

## **DETERMINACIÓN DE PLASMINÓGENO EN FLUIDO OVIDUCTAL PORCINO Y BOVINO A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL**

Romar, R. y Coy, P.

Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. 30071 Campus Espinardo, Murcia. España. E-mail: rromar@um.es

### **INTRODUCCIÓN**

El sistema plasminógeno-plasmina, más conocido como sistema fibrinolítico por su papel en la disolución de los coágulos sanguíneos, está implicado en procesos de remodelación y migración celular como la invasión de tejidos por células tumorales (Danø et al., 1985) o la angiogénesis (Rifkin et al., 1983). El componente central del sistema es el plasminógeno (PLG), que es sintetizado principalmente en el hígado en forma de zimógeno inactivo (Raum et al., 1980). El PLG se activa transformándose en la serín proteasa plasmina (PLA) gracias a la acción de alguno de sus dos activadores, el activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) o tipo uroquinasa (uPA). La actividad proteolítica de todo el sistema está controlada, principalmente, por inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAIs) y por  $\alpha$ -antiplasmina.

El sistema PLG-PLA ha sido relacionado con importantes eventos reproductivos como la ovulación (Liu, 2004), la expansión del *cumulus oophorus* (D'Alessandris et al., 2001), la espermatogénesis (Vihko et al., 1984), la motilidad espermática y la reacción acrosómica (Taitzoglou et al., 1986) y la invasión del endometrio por el trofoblasto (Sappino et al., 1989). En nuestro laboratorio hemos podido comprobar además que este sistema participa en el proceso de reconocimiento entre gametos regulando *in vitro* la polispermia en las especies porcina y bovina (Grullón et al., 2008a,b, 2009, 2010). De hecho, se han detectado distintos componentes del sistema PLG-PLA en los gametos de distintas especies: actividad uPA en ovocitos bovinos (Park et al., 1999), tPA en los de rata y ratona (Huarte et al., 1985) y tPA, uPA y PAI-1 en espermatozoides porcinos y humanos (Smokovitis et al., 1992). Las referencias a nivel oviductal son más escasas y el papel del sistema PLG-PLA sobre el proceso de fecundación no ha sido clarificado. Se sabe que en el tejido oviductal bovino hay un alto nivel de ARNm para uPA justo antes de la ovulación y un marcado descenso tras la misma (Gabler et al., 2001). Mientras, el tejido oviductal porcino posee ARNm para PAI-1 (Kouba et al., 2000) y tanto el tejido como el fluido oviductal de hamster tienen actividad PAs (Jimenez-Diaz et al., 2000). Se desconoce sin embargo si el FO de las especies porcina y bovina posee PLG, principal componente del sistema PLG-PLA. Por ello, el objetivo principal del presente trabajo consistió en averiguar si el PLG está presente en el FO de estas especies y si su concentración sufre variaciones a lo largo del ciclo estral.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Los oviductos acompañados de su ovario se recogieron de cerdas y vacas sacrificadas en el matadero y se transportaron al laboratorio en un termo a 4 °C en el plazo máximo de 2 horas tras el sacrificio. Una vez en el laboratorio, los oviductos fueron clasificados en las distintas fases del ciclo estral (folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía) según el aspecto y la morfología ovárica (Carrasco et al., 2008a,b). Seguidamente, los oviductos se separaron de sus ovarios y se disecaron hasta aislarlos del mesosalpinx. Todo el procedimiento se realizó a 4 °C. El fluido oviductal (FO) se obtuvo por aspiración introduciendo por la ampolla oviductal la punta de una pipeta automática calibrada en 200 $\mu$ l, ejerciendo una presión manual ascendente en dirección istmo-ampolla y aspirando el contenido oviductal que fue transferido a un tubo eppendorf y centrifugado (7000xg, 5 minutos, 4 °C) para descartar los posibles restos celulares aspirados durante la manipulación. Tras la centrifugación se descartó el sedimento celular y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su análisis. Se aspiraron los oviductos necesarios para obtener dos muestras de cada fase del ciclo estral en cada especie.

La determinación de PLG se realizó mediante espectrofotometría utilizando un sustrato conjugado a p-nitroanilina (S-2251, Chromogenix, Milán, Italia) válido para determinar tanto

PLA como PLG que haya sido activado con estreptoquinasa (Friberger, 1975). Una vez activado el PLG en PLA, ésta escinde el sustrato cromogénico liberando la p-nitroanilina cuya absorbancia se mide a 405 nm. Se realizó una recta de calibración a partir de soluciones estándar (0, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 µg/ml) de plasminógeno bovino (BPLG, Molecular Innovations, Miami, EEUU). En el día del ensayo, se descongelaron las muestras de fluido oviductal porcino (FOP) y bovino (FOP) y se diluyeron 1:40 (v/v) con tampón Tris-NaCl (pH=7.4). A continuación se incubaron 20 µl de la muestra diluida con 10 µl (5 Unidades) de estreptoquinasa (S8026, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EEUU) durante 10 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se añadieron 70 µl de sustrato cromogénico diluido en tampón Tris-NaCl (concentración final 3 mM) e inmediatamente se inició la medición de absorbancia en un espectrofotómetro (FLUOstar Galaxy, BMG Lab. Technologies, Durham, EEUU) durante 180 minutos. Se realizó un control negativo con PLG no activado, un control positivo con 3.75 Unidades de PLA (P1867, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EEUU) y un control de tejido con FO no activado. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Al valor de absorbancia de cada muestra de FO se le restó el valor del control de tejido. Se realizó una recta patrón a partir de las pendientes de las soluciones estándar y se calculó la concentración de PLG a partir del incremento de absorbancia de cada una de las muestras. Los datos se expresan como media ± SEM y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con la fase del ciclo estral como factor fijo. Se consideraron valores significativos aquellos con  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que tanto el FOP como el FOB contienen PLG y que su concentración no varía a lo largo del ciclo estral en ninguna de las dos especies ( $P > 0,05$ ). No hemos encontrado referencias sobre la presencia de PLG o sus valores normales en FO de ningún mamífero. Como hemos comentado, el PLG se sintetiza mayormente en el hígado desde donde es liberado al torrente sanguíneo. Puesto que el FO es fundamentalmente un trasudado de suero, parece lógico pensar que la concentración de PLG en FO debiera estar cercana a la de PLG en el plasma sanguíneo. Aunque no hemos encontrado referencias para las especies porcina y bovina, la concentración media de PLG en plasma sanguíneo humano es de 12,2 mg/dl, con un rango desde 7,7 a 16,8 mg/dl (Leipnitz et al., 1988) por lo que la concentración de PLG en FO de las especies porcina y bovina se encuentran cercanos a los referidos en sangre para la especie humana. La síntesis del zimógeno PLG se realiza mayoritariamente a nivel hepático, órgano que se sitúa fuera del control hormonal de las gonadotropinas, lo que explicaría por qué los niveles de PLG no se ven afectados a lo largo del ciclo estral. Así pues, en el FO la concentración del PLG procedente del plasma sanguíneo se mantendría constante mientras que serían los activadores e inhibidores del PLG los que regularían la actividad proteolítica del sistema. De hecho se han descrito cambios en la síntesis o actividad de los activadores y/o inhibidores de PLG a lo largo del ciclo estral en la cerda (Tsantariotou et al., 2005) y el hámster (Jiménez Díaz et al., 2000). El hecho de que el PLG, principal componente del sistema PLG-PLA, se encuentre en niveles estables en el FO a lo largo de todo el ciclo estral nos hace pensar que el sistema PLG-PLA podría participar *in vivo* en el proceso de fecundación y/o el desarrollo embrionario temprano, ya que este PLG podría activarse a PLA por los activadores presentes en los gametos y el tejido oviductal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carrasco, L., Coy, P., Avilés, M., Gadea, J., Romar, R. 2008a. *Reprod Fertil Dev* 20: 808-817.
- Carrasco, L., Romar, R., Avilés, M., Gadea, J., Coy, P. 2008b. *Reproduction* 136: 833-842.
- D'Alessandris, C., Canipari, R., Di Giacomo, M., Epifano, O., Camaioni, A., Siracusa, G., Salustri, A. 2001. *Endocrinology* 142: 3033-3040.
- Danø, K., Andreasen, P., Grøndahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L., Skriver, L. 1985. *Adv Cancer Res* 44: 139-266
- Friberger, P. 1975. *Haemostasis* 7: 138-145.
- Gabler, C., Killian, G.J., Einspanier, R. 2001.

*Reproduction* 122: 121-130. • Grullón, L., Saavedra, M.D., Matas, C., Coy, P. 2008a. *Reprod Dom Anim* 43: 63 (abst.). • Grullón, L., Saavedra, M.D., Waldschmitt, N., Coy, P. 2008b. *Reprod Dom Anim* 43: 80 (abst.). • Grullón, L., Mondejar, I., Coy, P. 2009. *GEMINI general conference (Cost action FA0702)*: 96 (abst.). Alghero (Italia). • Grullón, L., Mondéjar, I., Matás, C., Romar, R., Coy, P. 2010. *Reprod Dom Anim* 45: 66 (abst.). • Huarte, J., Belin, D., Vassalli, J. 1985. *Cell* 43: 551-558. • Jimenez Diaz, M., Giunta, S., Valz-Gianinet, J., Pereyra-Alfonso, S., Flores, V., Miceli, D. 2000. *Mol Reprod Dev* 55: 47-54. • Kouba, A.J., Alvarez, I.M., Bui, W.C. 2000. *Biol Reprod* 62: 501-510. • Leipnitz, G., Miyashita, C., Heiden, M., von Blohn, G., Kohler, M., Wenzel, E. 1988. *Haemostasis* 18: 61-68. • Liu, Y. 2004. *Front Biosci* 9: 3356-3373. • Park, K., Choi, S., Song, X., Funahashi, H., Niwa, K. 1999. *Biol Reprod* 61: 298-304. • Rifkin, D., Moscatelli, D., Gross, J., Jaffe, E. 1983. *Symp Fundam Cancer Res* 36: 187-200. • Raum, D., Marcus, D., Alper, C., Levey, R., Taylor, P., Starzl, T. 1980. *Science* 208: 1036-1037. • Smokovitis, A., Kokolis, N., Taitzoglou, I., Rekkas, C. 1992. *Int J Fertil* 37: 308-314. • Taitzoglou, I.A., Kokolis, N., Smokovitis, A. 1996. *Mol Androl* 8: 187-197. • Vihko, K.K., Suominen, J.J., Parvinen, M. 1984. *Biol Reprod* 31: 383-389. • Tsantariotou, M.P., Zervos, I.A., Vatzias, G., Billinis, C., Taitzoglou, I.A., Kokolis, N.A. 2005. *Theriogenology* 64: 1007-1015.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el MEC y los fondos FEDER (AGL2009-12512-C02-01).

**Tabla 1:** Concentración de PLG (mg/dl) en fluido oviductal porcino (FOP) y bovino (FOB) recogido en distintas fases del ciclo estral. Valor de P para el efecto de la fase del ciclo estral en cada especie.

	FOP	FOB
Folicular temprana	9,31 ± 0,40	9,24 ± 0,08
Folicular tardía	9,25 ± 0,12	9,27 ± 0,35
Luteal temprana	9,27 ± 0,22	9,25 ± 0,12
Luteal tardía	9,23 ± 0,15	9,24 ± 0,17
Valor P	0,29	0,68

#### DETERMINATION OF PLASMINOGEN IN PORCINE AND BOVINE OVIDUCTAL FLUID DURING THE ESTRAL CYCLE

**ABSTRACT:** The plasminogen-plasmin (PLG-PLA) system is known as the fibrinolytic system because its role in the lysis of the blood clots. The zymogen PLG, mainly synthesized in the liver, is activated into the protease PLA and the system has been related to important reproductive events such as ovulation, sperm motility, acrosome reaction and implantation. Our group has shown that it is also involved in controlling polyspermy after *in vitro* fertilization in pig and cow. Different components of the system have been referred in gametes but its presence in the oviduct is not so well described and its role in fertilization has not been elucidated. Our objective was to determine whether the porcine (POF) and bovine oviductal fluid (BOF) contain PLG. Oviducts were collected in the slaughterhouse and classified into the different phases of the oestrus cycle according to the ovarian morphology. Oviducts were dissected, oviductal fluid aspirated, centrifuged to remove cellular debris and stored until use. PLG was determined by an enzymatic assay using a chromogenic substrate and measuring the absorbance at 405 nm. Results showed that both POF and BOF contain PLG (around 9.30 mg/dl in all phases) and its concentration does not vary along the oestrus cycle.

**Keywords:** plasminogen, oviductal fluid, porcine, bovine