogénesis.

La coincidencia durante el desarrollo folicular y el inicio de la síntesis de GAGs con la formación del antro, plantea la posibilidad de que esta actividad metabólica es dependiente de la acción de la FSH (20).

Esteroidogénesis y GAGs: La secreción de progesterona por las células de la granulosa en ovario de rata (20) y cerda (13, 75) fue inhibida a manera de dosis dependiente por los GAGs. Además de lo anterior, los GAGs foliculares del cerdo inhiben los ligadores de heparina y la degradación del (^{125}I) en las lipoproteínas de baja densidad (LBD) por las células de la granulosa.

El grado de sulfatación de la heparina afecta su potencial para inhibir la degradación de los LBD, implicando que el sulfato es importante (7, 13). El peso molecular de los LBD normalmente excede el límite de la barrera sangre-folículo, pero posterior a la ovulación existe una entrada de los componentes sanguíneos (45) y una suplementación vascular que subsecuentemente es establecida por el cuerpo lúteo.

La liberación de esteroides (derivados de LBD), por la síntesis de progesterona es probablemente más importante en la función lútea, que en la folicular (7).

Células de la granulosa del ovario de rata, fueron aisladas y mantenidas en cultivo. Los proteoglicanos fueron marcados y se observó una mayor susceptibilidad en los proteoglicanos marcados y las enzimas proteolíticas, especialmente la plasmina, lo que sugiere, que las células de la granulosa sintetizan los proteoglicanos predominantes del fluido folicular (119).

La regulación hormonal de la síntesis de GAGs por las células de la granulosa durante el desarrollo folicular, tal vez es crítica en la fisiología normal del crecimiento y maduración del ovocito (119). Concentraciones experimentales

fueron analizadas y correlacionadas encontrándose una significancia positiva en la correlación existente entre progesterona y Condroitin sulfato (12).

Atresia/GAGs: Los folículos de bovinos calificados como atrésicos sobre las bases de concentraciones de estradiol-17 β , contienen concentraciones más altas de GAGs que los folículos no atrésicos. Aunque los valores de estrógenos y progesterona esencialmente no cambian en relación al tamaño folicular, las concentraciones de Condroitin sulfato disminuyen significativamente con el incremento en la talla folicular en folículos sanos y atrésicos (12).

El papel potencial del Condroitin sulfato durante el desarrollo folicular, aún no es muy claro. La maduración folicular es acompañada por un cambio en la dependencia de FSH y LH (4, 75). Los ligadores de LH se incrementan en la granulosa de rata cuando son cultivados en un medio enriquecido con FSH-GAGs (83). Sin embargo, las altas concentraciones de GAGs inhiben los ligadores de gonadotropinas en la granulosa de rata (83) y evitan la estimulación de la LH por la adenilciclase (23).

En los folículos atrésicos, las uniones de FSH (41) y de LH (83), están reducidos. Bellin (1984) sugiere, que las altas concentraciones de Condroitin sulfato impiden la ligadura de gonadotropinas y conducen a la atresia.

Expansión del cúmulus y maduración del ovocito: El pionero en los estudios para evaluar la modulación de los GAGs, en la expansión de las células del cúmulus alrededor del ovocito ha sido Eppig (1979). Otros investigadores mencionan que la expansión del cúmulus es acompañado por la síntesis del GAG ácido hialurónico, en el ratón, (43) y en el bovino (10).

En 1982, Eppig y colaboradores demostraron que cuando el cúmulus encerrando al ovocito, fue incubado en presencia de diferentes GAGs, la respuesta de

expansión del cúmulus fue inhibida con una dosis - dependiente de FSH. Dosis de GAGs encontradas en folículos pequeños, virtualmente suprimen la expansión del cúmulus. El mecanismo de acción de los GAGs fue independiente del compartimiento receptor-ciclasa de la gonadotropina (7). Las células del cúmulus, derivadas del mismo tronco embriológico que las células de la granulosa, secretan ácido hialurónico, durante los procesos de expansión del cúmulus (9).

Elevadas concentraciones de GAGs pueden inmovilizar los componentes citoesqueléticos y proveer el mecanismo de inhibir la expansión de las células del cúmulus. La disminución en las concentraciones de GAGs en el fluido folicular con los estadios finales de la maduración folicular, puede facilitar la expansión del cúmulus al momento adecuado y de esta manera prevenir la expansión prematura a otros estadios de crecimiento del folículo, cuando los niveles de gonadotropinas estén elevados (7).

La zona pelúcida en ovocitos cosechados de folículos pueden espontáneamente "endurecerse" *in vitro*, pero la adición de GAGs previene ese endurecimiento (35).

La maduración del ovocito *in vitro* puede reanudarse, por la presencia de material extraído de las células de la granulosa, las cuales comúnmente previenen la descomposición de la vesícula germinal, cuando se le adiciona heparina o Heparan sulfato a los ovocitos (94).

Observaciones realizadas de los diferentes tamaños del folículo y su contenido de glicosaminoglicanos (17, 52 116), muestran que los GAGs decrecen con el incremento en el tamaño folicular. Bajas concentraciones de GAGs están relacionados con elevados niveles de estrógenos (7, 51) y bajo contenido de progesterona (13, 54). Las hormonas gonadotropina coriónica (HCG) y LH inhiben la síntesis de glicosaminoglicanos y la FSH la estimula (117).

Los GAGs foliculares siempre tienen una gran participación en la maduración folicular y del ovocito (116). Además, como ligadores de proteínas actúan como factores de crecimiento (61), tal vez regulando el desarrollo folicular. Los efectos de los GAGs no son limitados a las células de la granulosa, ya que las concentraciones de estos, tienen efectos en la maduración del ovocito y el subsecuente porcentaje de fertilización. Cuando el mayor componente de los GAGs foliculares (Dermatan sulfato >75%) excede en concentraciones a 800 µg/ml, el porcentaje de fertilización disminuye. El incremento de glicosaminoglicanos foliculares es asociado con folículos atrésicos (12).

Estudios sobre los mecanismos de maduración espontánea del ovocito (93, 94, 95), mostraron que un número significativo de ovocitos presentaban segmentación y citolisis cuando eran cultivados por tres o más días (94). La observación de la ocurrencia de segmentación y citolisis es más alta en los ovocitos libres de las células del cúmulus, que con ovocitos encerrados en el cúmulus, lo que sugiere que el mantenimiento de la viabilidad y la demora o prevención del establecimiento de los procesos degenerativos sea debido a los GAGs (94).

En 1987 Sato y colaboradores demostraron que los glicosaminoglicanos preparados de ovarios de bovino, previenen la segmentación. Observaciones de ovocitos porcinos han mostrado que estos son extremadamente propensos a sufrir muerte celular cuando son cultivados *in-vitro*. Además, informan de la capacidad de los GAGs preparados a partir del fluido folicular porcino, que previenen el establecimiento de la muerte celular y que el factor más activo es una sustancia relacionada con el ácido hialurónico (93).

La similitud de los cambios morfológicos (degeneraciones) observados con los ovocitos cultivados, en folículos atrésicos y en el oviducto, sugieren que el proceso de muerte celular en estas situaciones, puede estar relacionado a una deficiencia o pérdida de los ingredientes esenciales en el micro ambiente de los ovocitos,

para la viabilidad de estos. En 1990, Sato y colaboradores sugieren que los GAGs pueden ser esenciales para la viabilidad del ovocito.

LOS GAGs EN LOS CICLOS MENSTRUALES.

El ciclo menstrual en la hembra de los mandriles, es asociado con fluctuaciones cíclicas en la tamaño de la piel sexual del perineo (82). Estos cambios consisten en una discreta inflamación (turgencia) y enrojecimiento de las zonas genital y anal. Estas manifestaciones son dependientes de las hormonas sexuales, ya que estos cambios cesan con la ovariectomía y pueden ser reactivados por inyección de estrógenos (81). La turgencia del perineo empieza inmediatamente después de la menstruación y alcanza un máximo, tres o cuatro semanas después. La ovulación ocurre en el pico de la turgencia y esto es seguido por una rápida disminución de la turgencia, la cual se completa en 6 u 8 días (82). De particular interés es la observación de que la turgencia va acompañada por un gran incremento neto del contenido de ácido hialurónico en el perineo.

Estudios químicos llevados a cabo por Rienits, citado por Naidoo (1970) establecieron la presencia del ácido hialurónico en el perineo de varias especies de mandriles, estos estudios muestran que los estrógenos inducen la turgencia de la piel del perineo, lo cual es acompañado por un considerable incremento en la cantidad absoluta de ácido hialurónico en el tejido, mientras que la disminución de la turgencia de la piel se presenta después del retiro de los estrógenos, acompañado por la disminución del ácido hialurónico (81).

La desaparición de los GAGs hacia el perineo, ocurre aparentemente en respuesta a la alteración en el balance hormonal, y es acompañado por cambios en la excreción urinaria de GAGs. Además, se sugiere que un incremento en la concentración del ácido hialurónico puede traer como consecuencia, una

retención de fluido, mientras que la despolimerización de las moléculas del ácido hialurónico produce una disminución en la retención de agua (81).

GAGs urinarios : En las hembras mándriles el ácido hialurónico ha sido implicado en la retención de fluido en los tejidos (81), en estas observaciones ha sido notable, que un incremento en los GAGs urinarios fue siempre acompañado por un aumento en el volumen urinario (82).

En un estudio llevado a cabo con mujeres, se observó que el contenido de ácido urónico en orina tenía un patrón de fluctuaciones características a través del ciclo menstrual, con una clara elevación en el día de la ovulación. La ovulación fue confirmada por ultrasonido de barrido y vaginal, así como por el aumento de la temperatura basal (22). Las concentraciones de GAGs en orina fueron determinados por medio del método de Whiteman (113), el cual describe la formación de un complejo colorante-GAGs, donde el colorante catiónico utilizado es el Azul de Alciano y las determinaciones son leídas por espectrofotometría (114). Con base en estos resultados, se propone la posibilidad de utilizar este método para predecir la ovulación en humanos (22, 23).

Esto representa un simple y altamente reproducible micro-método donde se observan los perfiles de la reacción complejo-formación de glicosaminoglicanos. Esta técnica consume un tiempo máximo de dos horas de precipitación y 15 minutos para la lectura por espectrofotometría (114).

A pesar de que continuamente se incrementan y profundizan los conocimientos en endocrinología, uno de los grandes retos en el área de la biología de la reproducción es el desarrollar un método preciso y fácil, que confirme el tiempo de ovulación con la finalidad de favorecer la fertilización (22).

Carranco y colaboradores (1992) asumen que los GAGs en el tracto reproductivo son regulados sistemáticamente por las hormonas circulantes. Todos los tipos de GAGs, con excepción de la heparina fueron encontrados en la orina normal, siendo el Condroitin sulfato C el mayor componente al tiempo de la ovulación en mujeres (23).

LOS GAGs Y LA OVULACIÓN

Es posible que la degradación selectiva de las grandes moléculas de proteoglicanos en o cerca del tiempo de ovulación son importantes para una ovulación normal (119).

Strickland and Beers, citado por Yanagashita (1979a), mostraron que la actividad del iniciador del plasminógeno en el fluido folicular ovárico se incrementa con la inminencia de la ovulación, generando plasmina. Esto sugiere que la producción de plasmina por el activador plasminógeno, puede estar involucrado en la degradación de la pared folicular, contribuyendo a la ruptura folicular. Los proteoglicanos del fluido folicular porcino son hidrolizados por la plasmina (118).

Los cambios morfológicos en el ápice del folículo preovulatorio de los mamíferos han sido estudiados (44) y son similares a los que ocurren en la gallina doméstica, donde las fibras de colágena en las capas celulares de la teca y albuginea de los folículos ovulatorios, son degradados o disociados antes de la ovulación (70).

El tejido conectivo de la matriz interfibrilar es usualmente compuesto por proteoglicanos. En 1971, Espey observó que la matriz interfibrilar es digerida por el contenido de estructuras multivesiculares, saliendo desde las células fibroblásticas de las capas de la teca del folículo pre-ovulatorio.

Jackson, *et al.* (1971) encontraron una disminución de los componentes interfibrilares; el Dermatan sulfato y el ácido hialurónico. Los proteoglicanos y glicosaminoglicanos son asociados estrechamente con las fibras de colágena y ligados electrostáticamente al locus específico, por medio de un núcleo de proteína-colágena e interacciones de glicosaminoglicanos-colágena.

Durante varios años se ha postulado que la viscosidad del fluido folicular, es debida a la presencia de los GAGs, y que la hidrólisis induce la entrada de agua incrementando la presión osmótica. Sin embargo, la degradación completa de los GAGs (el Dermatan sulfato y el ácido hialurónico, tal vez específicamente degradados en la región del estigma en foliculo pre-ovulatorio antes de la ovulación)(70), en el fluido folicular, permite que se difunda inmediatamente fuera del foliculo. Hidrólisis del núcleo de proteína por la plasmina, puede generar cadenas libres de GAGs y estas teóricamente pueden difundirse a través de la barrera sangre-foliculo (119).

Los GAGs están involucrados en una serie de eventos, que en conjunto participan en el desarrollo folicular normal (7). Dentro de los procesos de foliculogénesis los GAGs modulan las uniones para gonadotropinas de las células de la granulosa (7, 8, 9), inhiben la degradación de lipoproteínas de baja densidad y la producción de progesterona por las células de la granulosa (7); afectan la maduración del ovocito (17, 123), la expansión del cúmulus y las propiedades físicas de la zona pelúcida, así mismo, están relacionados con la viabilidad del ovocito en la fertilización *in vitro* (7, 93).

Los GAGs pueden ser la llave bioquímica para entender los procesos en la atresia folicular, ya que la presencia de fallas en el metabolismo de los proteoglicanos puede representar que sus concentraciones se eleven y eviten la ovulación (7).

La elección de muestras de orina y sangre en animales de granja como fluidos de análisis cíclico pierde su aplicabilidad por lo complicado del manejo. Siendo una alternativa práctica utilización las muestras de saliva, que tienen la facilidad de colección y son libres de estrés (110); estas características la señalan como uno de los fluidos más accesibles del cuerpo, lo que representa que sea valorada potencialmente para la realización de estudios de fisiología y patología (111).

Estudios sobre las relaciones saliva-hormona, confirman una correlación entre la composición salival y el estado hormonal (91). En mujeres se han visto cambios cíclicos de marcada influencia hormonal principalmente durante la gestación y en algunas ocasiones, los cambios característicos en saliva han sido inducidos por la administración exógena de hormonas sexuales (88, 91, 110).

Con base en la literatura analizada; si los GAGs tienen una participación tan importante en los procesos reproductivos y existe la relación hormona-saliva ¿Es posible encontrar GAGs relacionados con el ciclo estral en la saliva de la cerda?

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no se han realizado estudios sobre la aplicabilidad de la detección de los GAGs, en saliva de cerdos o alguna otra especie incluyendo humanos, como indicadores del ciclo reproductivo. La selección del fluido saliva, esta dada en función a las ventajas que esta secreción representa, como la fácil obtención, multiplicidad de muestreo y libre de estrés entre otras.

Por lo que al conocer el perfil y la caracterización bioquímica de los GAGs en saliva de cerdas, asociada al ciclo estral, ofrecería la posibilidad de desarrollar una metodología que pueda ser utilizada como herramienta, en la determinación del estro con o sin signos aparentes, en cerdas púberes y destetadas.

Objetivo General

Determinar el perfil de los niveles de GAGs en saliva de cerda durante el ciclo estral y el periodo post-destete de la cerda, estableciendo su relación temporal con el estro y la ovulación.

Objetivos Específicos

- a) Describir el perfil de los GAGs encontrados en saliva de cerdas púberes durante el ciclo estral y en hembras adultas durante el periodo de destete a servicio
- b) Determinar los niveles de GAGs en el momento del estro.
- c) Correlacionar los GAGs con los cambios vulvares de edematización y temperatura rectal y
- d) Caracterizar los GAGs en saliva de cerda púber y adulta.

Hipótesis

Ho Alterna: La determinación de los niveles de GAGs en saliva de cerdas púberes y adultas durante su ciclo estral, permitirá conocer el inicio del estro.

Ho Nula: No es posible determinar el inicio del estro de la cerda por medio de los GAGs en saliva, durante el ciclo estral y el periodo de destete a servicio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN

La granja porcina donde se llevó a cabo el muestreo es de ciclo completo con hembras Yorkshire - Landrace y sementales Yorkshire., está localizada en el ejido de Janamuato, perteneciente al municipio de Puruándiro, Michoacán. Geográficamente esta ubicada a 20° 5' 21" de latitud norte y a 101° 30'59" de longitud oeste.

CLIMA

El clima es semiseco templado, sin cambio invernal definido. La temperatura media anual es de 18.2°C con una variación de 6.6°C (69).

ANIMALES

25 hembras púberes del hato reproductor, fueron seleccionadas mediante el procedimiento de muestreo aleatorio simple (78), en relación al peso corporal (114 kg promedio), edad (180-210 días), estado de salud, y configuración vulvar. En el área de maternidad, 15 hembras destetadas también fueron seleccionadas, obteniéndose un grupo sincronizado por destete múltiple.

ALOJAMIENTO

Los corrales de las hembras púberes están localizados dentro del área de reemplazos de la granja. Cada corral esta dividido en un área seca (con techo de lamina de asbesto) y en un área húmeda (descubierta). Las hembras estaban distribuidas en grupos de 6 animales por corral, con sementaleras para machos adultos, intercaladas entre los corrales de las hembras. Las hembras destetadas se alojaron en grupos de 3-4, en corrales ubicados en el área de servicios. Estos corrales tienen intercaladas sementaleras para machos adultos.

ALIMENTACIÓN

Las hembras púberes fueron alimentadas *ad-libitum* con alimento balanceado elaborado en la misma granja con 14% de proteína cruda y 3.2 Megacalorías. En el caso de las cerdas destetadas, la alimentación era dos veces al día (3 Kg cada vez). El alimento contenía 17% de proteína cruda y 3.3 Megacalorías. El consumo de agua en ambos grupos de animales, era *ad-libitum*

DETECCIÓN DEL ESTRO

La detección del estro en las cerdas púberes se llevó a cabo dos veces al día, durante la mañana (6:00 y 15:00 hrs.), mediante un paseo del semental dentro de los corrales de las hembras. En las cerdas destetadas, esta práctica se llevó a cabo 3 veces al día (6:00, 12:00 y 15:00 hrs.). Este procedimiento se intensifica a partir del cuarto día posterior al destete y el encargado del área de servicios, observa el comportamiento individual de las hembras, al contacto con el semental. Los signos de estro se confirmaron a través de la prueba de cabalgue.

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de saliva de las hembras púberes y destetadas se llevó a cabo por medio del uso de una tela absorbente, a la cual se le extraía el fluido (2 ml) depositándose en tubos de ensaye de vidrio (Pyrex) estériles. Posteriormente, los tubos eran sellados con Parafilm® y etiquetados, incluyendo: número de hembra, fecha y hora. Las muestras eran conservadas en congelación a -10°C, para su posterior análisis.

El muestreo se llevó a cabo durante 21 días en las 25 hembras púberes, cada 24 horas en horario matutino (6:00 a.m.). Diez de estas mismas hembras también fueron muestreadas cada 12 horas (6:00 p.m.). Al mismo tiempo se llevaron a cabo las mediciones del largo y ancho de los pliegues vulvares (llevadas a cabo con un Vernier), para obtener información cuantitativa de la edematización de la

vulva, ya que ésta comúnmente es clasificada visualmente. Asimismo, se midió la temperatura rectal por medio del uso de un termómetro rectal. Las 15 cerdas sincronizadas por el destete, fueron muestreadas cada 24 horas y posteriormente, a medida que entraban en estro, se hacía cada 12 horas. En estas cerdas también se midió el largo y ancho de los pliegues vulvares, la temperatura rectal y se recabó información sobre el número de parto. La secuencia del muestreo fue igual que con las hembras púberes (colección, extracción, vaciado, sellado, etiquetado y conservación por congelamiento).

Las muestras obtenidas y conservadas por congelamiento, fueron trasladadas al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (C.I.A.D.), localizado en Mazatlán, Sin. En este centro se procedió a extraer los proteoglicanos de los 2 ml de saliva, agregando 8 ml de acetona anhidra a cada muestra, incubándose a temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) durante 18 horas. Posteriormente, se centrifugaron a 2500 r.p.m. por 10 minutos, obteniendo un precipitado seco al evaporarse la acetona.

DETERMINACIÓN DE GAGs

La determinación de las concentraciones de los GAGs se llevó a cabo a partir de los precipitados secos obtenidos de las muestras de saliva, en el Laboratorio de Esteroides del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO), perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), localizado en la ciudad de Guadalajara, Jal., México.

A) MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE GAGs

Determinación de la Curva Estándar de GAGs

El método utilizado se basa en la precipitación del complejo formado por el azul de Alciano (8GX™) con los GAGs, a un pH de 5.8. La intensidad de la coloración observada es proporcional a la concentración de los GAGs presentes (el

procedimiento completo de este método se realizó según lo señalado por Fellström (1986) y se explica con detalle en el Anexo No. 1).

Extracción de GAGs en saliva de cerdas

En la extracción de los GAGs en saliva de cerdas, se siguieron las indicaciones del método de Fellström (1986), el cual se basa en la precipitación de los GAGs con un surfactante catiónico (Cloruro de Cetil Piridinium [C.C.P.]), y permite manejar los pesos promedio de las muestras de GAGs para su posterior valoración de concentración (el procedimiento completo de este método se explica con detalle en el Anexo No. 2).

B) CARACTERIZACIÓN DE GAGs POR ELECTROFORÉISIS

Para la caracterización de GAGs por Electroforesis, se siguieron las indicaciones de Fellström (1986). 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 (el procedimiento completo de este método se explica con detalle en el Anexo No. 3).

C) CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE GAGs POR ELECTROFORÉISIS

La caracterización enzimática de los GAGs (49) está basada en su degradación por la acción de la enzima específica correspondiente (el procedimiento completo de este método se explica con detalle en el Anexo No. 4).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Organización y captura de datos.- Los datos de cada una de las hembras muestreadas se registraron en un formato de Excell (Microsoft™). Para el análisis estadístico se hicieron los siguientes arreglos; de las hembras púberes se eliminaron las únicas tres muestras registradas en el día 22 (una muestra) y el día 23 (dos muestras), quedando el ciclo estral de la cerdas púberes de 21 días. En las cerdas destetadas se agruparon las hembras de dos o más partos como una sola clase, obteniendo un grupo de primiparas y otro de multiparas. Para el análisis de la información se empleó el programa de modelos lineales generalizados del paquete estadístico SAS (100).

Se corrieron dos modelos en cerdas destetadas y púberes para analizar los niveles de GAGs en saliva. En ambos tipos de cerdas el modelo original consideró como covariables las mediciones de largo y ancho de la vulva, así como la temperatura rectal. Posteriormente se corrió el modelo reducido sin considerar las covariables.

Estos modelos se definieron como:

Modelo original para analizar la concentración de GAGs en saliva de cerdas púberes

$$Y_{ijk} = M + D_i + M_j(D_i) + \beta_1 L + \beta_2 A + \beta_3 T + e_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Una observación de concentración de GAGs en saliva de cerdas púberes.

M = Media General.

D_i = i -ésimo día del muestreo (0,20).

$M_j(D_i)$ = j -ésima hora del muestreo (mañana, tarde), dentro del mismo muestreo.

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = Coeficientes de regresión lineal.

L = Largo de la vulva (covariable).

A = Ancho de la vulva (covariable).

T = Temperatura rectal (covariable).

e_{ijk} = error aleatorio NID (0, σ^2).

Modelo reducido para analizar la concentración de GAGs en saliva de cerdas púberes.

$$Y_{ijk} = M + D_i + M_j(D_i) + e_{ijk}$$

Donde los efectos se definen como en el modelo original.

Modelo original para analizar la concentración de GAGs en saliva de cerdas destetadas

$$Y_{ijkl} = M + NP_i + D_j + M_k(D_j) + \beta_1 L + \beta_2 A + \beta_3 T + e_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl} = Una observación de concentración de GAGs en saliva de cerdas destetadas.

M = Media General.

Np_i = i -ésimo número de parto ($i = j, 2 \text{ ó } >$)

D_j = j -ésimo día del muestreo después del destete (0,8).

$M_k(D_j)$ = k -ésima hora del muestreo (mañana, tarde) dentro del día del muestro después del destete.

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = Coeficientes de regresión lineal.

L = Largo de la vulva (covariable).

A = Ancho de la vulva (covariable).

T = Temperatura rectal (covariable).

e_{ijkl} = error aleatorio NID (μ, σ^2)

Modelo reducido para analizar la concentración de GAGs en saliva de cerdas destetadas.

$$Y_{ijk} = M + NP_i + D_j + M_k(D_j) + e_{ijk}$$

donde: los efectos se definen igual que en el modelo original.

Posteriormente se estimó la concentración de GAGs en saliva de cerdas púberes durante el ciclo estral por medio de una regresión cuadrática. Las medias mínimo cuadráticas y errores estándar se estimaron para los efectos fijos significativos de los modelos reducidos y se realizaron las pruebas de Tukey correspondientes (100).

5. RESULTADOS

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE GAGs

El Cuadro 1, muestra los criterios de validación aplicados para la curva dosis-respuesta utilizada en la obtención de los niveles de Glicosaminoglicanos, donde se describen los parámetros: m = concentración, b = densidad óptica y r = replicas que definen el comportamiento lineal de la curva estándar, la sensibilidad del método y los límites de detección. La Figura 6 muestra la línea recta que se obtuvo en el método de cuantificación de los GAGs.

CUADRO 1. CRITERIOS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE GAGs EN SALIVA

CONCENTRACIÓN(μ g)	DENSIDAD ÓPTICA	RÉPLICAS
0	0	30
5	0.0988 \pm 0.0298	30
10	0.2271 \pm 0.0565	30
15	0.3578 \pm 0.0766	30
20	0.5076 \pm 0.0932	30
25	0.6286 \pm 0.1025	30
$m = 0.025$	$b = -0.018$	$r = 0.988$

La evaluación de los errores aleatorios y sistemáticos del método utilizado en la cuantificación de los GAGs, fueron valorados mediante los criterios de exactitud y precisión, parámetros que al ser evaluados estadísticamente, resultaron **altamente** repetibles, como se aprecia en la Cuadro 2.

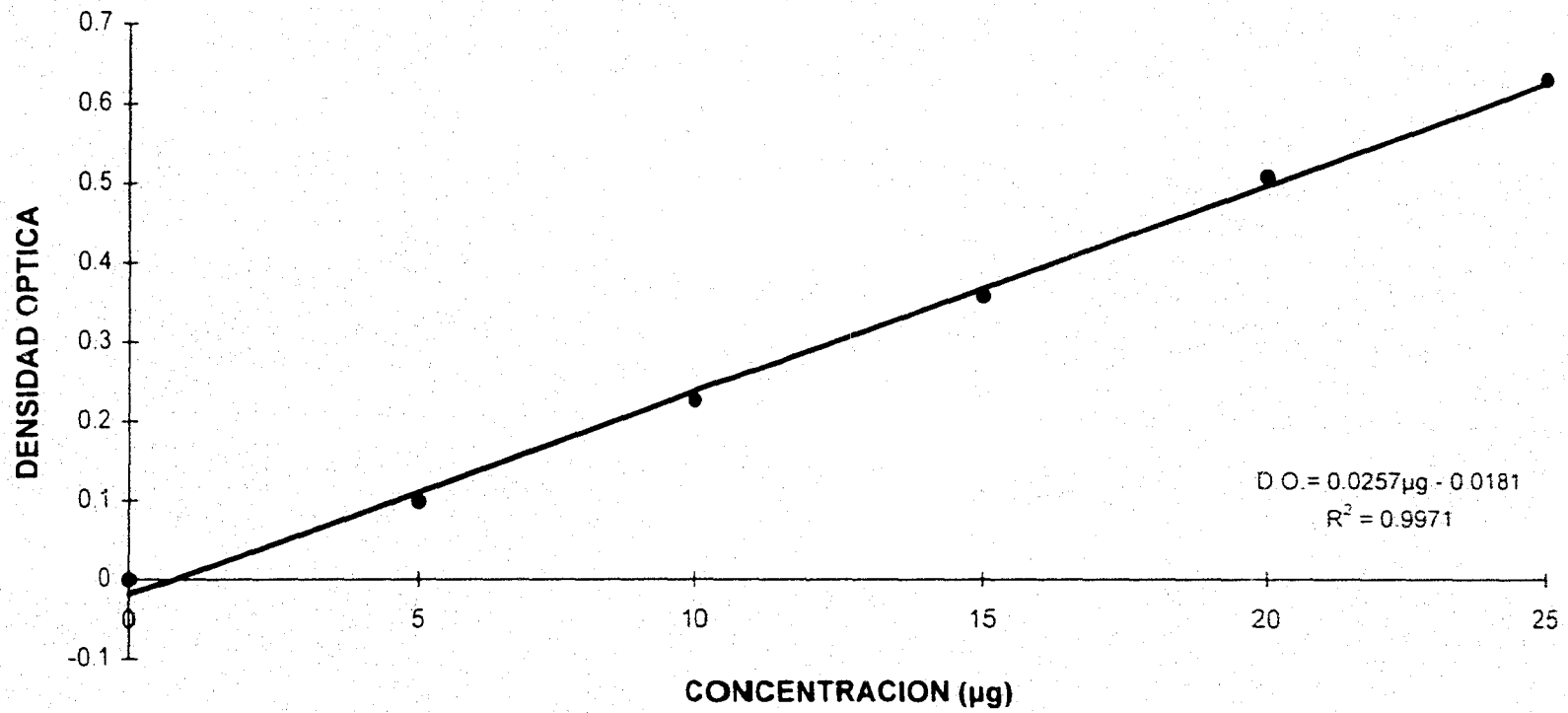


FIGURA 6. REGRESION LINEAL DE LA SENSIBILIDAD DE LA CURVA ESTANDAR DEL METODO DE CUANTIFICACION DE GAGs EN SALIVA

CUADRO 2. CRITERIOS DE VALIDACIÓN, PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR GAGs

CONCENTRACIÓN ORIGINAL (μg)	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (μg)	Número Experimentos	VALOR t	VALOR p
6	5.989 \pm 0.703	22	0.734	ns
13	13.068 \pm 1.226	27	-0.2287	ns
16	15.913 \pm 1.059	12	0.2846	ns
18	18.544 \pm 1.115	8	-1.38	ns

ns = no significativo

CONCENTRACIÓN DE GAGs EN SALIVA DE HEMBRAS PÚBERES

En las hembras púberes, 648 muestras de saliva de 25 hembras fueron colectadas durante un periodo de 21 días. La concentración de GAGs durante los diferentes días del muestreo, registró para los modelos estadísticos utilizados (original y reducido) el único efecto con diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) observado en el Cuadro 3, se muestra además que los coeficientes de determinación (.11) y de variación (.64), fueron similares en ambos modelos.

CUADRO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA CONCENTRACIÓN DE GAGs EN SALIVA DE CERDAS PÚBERES

Fuente de Variación	gl	MODELO ORIGINAL cm	MODELO REDUCIDO cm
DÍAS	8	9367.0**	9989.2 **
MUESTRA		4096.3	4001.5
LARGO VULVAR		7443.4	
ANCHO VULVAR		641.0	
TEMP. RECTAL		59961.2	
ERROR	114	4574.2	4596.6
R ²		0.11	0.10
CV		64.52	64.68
MEDIA		104.81	104.81

* (P<0.05)

** (P>0.01)

gl = grados de libertad

La concentración promedio de los GAGs en saliva de cerdas púberes fue de 104.81 µg/ml. Asimismo, al estimar la concentración de GAGs en la saliva de cerdas púberes durante el ciclo estral, se encontró un efecto altamente significativo de los estimadores de regresión lineal (P < 0.01) y cuadrática (P < 0.05) del día del ciclo estral, información mostrada en el Cuadro 4.

CUADRO 4. REGRESIÓN CUADRÁTICA DE LA CONCENTRACIÓN DE GAGs (µg/ml) EN SALIVA DE CERDAS PÚBERES DURANTE EL CICLO ESTRAL

FUENTE DE VARIACIÓN	gl	CUADRADO MEDIO
Regresión cuadrática	2	54514.41**
Error	645	4676.14
R ²		0.3
		PARÁMETROS ESTIMADOS
B ₀		133.47 ± 6.87 **
B ₁ (D)		- 5.43 ± 1.65 **
B ₂ (D)		0.18 ± 0.08*

*(P < 0.05)

** (P < 0.1)

La concentración de GAGs a través del ciclo estral, registró el mayor valor (157.89 µg/ml) en el día 0 del estro, siendo este significativamente diferente (P<0.05) a la concentración de GAGs en cualquier otro día del ciclo, así como entre el día 7 (119.55 µg/ml) con el día 13, 15 y 17 (81.51, 73.84 y 73.75 µg/ml respectivamente) (P<0.5) Cuadro 4 y Figura 7.

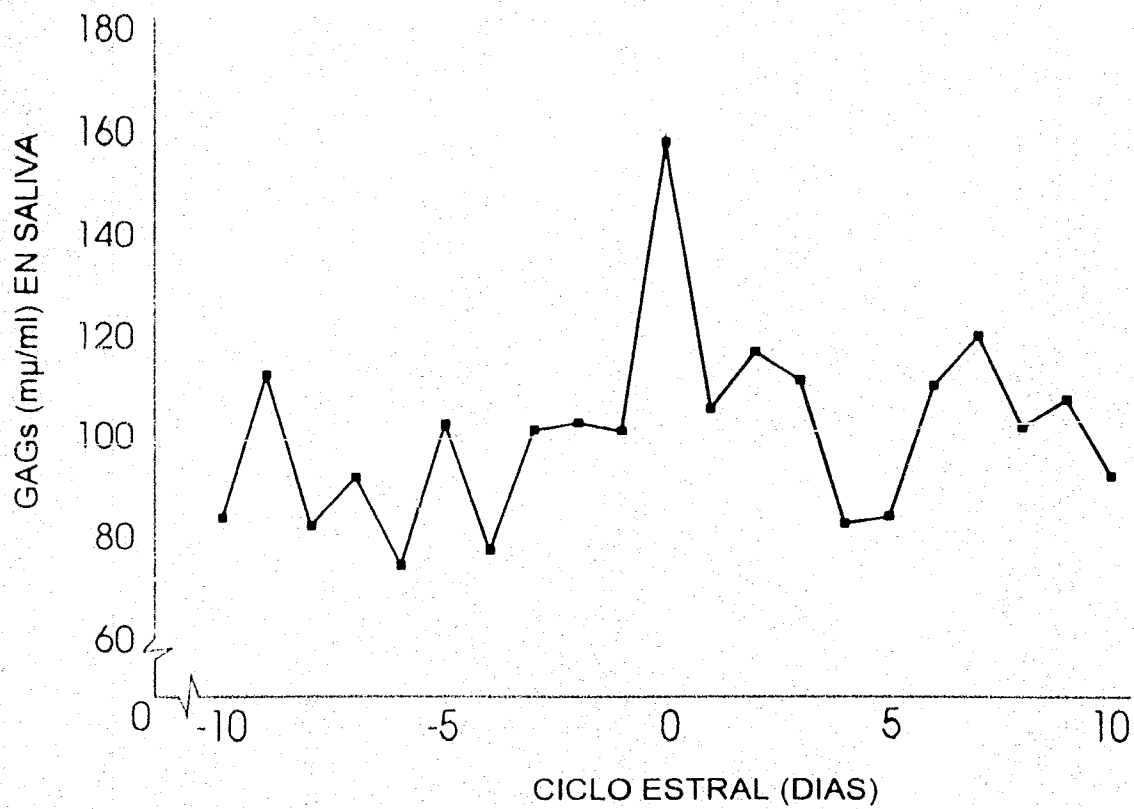


FIGURA 7. PERFIL DE GAGs EN CERDAS PUBERES.

En la Figura 8 se observa la gran variabilidad en concentración de GAGs en saliva de cerdas púberes al graficar los resultados por individuo. No se encontraron diferencias significativas en la correlación de las covariables de largo y ancho vulvar, así como la temperatura rectal.

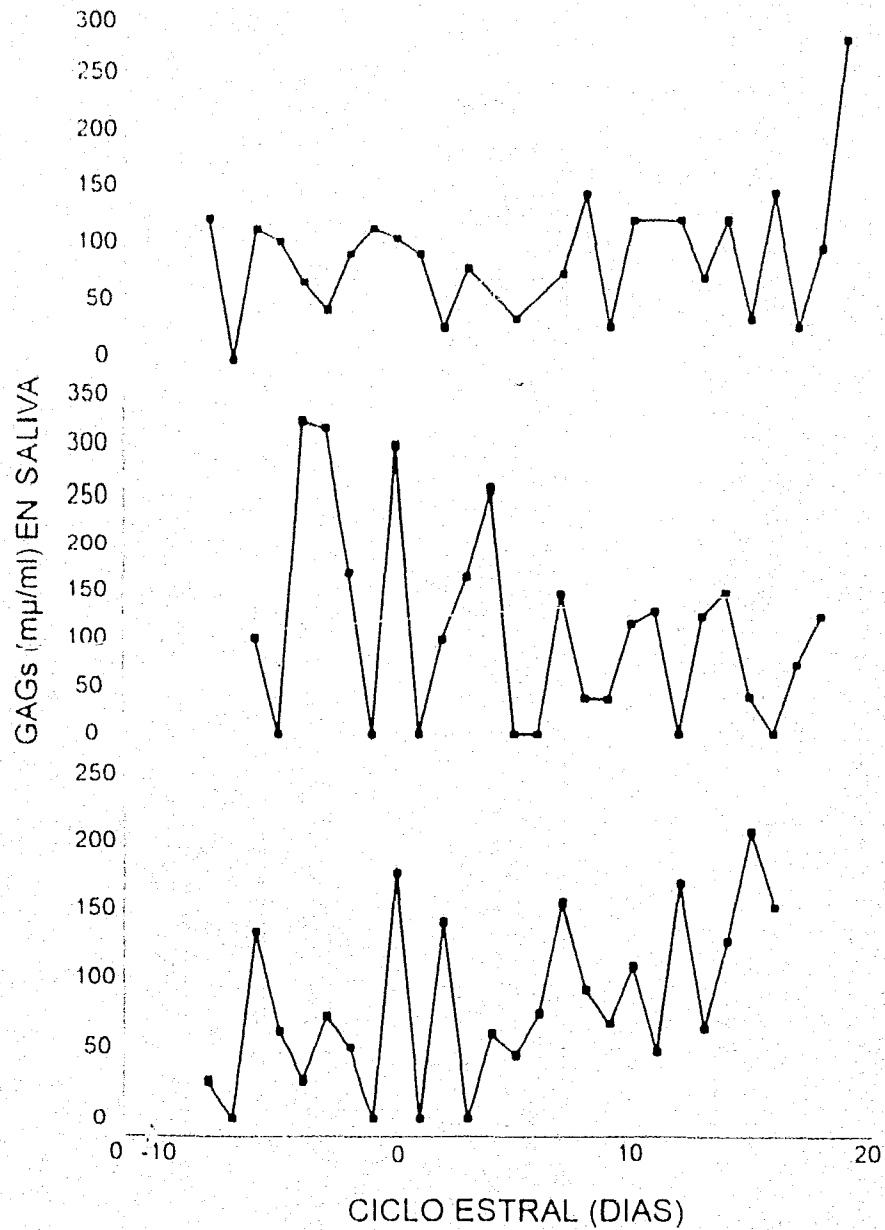


FIGURA 8. VARIABILIDAD DE LA CONCENTRACION DE GAGs DE 3 CERDAS PUBERES DURANTE EL CICLO ESTRAL

El Cuadro 5 describe las medias mínimo cuadráticas de la concentración de GAGs en la saliva de cerdas púberes y en promedio se observa la tendencia de estos a elevarse hacia el día 0.

CUADRO 5. MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS DE LA CONCENTRACIÓN DE GAGs ($\mu\text{g/ml}$) EN SALIVA DE CERDAS PÚBERES DURANTE EL CICLO ESTRAL

DÍAS DEL CICLO ESTRAL	N	MEDIAS
0	40	157.89 \pm 11.69a
1	36	105.07 \pm 12.26bc
2	32	116.46 \pm 13.83bc
3	32	110.70 \pm 13.32bc
4	29	82.10 \pm 14.75bc
5	30	83.51 \pm 14.63bc
6	28	109.66 \pm 14.18bc
7	32	119.55 \pm 13.83b
8	33	101.21 \pm 12.84bc
9	27	106.78 \pm 14.88bc
10	26	91.53 \pm 14.98bc
11	25	83.15 \pm 15.09bc
12	28	111.61 \pm 14.18bc
13	32	81.51 \pm 13.32c
14	31	91.39 \pm 13.41bc
15	35	73.84 \pm 13.41bc
16	28	101.86 \pm 14.18bc
17	33	76.75 \pm 12.84c
18	35	100.71 \pm 12.68bc
19	27	102.13 \pm 14.28bc
20	29	100.50 \pm 15.53bc

Medias con diferente literal ($P > 0.05$)

CONCENTRACION DE GAGs EN SALIVA DE CERDAS DESTETADAS

En las hembras adultas, fueron analizadas 132 muestras de saliva de 15 cerdas destetadas, en las cuales se inicio la colección a partir del día del destete, y durante los 8 días siguientes.

Se encontró un efecto significativo ($P < 0.01$) del número de parto, tanto en el modelo original como el reducido y ninguno de los otros efectos (días y muestras dentro de días), así como las covariables (largo, ancho de vulva y temperatura basal) influyeron en la concentración de lo GAGs durante este periodo de observación. (Cuadro 6).

CUADRO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA CONCENTRACIÓN DE GAGs EN SALIVA DE CERDAS DESTETADAS

Fuente de Variación	gl	MODELO ORIGINAL cm	gl	MODELO REDUCIDO cm
NÚMERO DE PARTO	1	37965.1**	0	37860.5**
DÍAS	8	2365.5	8	2694.3
MUESTRA	8	5889.0	8	5817.3
LARGO VULVAR	1	739.5		
ANCHO VULVAR	1	2157.2		
TEMP. RECTAL	1	35.8		
ERROR	111	6131.0		5989.17
R ²		0.13		0.13
CV		66.97		66.19
MEDIA		116.91		116.91

* ($P < 0.05$)

** ($P > 0.01$)

gl = grados de libertad

Los coeficientes de determinación (.13) y los coeficientes de variación (66.97) fueron similares en ambos modelos, por lo que se decidió, el uso del modelo reducido para este análisis, donde la concentración promedio de GAGs en la saliva de cerdas destetadas fue de 116.91 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 9 se observa el perfil de los GAGs en relación al día detectado como estro, mostrando una marcada diferencia en hembras primerizas y multiparas.

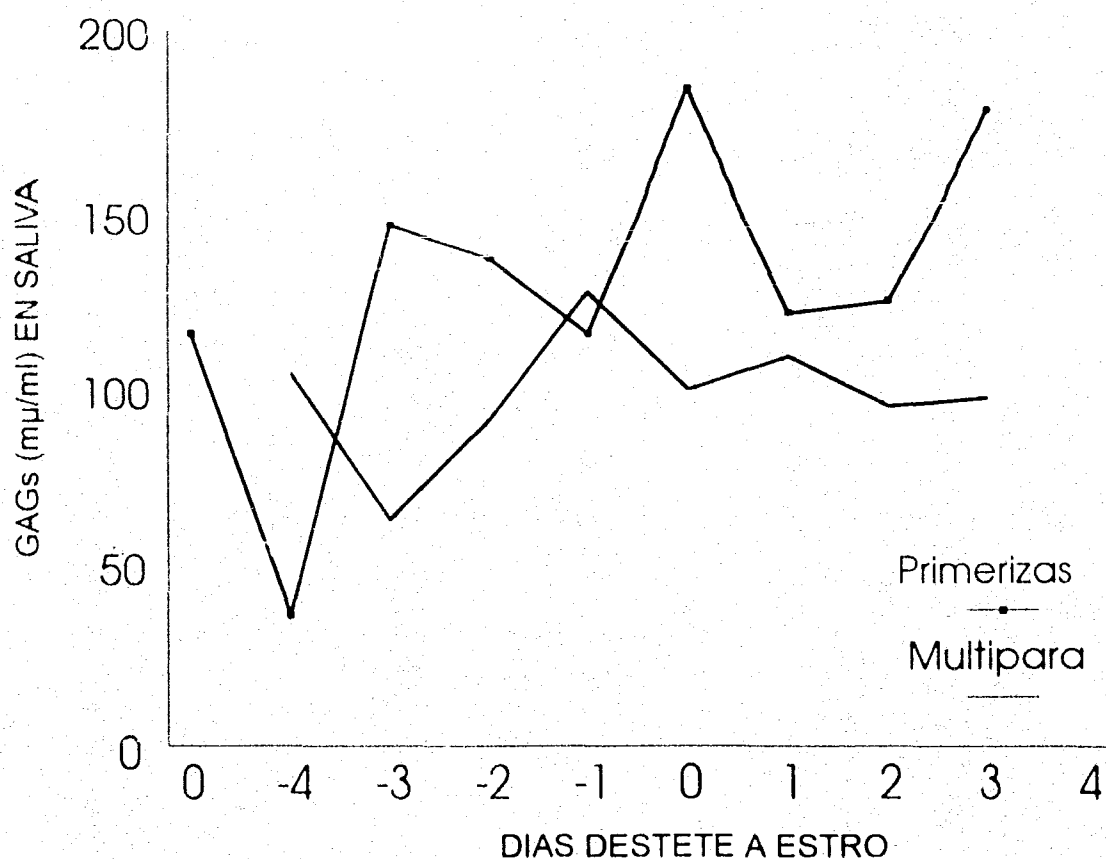


FIGURA 9. PERFIL DE GAGs EN CERDAS DESTETADAS DURANTE EL CICLO DE DESTETE.

Las medias mínimo cuadráticas de los GAGs en la saliva de cerdas destetadas se muestran en la Cuadro 7 donde se observa que la concentración en las multiparas fue menor.

CUADRO 7. MEDIAS MÍNIMO CUADRÁTICAS DE LA CONCENTRACIÓN DE GAGs ($\mu\text{g/ml}$) EN SALIVA DE CERDAS DESTETADAS

HEMBRAS	N	MEDIAS
PRIMERIZAS	40	128.71 \pm 13.21a
MULTÍPARAS	92	92.50 \pm 13.28b

Medias con diferente literal ($P > 0.05$)

Caracterización

La caracterización electroforética en acetato de celulosa (A) y el tratamiento enzimático específico (B), de los GAGs encontrados en las muestras de saliva de cerdas tanto púberes como destetadas, fueron el Heparan sulfato, Dermatan Sulfato y el Condroitin Sulfato C, mostrados en la Figura 10, donde puede verse claramente las diferencias en el desplazamiento.

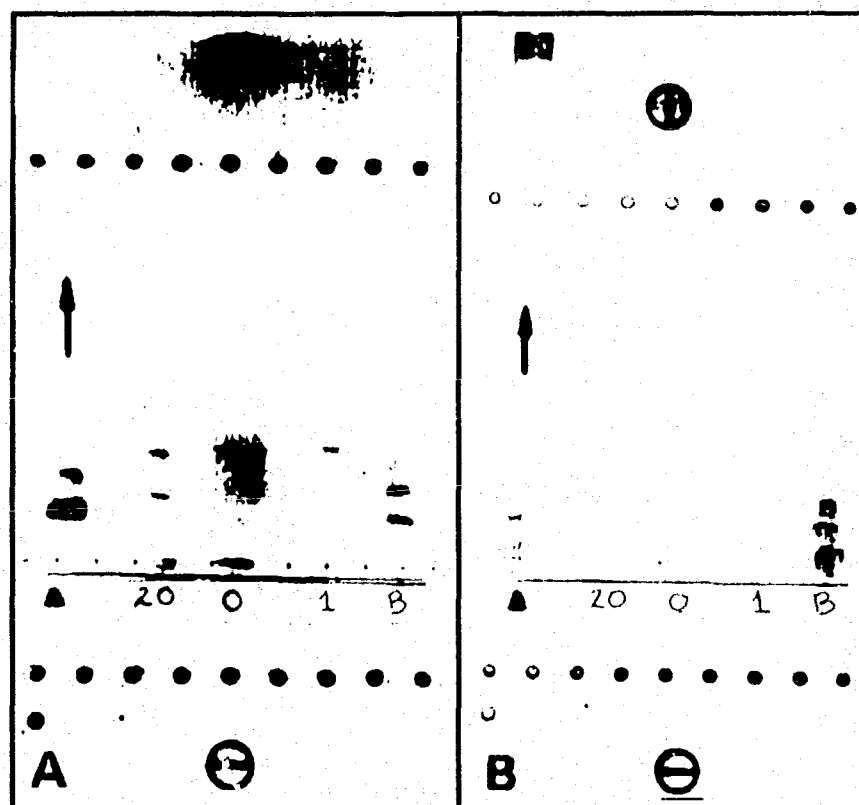


FIGURA 10. PATRON ELECTROFORETICO DE LOS GLUCOSAMINOGLICANOS EN LA SALIVA DE CERDO: (A) MUESTRAS SIN TRATAMIENTO; (B) MUESTRAS CON 1 UI DE CONDROITINASA ABC E INCUBADAS A 37° POR UNA HORA. **ESTANDARES:** A= DERMATAN SULFATO, HEPARAN SULFATO, CONDROITIN SULFATO; B= KERATAN SULFATO, ACIDO HIALURONICO, CONDROITIN SULFATO. **MUESTRAS:** 20= UN DIA ANTES DE LA OVULACION, 0= DIA DE LA OVULACION, 1= UN DIA DESPUES DE LA OVULACION.

6. DISCUSIÓN

Método para la cuantificación de GAGs

Los parámetros de validación obtenidos en la curva dosis-respuesta, corresponden a una línea recta típica, como se describe en la Figura 1. El límite de detección que es de 25 μg y la sensibilidad del método que es de 0.025, se observan en el Cuadro 1.

Los resultados de los GAGs obtenidos, se sometieron a una valoración de los tres tipos de errores en los que se puede incurrir en un laboratorio experimental con mucha facilidad y que son una preocupación constante; éstos errores fundamentalmente se refieren a los crasos, aleatorios y sistemáticos. Los primeros pueden definirse como errores tan graves que no queda otra alternativa más que abandonar el experimento y empezar de nuevo; los segundos son errores que afectan la precisión o reproductividad de un experimento y los últimos afectan la exactitud, es decir, la proximidad al valor verdadero. Por estas razones se emplearon concentraciones conocidas de GAGs como 6, 13, 16 y 18 μg y se cuantificaron.

Los resultados obtenidos para dichas concentraciones fueron muy cercanos a los valores reales como puede observarse en la Cuadro 2; la diferencia resultó no ser significativa, lo que confirma que el método utilizado es un método exacto, y sensible (22, 109).

Las concentraciones de los GAGs y las cerdas púberes

Al analizar los resultados de la concentración de GAGs en la saliva de cerdas púberes (Cuadro 3), se muestra, en el análisis de Varianza el factor, días del

ciclo estral, como el único dato significativo estadísticamente ($P < 0.01$), donde la concentración promedio fue $104.81 \mu\text{g/ml}$ y comparable a un patrón típico de las fluctuaciones de GAGs en concentraciones ($106.74 \mu\text{g 7ml}$), de muestras de orina en mujeres ciclando normalmente, con una elevación en el día 0 (23) Figura 7.

La información comparada anteriormente tienen similitud en la cantidad de GAGs presentes, en saliva y orina. En cerdas jóvenes se encontró una gran variabilidad individualmente en la concentración de GAGs (Figura 8), por lo que el valor predictivo de las concentraciones es bajo, y solo utilizable para conocer la tendencia de los GAGs durante el ciclo estral.

Si bien al realizar la regresión cuadrática (Cuadro 4) y las medias mínimo cuadráticas (Cuadro 5) existe una relación en el pico de GAGs en saliva y el momento del estro. Las variaciones observadas son comparadas a las fluctuaciones encontradas en los ciclos anovulatorios de mujeres (22, 23), pero en cerdas se tiene muy poca información reportada en la literatura sobre los ciclos estrales anovulatorios (98).

Sin embargo, es indudable que el efecto hormonal, (7, 9, 12, 13, 54, 122, 123), ejerce gran influencia sobre la síntesis y producción de GAGs (7, 8).

Se ha encontrado que la variación en los resultados también puede estar causada por las diferentes edades de pubertad en las cerdas analizadas (39). La duración del proestro está fuertemente relacionada con la intensidad del enrojecimiento de la vulva durante el primer estro. Andersson *et al.* (1984), describen que los parámetros en plasma de 17 β -estradiol difieren significativamente entre cerdas, lo que permite una gran variabilidad en las

manifestaciones externas del estro. Parece ser, que el periodo de inicio del estro a la ovulación tiene una relación consistente con la edad reproductiva (1, 46, 47).

Las covariables de largo de vulva, ancho del pliegue vulvar y la temperatura rectal, no tuvieron significancia en relación a los GAGs en este estudio.

Las concentraciones de GAGs y las hembras destetadas

El análisis de varianza en cerdas destetadas mostró (Cuadro 6), que el único efecto con significancia estadística ($P < 0.01$) fue el número de partos, en relación a las concentraciones de los GAGs en saliva.

El comportamiento en las concentraciones de los GAGs en la saliva de cerdas primíparas y múltiparas destetadas se observa diferente (Figura 7).

En primíparas

El estro se presentó en fechas similares al grupo de cerdas múltiparas (> 4 días posteriores al destete), pero al graficar las concentraciones de GAGs se observó la elevación de estos en las primíparas el día marcado como 0 (cuando el estro fue detectado con apoyo del semental). Resultando un promedio de $128.28 \pm 13.21 \mu\text{g/ml}$.

Las mediciones de vulva y temperatura basal, no mostraron significancia estadística en relación a los GAGs. Benjaminsen y Karlberg (1981), mencionan que la ovulación con signos externos de estro es menos común en cerdas primíparas que en múltiparas.

Los resultados no significativos en relación a los signos de estro, pueden ser explicados en parte, por la alta frecuencia de cerdas primíparas que no muestran estro detectable en la primera ovulación post-destete (101).

Sternig *et al.* (1994), mencionan que los cambios vulvares son más intensos en el segundo estro después del destete en cerdas primíparas, ellos encontraron una alta repetibilidad entre los valores de intensidad de los cambios vulvares del primer y segundo estro, después del destete. En este estudio solo se muestrearon las hembras en su primer estro post-destete, además ellos mencionan como dato interesante, el comparar los signos de estro puberales con los signos de estro al primer destete. La alta repetibilidad de ambos valores pueden apoyar un posible uso para determinar cuales cerdas van a mostrar los signos de estro después del destete.

En este estudio no se valoraron cualitativamente por grados de avance según los tonos de enrojecimiento e inflamación como lo hicieron Sternig y colaboradores (1994), sino que se decidió la medición a lo largo y ancho de los pliegues vulvares, lo cual no dio resultados significativos en relación a las concentraciones de GAGs.

En múltiparas

El promedio en concentración de GAGs en la saliva de cerdas múltiparas fue de $92.50 \pm 13.28 \mu\text{g} / \text{ml}$ (Cuadro 7). En la Figura 7 se observa que el pico de elevación en estas surgió un día antes del día marcado como 0, esta figura se puede comparar con lo encontrado por Carranco y colaboradores (1990), donde se evaluaron las concentraciones de GAGs en mujeres con ciclos menstruales.

El comportamiento de las multíparas es similar al de mujeres con ciclos inducidos. Tal vez se pudiera explicar esto al considerar que el estímulo de monta produce una fuerte influencia en los procesos de ovulación. Estudios al respecto han mencionado que la monta al inicio del estro puede acortar el tiempo de ovulación (21, 84, 112). ¿Inducción natural?

Si se asume que los GAGs tiene un comportamiento mediado por las hormonas es posible pensar que las fluctuaciones de éstos estarán dadas con base al funcionamiento hormonal de cada animal, al respecto Hoang-vut *et al.* citado por Weitze (1989) reportan las altas variaciones individuales que se encuentran en las relaciones temporales entre la máxima receptividad, disminución de progesterona, máximos estrógenos y el pico de LH, éstas razones pueden apoyar el por que en la medición de GAGs solo puede mostrarse una tendencia, y en este estudio las concentraciones no permiten determinar el inicio del estro, por la gran variabilidad por individuo.

Las mediciones vulvares y la temperatura rectal en este grupo, no fue significativa para determinar el día del estro, la temperatura fluctuó considerablemente, esto se puede explicar en parte por los cambios de instalaciones (de maternidad a servicios y posteriormente a las jaulas de gestación) ya que se llegaron a registrar temperaturas corporales de 36°C a las 6:00 am, por lo que se asume que estas variaciones tiene su factor ambiental como fuente de variación.

Caracterización de los GAGs en saliva de cerdas púberes y destetadas

La Figura 10 muestra el comportamiento de los GAGs en el análisis de caracterización por electroforésis en acetatos de celulosa (Figura A) y su corroboración con tratamiento enzimático específico (Figura B). En la Figura A

se observa la presencia del Heparan sulfato (Hs) y el Dermatan sulfato (Ds) un día antes del día marcado como 0. El Heparan sulfato se observa el día 0 y un día posterior a este se ve únicamente el Condroitin sulfato C (CsC). La caracterización mostró el mismo patrón de comportamiento para ambos grupos de hembras muestreadas (púberes y destetadas), lo que indica la factibilidad de la detección del inicio del estro por la identificación del Dermatan sulfato, un día antes de las manifestaciones de estro.

Al comparar los resultados con los de Carranco y col. (1992), podríamos asumir la presencia del Ds como indicador del inicio del estro, y de como éste ya no es detectable en el día que correspondería al estro y solo encontramos al HS. Es probable que exista una reacción química que los una en un momento dado. Ax y Bellin (1988), mencionan que el Ds (también conocido como Condroitin Sulfato B) tiene una relación químicamente más estrecha al Hs que a otros Condroitines sulfatados y las proporciones de estos en el fluido folicular de folículos de bovino son de 90% de Ds y 10% de Hs, y en las células de la granulosa la presencia es 75% de Ds y 25% de Hs, mostrando esto, que el Ds intrafolicular es el más abundante.

Los resultados sobre los tipos de GAGs encontrados en la especie estudiada, difieren de lo observado por Carranco y col. (1992), donde encontraron todos los tipos de GAGs en la orina de mujeres con ciclos menstruales normales e inducidos, pero el mayor componente al momento de la ovulación fue el CsC, ellos valoraron la ovulación con base a estudios de ultrasonografía, análisis de progesterona por RIA y la temperatura basal.

La presencia del CsC al día siguiente del estro en las cerdas, podría estar relacionado con la ovulación o cercano a ésta. Lo cual si resulta comparable a lo encontrado el día de la ovulación en mujeres por Carranco y col. (1992), como

una evidencia indirecta de la posible relación entre los GAGs y el efecto hormonal en los ciclos reproductivos.

Las posibilidades de influencias hormonales para la presentación de los GAGs en la saliva, están entre el pico pre-ovulatorio de la LH o bien con la elevación de los estrógenos que aparece de uno a dos días antes del estro y reflejan un rápido crecimiento y maduración de los folículos de Graaf durante la fase final del proestro (57).

La regulación hormonal de la síntesis de proteoglicanos por las células de la granulosa durante el desarrollo folicular, tal vez es la parte más crítica de la fisiología normal del crecimiento folicular y la maduración del ovocito (119).

La incorporación de sulfatos dentro de los glicosaminoglicanos ováricos, coincide con la formación del antro folicular, cuando hembras de rata hipofisectomizadas tratadas con estrógenos, son inyectadas con FSH (119).

Así la FSH regula la síntesis de GAGs con la subsecuente sulfatación, lo que promueve una marcada incorporación de (^3H) glucosamina dentro de los condroitines y el Heparan secretado por las células de la granulosa de cerdo *in vitro* (7). Ax y Bellin (1988) mencionan la característica química que diferencia a los condroitines de los otros GAGs, y es precisamente la presencia de glucosamina como primer amino-azúcar, a diferencia de la galactosamina que se encuentra en los demás GAGs.

Este dato resulta interesante al revisar la publicación de Rosado (1977), donde analiza la actividad salival de la N-acetil- β -D-glucosaminidasa en saliva, la cual mostró un patrón característico de los cambios de esta enzima durante los ciclos

menstruales de mujeres, observando un pico distintivo en los días 13, 14 y 15 antes de la siguiente menstruación.

Esta elevación de la actividad enzimática mostró relación con el día de mayor temperatura basal y estuvo ausente en mujeres con ciclos anovulatorios. Sus resultados muestran una fuerte sugerencia de que las determinaciones salivales de esta actividad enzimática pueden ser utilizables como un indicador del día de ovulación en mujeres, y ante esto y las relaciones bioquímicas existente entre los GAGs y la enzima mencionada da posibilidades a encontrar GAGs en la saliva, como indicadores de los procesos reproductivos.

La probable relación hormonal de la elevación en concentración de los GAGs con el pico de LH es posible, pero si la FSH estimula la síntesis de GAGs y estos disminuyen cuando los estrógenos aumentan por la acción de la LH en folículo, puede surgir la pregunta sobre: ¿Son las elevaciones de GAGs más fuertemente influenciadas por los niveles de estrógenos que por la LH? Se ha observado que al incrementarse estas las concentraciones de Hs y Cs decrecen en el folículo (17) y éstas disminuciones permitirán la aparición de receptores de unión para la LH y si esto ocurre aparece la ovulación (7, 17).

Los eventos bioquímicos inducidos por la LH que alteran los componentes estructurales de la pared folicular, terminando en la ovulación, no son completamente conocidos (70). Los cambios morfológicos en el ápice del folículo pre-ovulatorio de los mamíferos, que han sido estudiados (44), se observa que, las fibras de colágena en las capas albuginea y teca del folículo pre-ovulatorio son degradadas o disociadas antes de la ovulación (44, 70).

Estos cambios en las fibras de colágena, pueden ser inducidos con una dosis ovulatoria de LH (9), la dispersión de estas fibras de la pared folicular, tal vez

facilitada en parte, por un cambio en la matriz interfibrilar (44, 70). El tejido conectivo interfibrilar de la matriz está compuesto por proteoglicanos y cambios en el tamaño y carga eléctrica de los glicosaminoglicanos contenidos en estos proteoglicanos, pueden estar implicados en las alteraciones de la función tisular (44). Jackson *et al* (1991), con base en estudios histológicos reportan que la matriz interfibrilar decrece antes de la ovulación.

Espey (1971) observó que ésta matriz es digerida por el contenido de estructuras multivesiculares que sobresalen de los fibroblastos en las células de la teca, en el periodo pre-ovulatorio del folículo. Estudios realizados por Jackson (1991), mostraron que la disminución en los componentes interfibrilares, donde el Dermatan sulfato y el ácido hialurónico son específicos del estigma de la región del folículo, la inducción de LH, permite un cambio brusco en los GAGs o el escape de éstos rápidamente fuera del folículo (54).

En este estudio se determinó la presencia del Dermatan sulfato un día antes del día 0, o el día registrado como el inicio del estro. El decremento en el Dermatan sulfato (a nivel folicular), puede ser que disminuya la tensión de la región del estigma, facilitando así la ruptura de la pared folicular para la ovulación (70). Este dato sugiere que el Dermatan sulfato se degrada antes de la ovulación y es liberado a la circulación sanguínea.

El Heparan sulfato no muestra cambios ni en las células de la teca ni en la región del estigma, antes de la ovulación, pero se ha observado la degradación *in vitro* del Heparan sulfato y el Dermatan sulfato del fluido folicular por la plasmina (119). Al observar la Figura 5 con la presencia del Ds y Hs en los días -1 y 0, (respectivamente) nos permite relacionar que son los principales GAGs en el fluido folicular (12) y se conoce que existen sustancias parecidas a la heparina sintetizadas dentro del folículo que son responsables de la actividad

anticoagulante presente en el fluido antral (54) y esta actividad declina o desaparece en folículos de vaca y cerda cuando se acerca la ovulación (54). La degradación enzimática reduce además la viscosidad del fluido folicular y presumiblemente, facilita la liberación del ovocito (119).

Sin embargo, se conoce que la barrera entre el tejido ovárico y el sistema vascular es altamente permeable (54), para que la despolimerización de los GAGs foliculares puede ocurrir antes de la ovulación (70, 119, 122). Incrementos en la cantidad y síntesis de Hs y Ds celular están asociados con la rápida proliferación de células mitóticas (29). Además, la ovulación es también asociada con vasodilatación, hiperemia, edema y extravasación. Todos estos fenómenos son asociados con inflamación de tejidos.

Es posible que la selectiva degradación de las grandes moléculas de proteoglicanos cerca del tiempo de la ovulación sea importante para una ovulación normal (119).

En este estudio, las relaciones de los GAGs detectados en la saliva durante el ciclo estral, están en función de las características de transporte sangre-saliva y la influencia hormonal durante este periodo, lo cual aporta pruebas indirectas de su relación.

Con lo anteriormente expuesto la presente investigación sugiere que la caracterización de los GAGs (Dermatan sulfato), en saliva de cerda puede ser un indicador del inicio del estro.

7. CONCLUSIONES

- 1.- El método para cuantificar los GAGs es sensible y exacto, lo que permite determinar la concentración de GAGs en la saliva de las cerdas.
- 2.- El perfil de las concentraciones de GAGs en la saliva de hembras púberes, describen una elevación significativa ($P < 0.01$) en el día marcado como estro en el promedio de las hembras a las que se muestreo, mostrando un pico en el día del inicio del estro, pero al analizar las concentraciones individuales, estas presentaron una alta variación, durante el ciclo.
- 3.- Las concentraciones de GAGs en la saliva de hembras destetadas describen una diferencia significativa ($P < 0.01$), cuando son analizadas por separado entre primíparas y múltiparas durante los primeros ocho días a partir del destete.
- 4.- Las primíparas manifiestan la elevación de los GAGs, similar a la que se observa en cerdas púberes, en el día del estro, aunque las concentraciones son mayores en las primíparas.
- 5.- Las múltiparas manifiestan la elevación en las concentraciones de los GAGs un día antes de estro, perfil que puede compararse con el comportamiento de los GAGs en las mujeres con ovulación inducida hormonalmente.
- 6.- Durante la caracterización se detectan el día anterior al inicio del estro dos tipos de GAGs, el Heparan sulfato y el Dermatan sulfato, este último ya no se encuentra en el día del estro, lo que motiva el cuestionamiento sobre, ¿Es su presencia indicativa del inicio del estro?. De ser esto cierto la

necesidad de mas investigación se justifica para complementar los resultados del presente trabajo.

- 7.- Al día siguiente del marcado como estro el Condroitin sulfato C, fue determinado en las muestras de saliva de las cerdas estudiadas. Este hallazgo parece coincidir con lo reportado por otros autores como indicador de ovulación en humanos, a este respecto también sería necesario diseñar técnicas de detección específicas para su utilización en el trabajo de investigación en animales domésticos.

ANEXO No. 1

Método de Determinación de la Curva Estándar de GAGs

Para establecer la curva estándar (dosis - respuesta) de GAGs, se pesaron 10 mg de Condroitin tipo III, que se disolvieron y aforaron en 10 ml de agua deionizada, se toman volúmenes de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ml, se aforaron cada uno de ellos a 10 ml con agua deionizada para obtener la concentración final de 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g}/0.1$ ml respectivamente

Procedimiento:

- Tomar alícuotas de 0.1 ml de las diferentes concentraciones de la curva estándar y de las muestras a determinar.
- Adicionar 1 ml de Azul de Alciano (8GX™), agitar (Agitador magnético [Magnestir, Minnesota, USA]), e incubar a temperatura ambiente ($\pm 24^\circ\text{C}$) por 120 minutos y centrifugar a 3000 r.p.m. (Centrífuga [IEC PR-J Centrifuge, Damon- IEC Division, New Jersey, USA]), por 10 minutos y desechar el sobrenadante.
- Lavar dos veces con 2 ml de etanol absoluto y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Disolver el precipitado en 2 ml de Dodecil Sulfato de Sodio al 7 %.
- Leer en el espectrofotómetro (Coleman linear absorbance, Mod. 6/20, Connecticut, USA), a una longitud de onda de 670 nm.
- Trazar la curva estándar (dosis - respuesta) y calcular la concentración de las muestras problema (49).

ANEXO No. 2

Método de Extracción de GAGs

Procedimiento:

El procedimiento se inicia a partir del precipitado seco.

- Lavar el precipitado tres veces; primero con metanol, luego con metanol - éter (1:1) y finalmente con éter, centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y posteriormente secar los precipitados al vacío.
- Digerir el precipitado con papaína en una solución amortiguadora de Acetatos (2 mg de papaína y 1.5 ml de amortiguador por cada 100 mg de precipitado).
- Incubar durante 18 horas a 65°C en baño María, y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Agregar ácido Tricloroacético hasta obtener una concentración final del 7% y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y dializar en agua deionizada por 18 horas.
- Añadir al dializado obtenido Etanol con Acetato de Potasio al 5%, a razón de 3 volúmenes por volumen dializado y congelar durante 15 horas. Posteriormente, centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Lavar el precipitado con 3 ml de Etanol absoluto, agitar y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Disolver el precipitado en 10 ml de agua deionizada y adicionar CPC, gota a gota (promedio de 10 -20 gotas) hasta obtener una reacción completa, agitar e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Disolver el precipitado en 0.5 ml de Cloruro de Litio al 0.5 M y agregar 5 ml de Etanol absoluto, agitar e incubar en el congelador durante 10 minutos y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, repetir este paso tres veces.

- Lavar el precipitado con 3 ml de Etanol absoluto y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
- Secar el precipitado al vacío con éter.
- Pesar los GAGs obtenidos.

Preparación de reactivos:

Solución amortiguadora de acetatos para la digestión con enzima (Papaína).

a) Solución de Acetato de Sodio 0.1 M.

- Pesar 0.824 g (Balanza Analítica, Chyo Júpiter Mod. C3-200™, Chicago, Ill., USA) de Acetato de Sodio y disolverlos con 30 ml de agua deionizada.

b) Solución de Cisteína al 0.005 M

- Pesar 0.0605 g de Cisteína y disolverlos con 30 ml de agua deionizada

c) Solución de EDTA al 0.005 M.

Pesar 0.1871 g de EDTA, disolverlos con 30 ml de agua deionizada.

- Mezclar las tres soluciones [a), b) y c)], ajustar a un pH de 5.5 con un potenciómetro (Metrohm Herisau, Compesator E388, New Jersey, USA) y aforar a 100 ml con agua deionizada.

Solución de Cloruro de Litio al 0.5 M.

- Pesar 1.0598 g de Cloruro de Litio, disolverlos y aforarlos a 50 ml con agua deionizada.

Solución de Cloruro de Cetil Piridinium (CPC) al 5 %.

- Pesar 5 g de CPC, disolverlos y aforarlos a 100 ml con agua deionizada.

ANEXO No. 3

Método de Caracterización de GAGs por Electroforésis

Procedimiento:

- Humedecer la membrana de poliacetato de celulosa (Seprapore III®) en la solución amortiguadora de Acetato de Sodio durante 10 segundos.
- Sacar la membrana de la solución amortiguadora y colocarla en papel absorbente para eliminar el exceso de solución.
- Aplicar en los extremos de las membranas 2 µl de cada uno de los estándares de los GAGs. En la parte central de cada membrana aplicar 4 µl de las muestras problema.
- Colocar la membrana en la cámara de electroforésis (Beckman Instruments, Ltd., England, U.K.) que contiene el amortiguador de Acetato de Bario 0.1 M.
- Aplicar una intensidad de corriente de 8 mA durante dos horas.
- Suspender el suministro de corriente y teñir la membrana con la solución de Azul de Alciano (8GX™) al 0.25% durante 15 minutos.
- Lavar la membrana con solución de 2-etanol 1:1 (v/v). Repetir este paso cuatro veces.
- Colocar la membrana en papel absorbente, dejar secar y observar los desplazamientos de las muestras problema.

Preparación de reactivos:

Solución Estándar de los GAGs (Heparan Sulfato, Dermatan Sulfato, Condroitin Sulfato C, Heparina, Keratán Sulfato y Condroitin Sulfato A).

- Pesar 0.001 g de cada uno de los estándares y disolverlos en 2 ml de agua deionizada.

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 deionizada. Ajustar el pH a 5.8.

Solución amortiguadora de Acetato de Sodio 0.05 M con Cloruro de Magnesio 0.05 M

- Pesar 6.304 g de Acetato de Sodio, 10.166 g de Cloruro de Magnesio, disolver y aforar con agua deionizada. Ajustar el pH a 5.8.

Solución de Azul de Alciano (8GX™) al 0.25 % (w/v).

- Pesar 0.125g de Azul de Alciano (8GX™), disolver y aforar en 50 ml de la solución amortiguadora de sodio.

Soluciones estándares

- Pesar 0.001 g de cada uno de los GAGs y disolverlos en 0.5 ml con agua deionizada.

ANEXO No. 4

Método de Caracterización Enzimática de los GAGs por Electroforésis

Procedimiento:

- Humedecer la membrana en la solución amortiguadora de Acetato de Sodio durante 10 segundos.
- Sacar la membrana de la solución amortiguadora y colocarla en papel absorbente para eliminar el exceso de solución.
- Tomar de 10-20 μg de GAGs y colocarlos en la parte central de la membrana.
- Añadir 200 μl de la solución estándar que contiene condroitinasa ABC.
- Incubar a 37°C durante 60 minutos.

Detener la reacción, incubando el sistema de digestión a 0°C durante 12 horas y llevar a cabo una electroforésis.

Preparación de reactivos:

Amortiguador para la digestión enzimática.

Tris - hidroximetilaminometano (THMAM) al 112.5 mM

- Pesar 0.1362 g de THMAM disolver y aforar a 100 ml con agua deionizada .

Cloruro de Sodio al 62.25 mM.

- Pesar 0.3630 g de Cloruro de Sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua deionizada.

Acetato de Sodio al 75 mM.

- Pesar 0.6150 g de Acetato de Sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua deionizada.

Solución de Condroitinasa ABC (1 UI/200 µl).

- Agregar 1 ml de ABC al frasco original que tiene 5 UI de la enzima.

6. LITERATURA CITADA

1. **Ainsworth, L.**, Tsang, B. K., Downey, B. R. and Marcus, G. J.: The synthesis and actions of steroids and prostaglandin's during follicular maturation in the pig. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, **40**: 137-150 (1990).
2. **Amsterdam, J. R.**, Riesel, R., Mintz, Y., Shemesh, M. and Salomon, Y.: Inhibition of gonadotrophin sensitive adenylate cyclase by ovarian follicular fluid. *Bioch. Biophys. Acta.*, **87**: p. 505 (1979).
3. **Anderson, L.D.** and De Paolo, L.V.: Control of inhibin secretion from the ovary. In: Intra-ovarian Regulation of Reproduction. Eds. Franchimont, P. and C.P. Channing. pp. 343-349. ed. *Academic Press. New York, U.S.A.* 1981.
4. **Andersson, A. M.**, Einarsson, S., Edquist, L. and Lundeheim, N.: Endocrine pattern and external oestrous symptoms at second and fourth oestrus in gilts. *Anim. Reprod. Sci.*, **6**: 301-310 (1984).
5. **Argüello, C.** and Servin, M.: "The importance of extracellular matrix components in development of the embryonic chick heart". Perspectives in cardiovascular research mechanisms of cardiac morphogenesis and teratogenesis. *Raven Press, New York, U.S.A.* **5**: 110-124 (1981).
6. **Ashworth, C. J.**, Fliss, M.F.V. and Bazer, F.W.: Evidence for steroid control of a putative angiogenic factor in the porcine uterus. *J. Endocrinol.*, **125**: 15-19 (1990).
7. **Ax, K.L.** and Bellin, M.E.: Glycosaminoglycans and follicular development. *J. Anim. Sci. (Suppl. 2)*, **66**: 32-49 (1988).
8. **Ax, R. L.** and Ryan, R. J.: The porcine follicle. IV: Mucopolysaccharides at different stages of development. *Biol. Reprod.*, **20**: 1123-1132 (1979).
9. **Ax, R. L.**, Bellin, M. E. and Grimek, H. J.: Properties and regulation of synthesis of glycosaminoglycans by the ovary. Proceedings of the fifth ovarian workshop, Champaign, Illinois, U.S.A., 1985. **14**: pp. 451-480. Eds. *Toft, D. O. and Ryan, R.J.* Illinois, U.S.A. (1985).
10. **Ball, G. D.**, Bellin, M. E., Ax, R. L. and First, N. L.: Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocyte complexes: Morphology and chemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **28**: 113-122 (1982).
11. **Becerril, A. J.**: Programa de eficiencia reproductiva en cerdos. Memorias del Segundo Curso Teórico Práctico de Actualización en Reproducción Animal. Ajuchitlán, Qro., México, 1983. pp. 179-185. Ed. *S.A.R.H.* México, D. F. (1983).

12. **Bellin, M. E. and Ax, R. L.:** Chondroitin Sulphate: an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology*, **114**: 428-434 (1984).
13. **Bellin, M.E., Veldhuis, J.D. and Ax, R.L.:** Follicular Fluid Glycosaminoglycans Inhibit Degradation of Low-Density Lipoproteins and Progesterone Production by Porcine Granulosa Cells. *Biol. Reprod.*, **37**: 1179-1184 (1987).
14. **Benjaminsen, E. and Karlberg, K.:** Postweaning oestrus and luteal function in primiparous and pluriparous sows. *Res. Vet. Sci.*, **30**: 318-322 (1981).
15. **Boender, J.:** The development of AI in pigs in the Netherlands and the storage of boar semen. *Wld. Rev. of Anim. Prod. (Special Issue)*, **2**: 29-32 (1966).
16. **Bolamba, D., Matton, P., Estrada, R. and Dufour, J.:** Ovarian follicular dynamics and relationship between ovarian types and serum concentrations of sex steroids and gonadotrophin in prepubertal gilts. *Ann. Reprod. Sci.*, **36**: 291-304 (1994).
17. **Bushmeyer, S. M., Bellin, M. E., Brantmeier, S. A., Boehm, S. K., Kubajak, C. L. and Ax, R. L.:** Relationships between bovine follicular fluid glycosaminoglycans and steroids. *Endocrinology*, **117**: (3), 879-885 (1985a).
18. **Bushmeyer, S.M., Bellin, M.E. and Ax, R.L.:** Specific binding of(3H) heparin to bovine granulosa cell membranes. *Molec. Cell. Endocr.*, **42**: 135-144 (1985b).
19. **Bustamante, G., García, A. y Ramírez, B.:** Diagnóstico de gestación temprana en bovinos mediante la determinación de la resistencia eléctrica de las secreciones cérvico-vaginales y niveles séricos de progesterona. Memorias del XIX Congreso Internacional de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Urbana-Champaign, Illinois, U.S.A. 1984. pp. 80-82. Urbana-Champaign, Illinois, U.S.A. (1984).
20. **Campbell, K.L. and Valiquett, T.R.:** Do nonhormonal macromolecules cause correlated alteration of granulosa cell responses to FSH *in vitro*?. *Biol. Reprod.* (Suppl. 1), **26**: 102A, Abstract No. 131 (1982).
21. **Cárdenas, H. and Pope, W. F.:** Effect of time of mating relative to ovulation on morphological diversity of swine blastocysts. *Biol. Reprod.*, **49**: 1015-1018 (1993).
22. **Carranco, A., Reyes, R., Hacuja, L. and Delgado, N.:** A rapid method for ovulation detection. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*, **21**: 289-292 (1990).
23. **Carranco, A., Reyes, R., Huacuja, L., Guzmán, A. and Delgado, N.:** Human urinary glycosaminoglycans as accurate method for ovulation detection. *Int. J. Fert.*, **37**: (4), 209-213 (1992).

24. **Castro-Gómez, E.** y Córdoba, S. A.: Efecto de la utilización de montas alternadas sobre la fertilidad y prolificidad en cerdas. Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Asoc. Mex. de Med. Vet. Esp. en Cerdos (AMVEC), Morelia, Mich., México, 1989. pp. 250-252. Eds. López, M.J.R. Y Navarro, F.R. (1989a).
25. **Castro-Gómez, E.**, Becerril, A. J., Cadena, E. y Corona, S.: Efecto de la presencia del semental sobre el intervalo de destete a primer servicio en cerdas. Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Asoc. Mex. de Med. Vet. Esp. en Cerdos (AMVEC), Morelia, Mich., México, 1989. pp. 265-267. Eds. López, M.J.R. Y Navarro, F.R.(1989b).
26. **Choe, J. K.**, Kan-Dawood, F. S. and Dawood, M.: Progesterone and estradiol in saliva and plasma during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynec.*, **147**: 557-562 (1983).
27. **Christenson, R. J.** and Ford, J. J.: Puberty and estrus in confinement reared gilts. *J. Anim. Sci.*, **49**: 743-751 (1979).
28. **Christenson, R. K.** and Teague, H. S.: Synchronization of ovulation and artificial insemination of sows after lactation. *J. Anim. Sci.*, **41**: (2), 560-563 (1975).
29. **Clinton, M.**, Long, W., Williamson, F. Morley, J. and Seddon, B.: Incorporation of ³⁵S into glycosaminoglycans of ovarian follicular and luteal tissue isolated during the guinea pig oestrous cycle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **111**: (2), 574 -580 (1983).
30. **Cole, H. H.** and Cupps, P. T.: Reproduction in Domestic Animals. 3rd. ed. *Academic Press*. New York, U.S.A., 1977.
31. **Conejo, N.J.**: Crecimiento uterino por gestación temporal en cerdas primerizas y su efecto sobre el desarrollo embrionario y el tamaño de camada. Tesis de Maestría. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1992.
32. **Conejo, N. J.**: La inseminación artificial en la producción intensiva del cerdo. En: La producción porcícola en México: Contribución al desarrollo de una visión integral. Ed.: Kato, M. L. pp. 251-274. *Univ. Aut. Metropolitana y Univ. Michoacana de San Nicolás Hidalgo*. Morelia, Mich., México, 1995.
33. **Corovsky, J.**: Relationship between some external signs of oestrus in sows and conception rate after insemination. *Anim. Breed. Abst.*, **39**: (4), 4944-4948 (1970).
34. **DeFelici, M.**, Salustri, A. and Siracusa, G.: "Spontaneous", harding of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. II: The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Res.* **12**: 227-234 (1985).

35. **Delaney**, S. R. and Conrad, H. E.: Changes in disaccharide composition of heparan sulfate fractions with increasing degrees of sulphation. *Biochem. J.* **209**: 315-325 (1983).
36. **Dietrich**, C. P., Sampaio, L. O., De Oca, H. M. and Nader, H. B.: Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. *Ann. Acad. Brasil Cienc.*, **52**: 179-186 (1980).
37. **diZerega**, G.S., Fujimori, K., Tonetta, S.A., Chari, S., Ledwitz-Rigby, F., Rigby, B. and Rodgers, K.F.: Experience with follicle regulatory protein as an inhibitor of folliculogenesis and spermatogenesis *in vivo*. In: Nonsteroidal Gonadal Factors. pp. 235-248. Eds.: Hodgen, G.D., Rosenwaks, Z. and Spieler, D.M. *The Jones Institute Press*. Norfolk, England, U.K. 1988.
38. **Dziuk**, P. J.: Estimation of the optimum time for insemination of gilts and ewes by double mating at certain times relative to ovulation. *J. Reprod. Fert.*, **22**: 277-282 (1970).
39. **Eliasson**, L.: A study on puberty and oestrus in gilts. *J. Vet. Med. 'A'*, **36**: 46-54 (1989).
40. **Ellendorff**, F. and Smidt, D.: Reproduction in the sow from basis to application. *Anim. Res. Develop.*, **29**: 43-52 (1989).
41. **Eppig**, J.: Ovarian glycosaminoglycans: Evidence for a role in regulating the response of the oocyte-cumulus cell complex to FSH. *Endocrinology.*, **108**: 341-350 (1992).
42. **Eppig**, J. J.: FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature.*, **281**: 483-489 (1979).
43. **Eppig**, J. J., Ward-Barley, J. E., Potter, R. and Shultz, R.M.: Differential action of sulfated glycosaminoglycans on follicle-stimulating hormone induced function of cumuli-oophori isolated from mice. *Biol. Reprod.*, **27**: 399-406 (1982).
44. **Espey**, L.L.: Decomposition of connective tissue in the rabbit ovarian follicles by multivesicular structures of thecal fibroblasts. *Endocrinology.*, **88**: 437-444 (1971).
45. **Espey**, L. L.: Ovulation as an inflammatory reaction. A hypothesis. *Biol. Reprod.*, **22**: 73-79 (1980).

46. **Faillace**, L. S. and Hunter, M. G.: Follicle development and oocyte maturation during the immediate preovulatory period in Meishan and white hybrid gilts. *J. Reprod. Fert.*, **101**: 571-576 (1994a).
47. **Faillace**, L. S., Biggs, C. and Hunter, M. G.: Factors affecting the age at onset of puberty, ovulation rate and time of ovulation in Chinese Meishan gilts. *J. Reprod. Fert.*, **100**: 353-357 (1994b).
48. **Fazleabas**, A. T., Segraves, R.N. and Khan-Dawood, F.: Evaluation of salivary and vaginal electrical resistance for determination of the time of ovulation. *Int. J. Fert.*, **35**: (2), 106-111 (1990).
49. **Fellström**, B., Danielson, B. G., Lind, E., Ljunghall, S. and Wikstrom, B.: Enzymatic determination of urinary condroitin sulphate applications in renal stone disease and acromegaly. *Eur. J. Clin. Invest.*, **16**: 292-296 (1986).
50. **Flowers**, B., Cantley, T. C., Martin, M. and Day, D. N.: Episodic secretion of gonadotrophins and ovarian steroids in jugular and utero-ovarian vein plasma during the follicular phase of the oestrous cycle in gilts. *J. Reprod. Fert.*, **91**: 101-112 (1991).
51. **Franchimont**, P., Demoulin, A. and Valcke, J. C.: Endocrine, Paracrine and autocrine control of follicular development. *Horm. Metab. Res.*, **20**: 193-203 (1988).
52. **Franchimont**, P., hazee-Hagelstein, M. T., Hazout, A., Gysen, P., Salat-Baroux, J., Schatz, B. and Demerle, F.: Correlation between follicular fluid contents and the results of *in vitro* fertilization and embryo transfer. III: Proteoglycans. *Biol. Reprod.*, **43**: 183-190 (1990).
53. **Gallager**, J. T. and Walker, A.: Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. *J. Bioch.*, **230**: 665-670 (1980).
54. **Gebauer**, H., Linder, H. and Amsterdam, A.: Synthesis of heparin - like glycosaminoglycan in rat ovarian slices. *Biol. Reprod.*, **18**: 350-358 (1978).
55. **Grimek**, H. J., Bellin, M. E. and Ax, R. L.: Characteristics of proteoglycans isolated from small and large bovine ovary follicles. *Biol. Reprod.*, **30**: 397-402 (1984).
56. **Guraya**, S. S.: Recent advances in the cellular and molecular biology of ovarian follicles. In: human fertility, health and food: Impact of molecular Biology and Biotechnology. D. Puett (ed.). *United Nations Fund for Population Activities*. New York, U.S.A. (1984).
57. **Guthrie**, H. D. and Bolt, D. J.: Changes in plasma Follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estrogen and progesterone during growth of ovulatory follicles in the pig. *Domest. Anim. Endocrin.*, **7**: 83-91 (1990).

58. **Haféz, E. S. E.**, Levasseur, M. C. and Thibault, C.: Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In: *Reproduction in Farm Animals*. 4th edition. Edited by: Haféz, E.S.E., *Lea and Febiger*, Philadelphia, U.S.A. 1980.
59. **Haféz, E.S.**: Porcinos. En: *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 5a. Edición. Ed. *Interamericana. Mc. Graw-Hill*, México, 1989.
60. **Hasegawa, Y.**, Miyamoto, K., Iwamura, S. and Igarashi, M.: Changes in serum concentrations of inhibin in cyclic pigs. *J. Endocrinology.*, **118**: 211-219 (1988).
61. **Higashiyama, S.**, Abraham, J., Miller, J., Fiddes, J.C. and Klagsbrun, M.: A heparin binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* ., **251**: 936 -939 (1991).
62. **Höök, M.**, Keller, L., Johansson, S. and Robinson, J.: Cell-surface glycosaminoglycans. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**: 847-869 (1984).
63. **Hughes, P.**, Pearce, G. and Paterson, A.: Mechanisms mediating the stimulatory effects of the boar on gilt reproduction. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, **40**: 323-341 (1990).
64. **Hunter, M. G.** and Wiesak, T.: Evidence for and implications of follicular heterogeneity in pigs. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, **40**: 162-177 (1990).
65. **Hunter, M. G.**, Biggs, C., Foxcroft, G. R., McNeilly, A. S. and Tilton, S. E.: Comparisons of endocrinology and behavioural events during the periovulatory period in Meishan and Large White hybrid gilts. *J. Reprod. Fert.*, **97**: 475-480 (1993).
66. **Hunter, M. G.**, Grant, S. A. and Foxcroft, G. R.: Histological evidence for heterogeneity in the development of preovulatory pig follicles. *J. Reprod. Fert.*, **86**: 165-170 (1989).
67. **Hunter, R.H.**: Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. ed. *American Press*, U.S.A. pp. 1-30, 1980.
68. **Hutchinson, L. A.**, Findlay, J. K., de Vos, F.L. and Robertson, D.M.: Effects of bovine inhibin transforming growth factor- β and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**: 1405-1412 (1987).
69. **Instituto Nacional de Estadística**, Geografía e Informática: Cuaderno de Geografía de Michoacán. *I.N.E.G.I.* 1986.

70. **Jackson**, J.A., Friberg, C. and Bahr, J.: Preovulatory changes in glycosaminoglycans and collagen content in the stigma region of the follicle of the domestic hen, *Biol. Reprod.* **45**: 301-307, (1991).
71. **Jiménez**, R. A.: Comparación entre el ovogest y el walsmeta MKIV para la determinación del momento óptimo de la inseminación artificial en cerdos. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med.Vet y Zoot.* Universidad Michoacana de San Nicolas Hidalgo, Morelia, Mich, 1990.
72. **King**, G.J: Occurrence of postweaning oestrus in primiparous and pluriparous sows. Proc. 5th Int. Pig Veterinary Society Congress, Zagreb, Pap. K.A. Zrinski Cakovec, Yugoslavia 12. (1978).
73. **Laine**, M. Tenovuo, J.: Effect on peroxidase activity and specific binding of the hormone 17 β - oestradiol and rat salivary glands. *Arch. oral Biol.* **28**: 847 - 852, (1983).
74. **Laine**, M., Tenovuo, J., Lehtonen, O-P., Ojanotko-Harri,A., Vilja, P. and Tuohimaa, P.: Pregnancy - related changes in human whole saliva. *Arch. oral Biol.* **33** (12):913 -917, (1988).
75. **Ledwitz**, R.R., Gross, T.M., Schjeide, O.A., Ribgy, B.N.: Chondroitin-4-sulfate inhibits progesterone secretion by immature porcine antral granulosa cell without influencing estrogen secretion. *Biol. Reprod. (Suppl 1)*., **30**: p. 85 (Abstract) (1987).
76. **Ling**, N., Ying, S. Y., Veno, N., Shimasaki, S. Esch, F., Hotta, M. and Guillermin, R.: A homodimer of the β -subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**: 1129-1137, (1986).
77. **Liptrat**, R. M. and Reasid, J. .: Luteinising hormone activity in blood and urinary estrogen secretion by the sow at estrous and ovulation. *J. Reprod. Fert.* **11**: 439-446, (1966).
78. **Marqués** de Cantú, M.J.: Probabilidad para ciencias químico-biológicas. 1a. Ed. *McGraw-Hill, Interamericana de México.* 1991.
79. **Moghissi**, K.: Prediction and detection of ovulation. *Fert. Steril.* **34**: 89-98, (1980).
80. **Morris**, J., Potter, S. and Gaza-Bulsecó, G.: Estradiol Induces an accumulation of free Heparan sulfate Glycosaminoglycans chains in uterine epithelium. *Endocrinology.* **122**: (1), 242-253, (1988).

81. **Naidoo**, S.S. and Baitera, B.: Effects of menstrual cycle and sex hormones on β -Glucuronidase and β -acetylglucosaminidase. Activities in the baboon sex skin. *Endocrinology*, **86**: 835-842 (1970).
82. **Naidoo**, S.S.: Excretion of urinary glycosaminoglycans during the menstrual cycle in the baboon. *P.S.E.B.M.* **136**: 1014-1019 (1971).
83. **Nimrod**, A. and Lindner, H. R.: Heparin facilitates the induction of LH receptors by FSH in granulosa cells cultured in serum-enriched medium. *FEBS Lett.*, **119**: 155-157, (1980).
84. **Pearce**, G. and Pearce A.N.: Contact with a sow in oestrous or a mature boar stimulates the onset of oestrus in weaned sows. *Vet. Rec.*, **130**: 5-9 (1992).
85. **Polanco**, J.A.: Sistema de detección de estros. Segundo Curso Teórico - Práctico de Actualización en Reproducción Animal. Ajuchitlan, Qro., México. ed. SARH, México. D.F., 37 89 1983.
86. **Polge**, C: Fertilization in the pig and horse. *J. Reprod. Fert.* **54**: 461-470 (1978).
87. **Rayford**, P. L., Brinkley, H.J., Young, E. P. and Reichert, L.E.: Radioimmunoassay of porcine FSH. *J. Anim. Sci.* **39**: 348-352 (1974).
88. **Riad - Fahmy**, D., Read, G., Walker, R., and Griffiths, K.: Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocrine Reviews* **3**(4), 367 - 395, (1982).
89. **Rodríguez**, T. D.: Evaluación de las características de la resistencia eléctrica de las secreciones cérvico vaginales durante el ciclo estral de la cerda. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med.Vet y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1986.
90. **Rojanastheim**, S.: LH-patterns in jugular plasma and oestradiol-17 β and progesterone in utero-ovarian and jugular plasma of primiparous sows around weaning. *J. Vet. Med., A* **35**: 498-505,(1988).
91. **Rosado**, A., Delgado, N., Velazquez,A., Aznar, R. and Martínez-Manautou.J.: Cyclic changes in: salivary activity of N-acetyl - β - D - Glucosaminidase a possible efficient indicator for predicting ovulation and pregnancy. *Obst. Gynecol.*, **128**: 560-565, (1977).
92. **Salomon**, Y., Amir, Y., Azula, R. and Amsterdam, A.: Modulation of adenylate cyclase activity by sulphated glycosaminoglycans. I. Inhibition of heparin of gonadotropin- stimulated ovarian adenylate cyclase. *Biochem. Biophys. Acta.* **554**:262-272.

93. **Sato, E., Miyamoto, H. and Koide, S.S.:** Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid. Promoting viability of oocyte in culture. *Molecular Reprod. Develop.* **26:** 391-397, (1990).
94. **Sato, E., Ueno, H. and Koide, S.S.:** Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and by heparin and heparan sulfate. *Gamete Res.* **13:** 115-124, (1986).
95. **Sato, E., Ishibashi, J., Koide, S.S.:** Prevention of spontaneous degeneration of mouse oocytes in culture by ovarian glycosaminoglycans. *Biol. Reprod.* **37:** 371-376, (1987).
96. **Signoret, J.P.:** Reproductive behaviour pigs. *J. Reprod. Fert., (Suppl.)*, **11:** 105-117, (1970).
97. **Smidt, D.:** Reproductive management in sows with respect to efficiency and pig welfare. *Reprod. Dom. Anim.* **29:** 338-339 (1974)
98. **Soede, N.M., Wetzels, C.S.H., Zondag, W., de Koning, M.A.I. and Kemp, B.:** Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J. Reprod. Fert.*, **104:** 99-106, (1995).
99. **Soede, N.M., Helmond, F.A. and Kemp, B.:** Perioovulatory profiles of estradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *J. Reprod. Fert.*, **101:** 663-641 (1994).
100. **Spector, G.J., Sall, J.P. and Sarle, W.:** Procedures general lineal models. SAS/STAT guide for personal computers 6th edition. Ed: *Institute Inc. North Caroline, USA*, (1986).
101. **Sterning, M., Rydhmer, L., Einarsson, S. and Andersson, K.:** Oestrous symptoms in primiparous sows. 1. Duration and intensity of external oestrous symptoms. *Anim. Reprod. Sci.*, **36:** 305-314, (1994).
102. **Sterning, M., Rydhmer, L., Einarsson, S. and Andersson, K.:** A study on primiparous sows of the ability to show standing oestrus and to ovulate after weaning. Influences of loss of body weight and backfat during lactation and of litter size, litter weight gain and season. *Acta Vet. Scand.*, **31:** 227-236 (1990).
103. **Stroband, H. and rander Lende, T.:** Embryonic and development during early pregnancy in pigs. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, **40:** 261-277, (1990).

104. **Tenovuo**, J., Laine, M., Söderlig, E. and Irjala, K.: Evaluation of salivary markers during the menstrual cycle: Peroxidase, protein and electrolytes. *Biochem. Med.* **25**: 337- 345, (1981).
105. **Tonetta**, S. A. and diZerega, G. S.: Local regulatory factors controlling Folliculogenesis in pigs. *J. Reprod. Fertili., (Suppl.)*, **40**: 151-161, (1990).
106. **Tonetta**, S.A. and diZerega, C. S.: Intraovarian Regulation of Follicular maturation. *Endoc. Rev.* **84**: 205- 229, (1989).
107. **Tonetta**, S.A: and diZerega, G.S.: Paracrine factor of follicular maturation in primates *Endocr. Metab.* **15**: 135-156, (1986).
108. **Treland**, J.J., Roche, J. F.: Development of non ovulatory antral follicles in heifers: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropin. *Endocrinology.* **112**: 150-157, (1983).
109. **Valencia-Méndez**, J.: Fisiología de la reproducción porcina. 1ª ed. *Trillas. México*, (1985).
110. **Vining**, R. F. and McGinley R. A.: The measurement of hormones in saliva possibilities and pitfalls. *J. Steroid Biochem.* **27**: (1-3), 81-94 (1987).
111. **Vining**, R.F., McGinley, R.A. and Symons, R. G.: Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin. Chem.* **29**: 1752-1756, (1983).
112. **Weitze**, K. F., Habeck, O., Willmen, T. and Rath D.: Detection of ovulation in the sow using transcutaneous sonography. *Zuchthyg*, **24**: 40-42, (1989).
113. **Whiteman**, P.: The quantitative determination of glycosaminoglycans in urine with Alcian blue 8GX. *Biochem. J.* **131**: 351-357, (1973).
114. **Whitheman**, P.: The quantitative measurement of alcian Blue - glycosaminoglycans complex. *Biochem. J.* **131**: 343-350, (1973).
115. **Wilmut**, I., Ritche, W. A., Hanley, C. S., Ashworth, C. J. and Ritken R. P.: A comparison of rate and uniformity of development in Meishan and Large White pigs. *J. Rep. Fert.*, **95**: 45-46 (1992).
116. **Wise**, T. and Maurer R.: Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progesterin inhibition of surge. *Dom. Anim. Endocr.* **11**(1): 35-58, (1994).

117. **Yanagashita, M.** and Hascall, V C.: Biosynthesis of proteoglycans by rat granulosa cell cultured in vitro.: Modulation by gonadotropins, steroid hormones, prostaglandins and a cyclic nucleotide *Endocrinology* **109**: 1641-1649 (1981).
118. **Yanagashita, M.** and Hascall, V.C.: Metabolism of proteoglycans in rat ovarian granulosa cell culture. *J. Bioch. Chem.* **259**: 10270-10278, (1984).
119. **Yanagashita, M.**, Rodboard, D. and Hascall, V C.: Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *J. Biol. Chem.* **254**(3): 911-920, (1979a).
120. **Ying, S. Y.:** Inhibins, activins and follistatins Gonadal proteins modulating the secretion of follicle stimulating hormone. *Endocrine. rev.* **9**: 267-293. (1988).
121. **Young, J.A** and van Lennepjo, E.W.: Transport in salivary and sweat glands. In membrane transport in Biology (Edited by G. Grubish, D.C. Tosteson and H.H. Using) Springer Verlag, Berlin (1978).
122. **Zachariae, F.** and Jensen, C.: Studies on the mechanism of ovulation. Histochemical and physicochemical investigations on genuine follicular fluid. *Acta Endocr.* **27**: 343-355 (1958).
123. **Zachariae, F.** Asboe - Hansen, G. and Boseila A.: Migration of basophil leucocytes from blood to genital organs at ovulation in the rabbit. *Acta Endocr.* **28**: 547- 552 (1958).