EVALUACIÓN DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO UROQUINASA EN MUESTRAS SEMINALES PORCINAS

Mondéjar, I., Coy, P. y Gadea, J.
Dept. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Excelencia Mare Nostrum 37/38. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria IMIB-Arrixaca. 30.100. Murcia. España.jgadea@um.es

INTRODUCCIÓN

El sistema plasminógeno-plasmina es uno de los sistemas más importantes con actividad proteasa en el ambiente extracelular. Es un sistema complejo donde intervienen moléculas activadoras, tipo uroquinasa (uPA) y tipo tisular (tPA), e inhibidoras (PAI-1 y PAI-2). Este sistema está relacionado con diferentes aspectos de la función reproductiva del macho, interviniendo en los procesos de espermatogénesis, capacitación, reacción acrosómica y fecundación (Le Magueresse-Battistoni, 2007; Liu, 2007, Coy et al., 2012, Mondejar et al., 2012, Grullon et al., 2013).

En diversos estudios en la especie humana se han medido los valores de uPA en las muestras seminales y se han relacionado con parámetros de calidad seminal y la fertilidad (Van Dreden et al., 1991, Espana et al., 1993, Arnaud et al., 1994, Liu et al., 1996, He et al., 1999, Wang et al., 2006, Ebisch et al., 2007, Liu 2007, Van Dreden et al., 2007). Sin embargo, no se dispone de información suficiente sobre los valores de uPA en muestras seminales porcinas ni sobre la importancia que esta proteína podría tener en la función reproductiva.

El objetivo por tanto del presente estudio fue evaluar la concentración de uPA en plasma seminal y espermatozoides de verracos fértiles y analizar la posible relación con los parámetros de funcionalidad espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron un total de 21 eyaculados de 6 verracos de fertilidad probada procedentes de un centro de inseminación artificial situado en la Región de Murcia. Se evaluaron los parámetros seminales de las muestras en términos de concentración espermática, motilidad (CASA), viabilidad mediante tinción de eosina-nigrosina, morfología y estado del acrosoma. Se centrifugó (3000 g 10 min) una alícuota de un mL de cada muestra para separar el plasma seminal de los espermatozoides. El plasma seminal y el extracto resultante de la sonicación de los espermatozoides en tampón de lisis con tritón X-100 (1%), mediante el empleo de un sonicador digital (Branson Ultrasonics, Dambury, USA) a una amplitud del 20% y durante 20 segundos sobre baño de hielo, fueron conservados a -80 °C hasta la medición de la concentración de uPA.

La determinación de la concentración de uPA en plasma seminal y espermatozoides se realizó mediante un test Elisa (SEA140Po. Uscn Life Science Inc., Wuhan, China). Los resultados se expresaron en ng de uPA/mL, así como ng/10^8 espermatozoides. La presencia de uPA en las muestras seminales fue confirmada mediante un estudio de electroforesis SDS-PAGE, seguido de un análisis de Western blot que permitió detectar la proteína uPA que tiene un peso molecular de aproximadamente 53 kDa.

Los datos se muestran como media ± error estándar de la media. Se aplicó un análisis de correlación de Pearson para relacionar los diferentes parámetros estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de uPA detectados en plasma seminal y espermatozoides (Tabla 1) son, según la información disponible hasta la fecha, la primera referencia en la especie porcina, donde unicamente se dispone de los datos de la valoración de la actividad enzimática (Smokovitis et al., 1987, Zervos et al., 2010).

La concentración de uPa en plasma seminal (17,64±0,60 ng/mL) se encuentra en un rango similar al descrito por diversos autores que analizan muestras humanas (15,5- 32 ng/mL) (Maier et al., 1991, Espana et al., 1993, He et al., 1999, Van Dreden et al., 2007). Al estudiar la posible relación con los parámetros seminales observamos una relación directa con la viabilidad, motilidad total, motilidad progresiva y la morfología espermática normal (Tabla 1,

p<0,05). Mientras que se detecta una relación inversa con la presencia de gotas citoplásmicas proximales y colas en látigo (Tabla 1, p<0,05). En la especie humana algunos autores han descrito valores de uPA en plasma seminal superiores en muestras normozoospermicas en comparación con muestras oligo o/y astenozoospermicas (Maier et al., 1991, Arnaud et al., 1994, Huang et al., 1997, Wang et al., 2006), así como una relación positiva entre el contenido de uPA y la motilidad y la viabilidad espermática (Wang et al., 2006).

La concentración de uPA en el espermatozoide (4,81±0,31 ng/mL y 1,33±0,22 ng/10^7 espermatozoides) presenta unos valores mucho más reducidos (del orden de 10 veces menos) que los descritos en la especie humana en el rango entre 1,6 y 7,7 ng/10^6 espermatozoides (Maier et al., 1991). Previamente se ha descrito que la actividad activadora del plasminógeno (PPA) asociada a la uPA en plasma seminal y espermatozoides era superior en la especie humana que en la porcina (Smokovitis et al., 1987). Estas diferencias pudieran estar relacionadas con el hecho de que en espermatozoides humanos se ha detectado mediante técnicas inmunológicas la presencia de uPA en la membrana plasmática y acrosomal externa, mientras que en los espermatozoides porcinos únicamente se detecta en la membrana plasmática (Smokovitis et al., 1992). Por otra parte, no se encontró una correlación significativa entre la concentración de uPA en el espermatozoide y los parámetros de funcionalidad espermática con excepción de las gotas citoplásmicas distales, velocidad curvilínea (VCL) y amplitud del desplazamiento lateral (ALH; Tabla 1. p<0.05).

Estos resultados ponen de manifiesto la participación de uPA en la funcionalidad espermática. Es necesario profundizar en el estudio el complejo sistema plasminógeno-plasmina incluyendo sus activadores e inhibidores para poder comprender la verdadera importancia funcional de este sistema en los procesos reproductivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Arnaud, A., et al., (1994). Fertil Steril 61(4): 741-745. ● Coy, P., et al., (2012). Hum Reprod 27(7): 1985-1993. ● Ebisch, I. M., et al., (2007). Fertil Steril 87(3): 619-626. ● Espana, F., et al., (1993). Thromb Haemost 70(6): 989-994. ● Grullon, L. A., et al., (2013). Reprod Sci 20(9): 1075-1082. ● He, S., et al., (1999). Mol Hum Reprod 5(6): 513-519. ● Huang, X., et al., (1997). J Tongji Med Univ 17(4): 213-217. ● Le Magueresse-Battistoni, B. (2007). Reproduction 134(6): 721-729. ● Liu, K., et al., (1996). Mol Hum Reprod 2(2): 99-104. ● Liu, Y. X. (2007). Semin Thromb Hemost 33(1): 29-40. ● Maier, U., et al., (1991). J Urol 146(3): 906-908. ● Mondejar, I., et al., (2012). Fertil Steril 97(2): 453-461. ● Smokovitis, A., et al., (1987). Fibrinolysis 1(4): 253-257. ● Smokovitis, A., et al., (1992). Int J Fertil 37(5): 308-314. ● Van Dreden, P., et al., (2007). Semin Thromb Hemost 33(1): 21-28. ● Van Dreden, P., et al., (2007). Semin Thromb Hemost 33(1): 21-28. ● Van Dreden, P., et al., (1991). Andrologia 23(1): 29-33. ● Wang, L., et al., (2006). Zhonghua Nan Ke Xue 12(9): 791-793. ● Zervos, I. A., et al., (2010). Reprod Domest Anim 45(6): e440-446.

Agradecimientos: Ministerio de Economía (MINECO) y FEDER (Proyecto AGL2012-40180-C03-01). CDTI (Proyecto IDI-20120531)

Tabla 1. *Coeficientes de correlación de Pearson entre los valores de uPA en plasma seminal y espermatozoides y diversos parámetros de funcionalidad espermática.*

	Media±sem	**uPA Plasma Seminal (ng/mL)**	**uPA Espermatozoide (ng/mL)**	**uPA Espermatozoide (ng/10^7 células)**
Viabilidad (%)	78,02±2,50	0,54**	0,39	0,17
Motilidad (%)	70,28±2,55	0,51*	0,31	0,25
Motilidad prog. (%)	51,53±4,04	0,47*	0,07	0,09
Morfología (%)	91,79±2,21	0,79*	-0,04	-0,24
Gota Proximal (%)	2,20±1,33	-0,88*	-0,10	0,11
Gota Distal (%)	2,03±0,62	0,15	0,44	0,72*
Cola látigo (%)	2,11±1,06	-0,84*	-0,05	0,14
Acrosoma (%)	83,49±2,94	0,44	0,18	0,18
VCL (µm/s)	71,1±3,44	0,12	0,52*	0,13
ALH (µm)	1,74±0,13	0,20	0,43*	0,10

**Probabilidad <0,05; **Probabilidad <0,01*

UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR MEASUREMENT IN PORCINE SEMINAL SAMPLES

ABSTRACT: Plasminogen-plasmin system has been related to different process of the male reproductive function, as spermatogenesis, sperm capacitation, and fertilization. However, the specific role and importance of uPA for the pig male reproductive function is not well known. The concentration of uPA in seminal plasma (17.64 ± 0.60 ng/mL) and spermatozoa (4,81±0.31 ng/mL and 1,33±0.22 ng/10^7 spermatozoa) were measured in 21 seminal boar samples. A positive relationship between uPA concentration in seminal plasma and sperm functional parameters (motility, viability and morphology) were found ($p<0.05$). On the other hand the uPA concentration in the spermatozoa was related to the presence of cytoplasmic droplets and CASA motility parameters as curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (*ALH*). In our knowledge, it is the first report of the measurement of urokinase in porcine seminal plasma and spermatozoa.

Keywords*:* sperm parameters, pig, urokinase