

Degradación enzimática de TRH y análogos en semen humano. Posible función en la fertilidad

(Enzymatic degradation of TRH and TRH like peptides in human semen. Possible function in fertility)

Fernández, David

Univ. del País Vasco. Fac. de Ciencias. Dpto. de Biología Animal. Sarriena, s/n. 48940 Leioa

Gil, Javier; Larrinaga, Gorka; Irazusta, Jon

Univ. del País Vasco. Fac. de Medicina y Odontología. Dpto. de Fisiología. Sarriena, s/n. 48940 Leioa

Ochoa, Carmen

Clínica Euskalduna. C/ Euskalduna, 10. 48008 Bilbao

Mujika Garay, Juan

Univ. del País Vasco. Esc. Univ. de Enfermería. Dpto. de Enfermería I. Sarriena, s/n. 48940 Leioa

BIBLID [1577-8533 (2001), 4; 19-35]

Recientemente se ha descrito la presencia en semen humano de un péptido similar a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) directamente implicado en la fertilidad, habiéndose denominado FPP (péptido promotor de la fertilidad). Se han determinado las actividades de las peptidasas más importantes en la degradación de estos péptidos en semen en distintos diagnósticos. Aunque se registran diferencias significativas en la actividad enzimática entre los distintos diagnósticos, dichas variaciones no son lo suficientemente claras como para aceptar estas peptidasas como marcadores válidos.

Palabras Clave: Semen. Humano. Fertilidad. Aminopeptidasa. Peptidasa. TRH FPP.

Ugalkortasun arloan egindako azken aurkikuntzen artean tirotropinaren hormona askatzailearen (TRH) antzeko péptido baten aurkikuntza azpimarratzekoa da. Péptido honek ugalkortasunaren prozesuan eragin zuzena duela aurkitu da, izan ere ugalkortasuna errazten duen péptidoa izendatu diote (FPP). Haziko zatikietan ematen den péptido hauen apurketan peptidasa garantzitsuenen funtzioa ezartzeko asmoz eta ugalkortasunarekin erlazionatutako diagnostiko adierazle bezala balio dezaketean frogatzeko asmoz, bere aktibitate entzimatikoa neurtu dira. Diagnostiko desberdinen artean aldaketa adierazgarriak badira ere, diferentziak ez dira nahiko argiak peptidasa hauek adierazle baliogari bezala onartzeko.

Giltz-Hitzak: Hazia. Giza. Ugalkortasuna. Aminopeptidasa. Peptidasa. TRH FPP.

Parmi les derniers découvertes réalisées dans le champ de la fertilité il faut détacher la présence dans le liquide séminal humain d'un peptide similaire à l'hormone libératrice de tirotrópina (TRH) directement impliqué dans ce procès qui a été nommé FPP (fertilization promoting peptide). Afin d'établir le rôle des peptidases les plus importants dans la dégradation de ses peptides dans les fractions séminales et de vérifier s'ils peuvent servir comme marqueurs des divers diagnostics séminales relationnés avec la fertilité, les activités enzymatiques ont été déterminés. Malgré les différences significatives parmi les deux diagnostics, ces variations ne sont pas suffisamment claires pour accepter ces peptidasas comme des marqueurs validés.

Mots Clés: Sperm. Humain. Fertilité. Aminopeptidase. Peptidase. TRH FPP.

1. INTRODUCCIÓN

El problema de la infertilidad es una causa de preocupación para un sector importante de la sociedad. Por ello, se han realizado infinidad de estudios con el fin de analizar sus causas. A pesar de esto, en la actualidad seguimos sin disponer de un parámetro claro que nos indique la fertilidad de los espermatozoides humanos. En un principio las investigaciones se encaminaron hacia el estudio de aspectos morfológicos tales como la forma, la vitalidad, la densidad y la motilidad de los espermatozoides. Posteriormente, tras no obtener la fiabilidad esperada, se estudiaron aspectos bioquímicos a la búsqueda de un posible marcador de la fertilidad. Con estos estudios morfológicos y bioquímicos se establecieron los parámetros de normalidad seminal de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Aunque siguiendo estos criterios se puede determinar la existencia de una patología seminal, existen casos en los que no encontramos ninguna clase de patología y si un déficit reproductivo, es decir, el hecho de presentar un diagnóstico seminal normal no es sinónimo de fertilidad (7,21).

Actualmente, y debido a las continuas investigaciones en este campo, siguen apareciendo nuevos factores implicados en la fertilidad que aumentan la complejidad de este proceso. En este sentido, recientemente se ha descrito la presencia en el semen humano de una serie de péptidos que parecen estar implicados en la fertilidad. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y péptidos análogos son los que presentan mayores evidencias de estar implicados en la fertilidad. La TRH es un tripéptido con estructura piroglutamil-histidil-prolilamida ($pGlu-His-ProNH_2$) que fue descrito por primera vez como hormona liberadora hipotalámica que provoca la estimulación de las hormonas tiroideas. Posteriormente, este péptido ha sido localizado en otras regiones cerebrales y también en otros órganos extracerebrales como el páncreas y el hígado (1). La TRH y péptidos análogos han sido encontrados en próstata (14, 17) y en plasma seminal en grandes concentraciones (6, 17).

Entre los péptidos análogos a la TRH, el tripéptido de estructura piroglutamil-glutámico-prolilamida parece tener un papel relevante en la fecundación tanto en el ser humano como en otros mamíferos. En este sentido, se ha descrito que parece estimular, *in vitro*, la capacidad fecundadora de los espermatozoides por lo que se le ha denominado péptido promotor de la fecundación (FPP) (15). Estudios posteriores sugieren que este péptido podría tener un efecto significativo en la fertilidad “*in vivo*” (10).

Otros de los tripéptidos involucrados en este proceso serían los de estructuras piroglutamil-glutamina-prolilamida y piroglutamil-fenilalanina-prolilamida. Por un lado, el piroglutamil-fenilalanina-prolilamida produce un ligero efecto estimulador sobre la capacidad fertilizadora de los espermatozoides. Sin embargo, cuando se emplea junto con el FPP no tiene un efecto aditivo (10). Por otro lado, el piroglutamil-glutamina-prolilamida presenta un interés especial ya que actúa inhibiendo la estimulación producida por el FPP (10).

De lo visto anteriormente se deduce que es fundamental que la estructura molecular del FPP permanezca intacta para que pueda llevar a cabo su función estimuladora, ya que un cambio en el aminoácido central varía su función (caso del piroglutamil-glutamina-prolilamida). Además, con la deaminación también se produce una pérdida de la acción estimuladora, lo cual viene a reforzar esta hipótesis.

Por otro lado, parte de la presencia de estos péptidos en el semen, tanto TRH como sus análogos, es debida a una secreción desde la próstata. Si por alguna razón se produjera una anomalía en la función de la próstata se podría segregar más piroglutamil-glutamina-prolilamida de lo habitual, de tal manera, que se alteraría la estimulación producida por el FPP siendo ésta una posible causa de infertilidad. Es decir, la proporción relativa de FPP y otros péptidos análogos podría tener un efecto sobre la fertilidad (10).

Uno de los principales mecanismos de control de los péptidos es mediante su degradación hidrolítica por peptidasas. Así, el estudio de estas enzimas nos aportaría información sobre la función de estos péptidos en la fertilidad humana. Actualmente se han descrito tres enzimas capaces de degradar el tripéptido TRH en el organismo; dos aminopeptidasas, la piroglutamil aminopeptidasa I (PGAI, EC 3.4.19.3) y la piroglutamil aminopeptidasa II (PGAI, EC 3.4.19.6) y una endopeptidasa, la prolil endopeptidasa (PE, EC 3.4.21.26). En la figura 1 se muestra el lugar en el que actuaría cada enzima sobre la TRH.

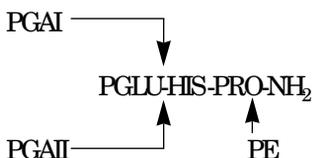


Figura 1. Degradación enzimática de la TRH

La PGAI, enzima presente tanto en el citosol como en la membrana, hidroliza el aminoácido piroglutámico N-terminal de diversos péptidos, actuando sobre el enlace piroglutámico-aminoácido (pGlu-Aa) excepto sobre el enlace piroglutamil-prolina (4). En este sentido, además de hidrolizar la TRH es también capaz de degradar la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), la neurotensina y la bombesina (4).

La otra aminopeptidasa, la PGAI, es un enzima unido a membrana que ha sido purificado en diferentes especies animales (18). Al igual que la PGAI hidroliza el piroglutámico N-terminal peptídico, sin embargo y a diferencia con la anterior su rango de especificidad por el sustrato es mucho mayor actuando casi exclusivamente sobre la TRH y péptidos similares (19).

En cuanto a la PE, se trata de un enzima presente en ambas fracciones celulares, citosólica y unida a membrana, habiéndose purificado también en

varias especies animales (20). A diferencia de las anteriores es una endopeptidasa y degrada péptidos que contengan el enlace prolina-aminoácido, por la parte carboxilo de la prolina, excepto sobre el enlace prolina-prolina. Entre los sustratos que hidroliza se encuentran los siguientes; TRH, LHRH, sustancia P, oxitocina, vasopresina...(16).

Aunque a nivel celular el papel de estas enzimas en la regulación de los niveles de la TRH está bien establecido, no ocurre lo mismo a nivel seminal quedando muchos aspectos sin aclarar. Sin embargo, si se ha descrito en semen humano la presencia de un enzima similar a la prolil endopeptidasa que cataliza la ruptura de la amina que bloquea el extremo carboxilo de la TRH (24) y también se ha descrito la presencia del metabolito diketopiperacina (producto de la hidrólisis de la TRH por acción de las dos piroglutamil aminopeptidasas) (22). Al mismo tiempo, se ha propuesto que la principal vía de degradación, tanto de la TRH como del FPP, sea mediante un enzima de unas propiedades similares a la prolil endopeptidasa (24).

Actualmente tampoco se sabe si las posibles variaciones peptídicas producidas en situaciones fisiológicas (edad) y patológicas (infertilidad e hiperplasias) son debidas a modificaciones en su degradación tal como se ha sugerido a nivel de otros tejidos (12, 13).

Por otro lado, la mayoría de estos estudios se han realizado en semen sin fraccionar o tras una simple separación en espermatozoides y líquido seminal, sin embargo apenas hay trabajos en los que se haya tenido en cuenta a los prostasomas. Estos, son unas vesículas membranosas secretadas por la glándula prostática (23). Estas estructuras poseen diversas funciones fisiológicas entre las que destacaríamos: aumentar la motilidad de los espermatozoides (25, 8, 9) y facilitar la licuefacción del semen (5). En este sentido, se ha propuesto que los prostasomas puedan estar relacionados con la capacidad fertilizadora del semen humano.

Por todo ello sería interesante establecer de una forma precisa las actividades de las enzimas degradadoras de TRH y péptidos análogos, analizando cada una de las fracciones seminales, para determinar la posible función fisiológica de estas peptidasas y su posible implicación en la fertilidad. En el caso de que existiera una relación clara entre los niveles enzimáticos y alguna de las patologías podrían utilizarse como medio de diagnóstico de las mismas. Este ha sido precisamente el objetivo del presente Proyecto de Investigación.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Clasificación de las muestras seminales

Las muestras seminales se obtuvieron en la Clínica Euskalduna. Asimismo, en esta Clínica se realizó el diagnóstico de las distintas muestras en función de los parámetros de normalidad seminal establecidos por la OMS en 1992, destacando entre estos volumen del eyaculado, pH, concentración de

espermatozoides por mililitro, grado de movilidad, morfología, vitalidad, número de leucocitos, inmunobead test, Mar test y una serie de parámetros bioquímicos (alfa-glucosidasa, zinc, ácido cítrico, fosfatasa ácida y fructosa). Según estos parámetros se pueden clasificar, entre otros, los siguientes diagnósticos:

- Asteno spermia (A): Relativo a la movilidad de los espermatozoides
- Terato spermia (T): Relativo a la morfología de los espermatozoides
- Necro spermia (Ne): Relativo a las formas muertas
- Oligo spermia (O): Se produce cuando la concentración de espermatozoides por mililitro es inferior a 20 millones.
- Cripto spermia (Cr): Se trata de una oligo spermia muy severa
- Azo spermia (Az): Ausencia de espermatozoides
- Hipo spermia (Hi): Relativo al volumen del semen eyaculado
- Normo spermia (N): Normalidad seminal

A continuación presentamos los grupos que hemos seleccionado para el estudio que no son sino una combinación de los diagnósticos anteriormente citados.

A	Asteno spermia
AT	Asteno-terato spermia
ANeT	Asteno-necro-terato spermia
OANeT	Oligo-asteno-necro-terato spermia
NeT	Necro-terato spermia
N	Normo spermia
F	Fértil

2.2. Obtención de las fracciones seminales

Una vez clasificadas las muestras, se procede a la separación de las distintas fracciones seminales objeto de estudio. Estas fracciones han sido las siguientes: líquido seminal, fracción prostasomal soluble y fracción prostasomal unida a membrana. El método empleado en la obtención de estas fracciones está basado en el descrito por Carlini y cols en 1997.

Así, primeramente la muestra seminal es centrifugada a 800g durante 10 minutos, desechando la pastilla producida (P1) eliminando de esta manera los espermatozoides. Con el fin de eliminar una posible contaminación debida a los espermatozoides, el sobrenadante obtenido (S1) se centrifuga de nuevo a 1.000g durante 20 minutos.

La pastilla obtenida (P2) se desecha de nuevo mientras que el sobrenadante (S2) se ultracentrifuga en esta ocasión a 100.000g durante 2 horas. Tras esta centrifugación en el sobrenadante (S3) se obtiene ya la fracción del líquido seminal, sin embargo y con el fin de purificarla aún más se centrifuga de nuevo a 35.000g durante 35 minutos obteniendo finalmente en el sobrenadante (S4) el líquido seminal.

En la pastilla obtenida en la tercera centrifugación (P3) se encuentra la fracción prostasomal. Esta se resuspende y homogeniza con tampón tris 10 mM (pH=7'4). A continuación se centrifuga a 35.000g durante 35 minutos obteniendo en el sobrenadante (S'4) la fracción prostasomal soluble y en la pastilla (P'4) la fracción prostasomal unida a membrana. La realización de todas estas centrifugaciones se ha llevado a cabo a 4º C, para evitar la degradación de las proteínas.

2.3. Determinación de las actividades enzimáticas

Tras la obtención de las fracciones seminales, se determina la actividad de los enzimas seleccionados para el estudio en cada una de ellas. Estos enzimas han sido los siguientes:

- piroglutamil-aminopeptidasa I (PGAI, EC 3.4.19.3)
- piroglutamil-aminopeptidasa II (PGAII, EC 3.4.19.6)
- prolil-endopeptidasa (PE, EC 3.4.21.26)

En la determinación de las estas actividades se han empleado los siguientes sustratos:

- | | |
|-------|-------------------------------|
| PGAI | Piroglutamil-beta-naftilamida |
| PGAII | TRHbeta-naftilamida |
| PE | Z-Gly-Pro-beta-naftilamida |

La determinación de la actividad de la PGAI y de la PE se ha llevado a cabo de la siguiente manera. Las muestras seminales se incuban con las soluciones sustrato. La acción de las enzimas presentes en la muestra hidrolizará el sustrato liberando por un lado el sustrato (piroglutámico, Z-Gly-Pro) y por otro el residuo beta-naftilamida. Esta última, por acción del enzima se libera en forma de beta-naftilamina siendo este compuesto fluorescente, de tal manera, que cuando es excitado con una luz de 345nm de longitud de onda emite parte de esta energía a una longitud de onda de 412nm. Esta propiedad permite determinar fácilmente con la ayuda de un espectrofluorímetro la fluorescencia emitida por la beta-naftilamina. Posteriormente y mediante el empleo de un patrón realizado con concentraciones conocidas de beta-naftilamina se puede calcular la cantidad de beta-naftilamina liberada a partir de la fluorescencia emitida.

Para el caso de la determinación de la actividad de la PGAII, hasta ahora se habían empleado técnicas radiométricas. Posteriormente se desarrollaron técnicas fluorimétricas basadas en reacciones acopladas que no resultaban muy adecuadas para los ensayos bioquímicos. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una técnica fluorimétrica directa basada en la utilización del sustrato fluorimétrico TRHbeta-naftilamina y de inhibidores específicos de la PGAI y de la PE (11, 2, 4). Este ha sido precisamente el método que hemos empleado en la determinación de la actividad de este enzima. Tras un periodo de incubación, debido a la acción enzimática sobre el sustrato se

libera por un lado piroglutámico y por otro el metabolito histidina-prolina-beta-naftilamina. A continuación se somete la muestra a una temperatura de 80° C durante 30 minutos liberándose de esta manera la beta-naftilamina del metabolito histidina-prolina. La beta-naftilamina liberada se determina de la misma manera que en el caso anterior.

2.4. Determinación de proteínas

Para la determinación de las proteínas presentes en la muestra se ha utilizado el método de Bradford (1976). Este método está basado en la afinidad de un colorante por el enlace peptídico de las proteínas siendo un método muy preciso y uno de los más utilizados en investigación. Tras la adición del reactivo de Bradford a la muestra se determina el incremento de absorbancia producido por medio de un espectrofotómetro. Posteriormente, el valor de absorbancia determinado se extrapola en un patrón de albúmina para calcular la cantidad de proteína existente en la muestra.

Finalmente, una vez determinada la actividad enzimática y la cantidad de proteína presente en la muestra, los resultados de la actividad de los enzimas se expresan en forma de actividad específica, es decir, en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/mg prot). Hemos definido una unidad de peptidasa (UP) como la cantidad de peptidasa que hidroliza un picomol de sustrato-beta-naftilamida por minuto.

2.5. Método estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se ha llevado a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se han comparado dos a dos mediante el test de Fisher PLSD y el Scheffe F-test. Todo ello se ha realizado con el programa de estadística Statview de Macintosh.

3. RESULTADOS

A continuación vamos a presentar los resultados obtenidos en las determinaciones de las actividades enzimáticas en cada una de las fracciones estudiadas.

3.1. Piroglutamil-aminopeptidasa I (PGAI)

3.1.1. LÍQUIDO SEMINAL

En la tabla 1 se presentan los niveles de actividad de la PGAI en el líquido seminal, el índice de significación calculada mediante una ANOVA, así como las medias y los errores estándar en cada diagnóstico. En la tabla T2

aparecen las diferencias significativas entre los distintos grupos y con los diferentes test estadísticos empleados.

En la tabla 1 se observa como la diferencia entre diagnósticos seminales es significativa (ANOVA, $p < 0.0001$). Asimismo, se puede apreciar como los mayores niveles de actividad se dan en los grupos que presentan el diagnóstico teratozoospermia encontrándose los máximos en el grupo oligo-asteno-necro-teratozoospermia. Por otro lado, los niveles de actividad más bajos se producen en los grupos asteno y normozoospermia.

Por otro lado, en la tabla 2 se observa como las mayores diferencias se producen entre el grupo oligo-asteno-necro-teratozoospermia y los grupos astenozoospermia y normozoospermia, respectivamente.

3.1.2. FRACCIÓN PROSTASOMAL SOLUBLE

En la tabla 3 se presentan los resultados de la actividad de la PGAI en el fracción prostasomal soluble, la probabilidad de la ANOVA y las medias y los errores estándar en cada diagnóstico. En la tabla 4 aparecen las diferencias significativas entre los distintos grupos y con los diferentes test estadísticos empleados.

Al igual que en el anterior caso existen diferencias significativas entre los distintos diagnósticos seminales (ANOVA, $p < 0.0425$). Los mayores niveles de actividad se producen en el grupo fértil mientras que los menores aparecen en el grupo necro-teratospermia. El test de Fisher indica las diferencias significativas entre algunos grupos.

3.1.3. FRACCIÓN PROSTASOMAL UNIDA A MEMBRANA

En la tabla 5 se presentan los resultados de la actividad de la PGAI en el fracción prostasomal unida a membrana, el índice de significación calculada mediante una ANOVA, así como las medias y los errores estándar en cada diagnóstico. En este caso no se observan variaciones significativas ($p < 0.4136$) en la actividad de este enzima entre los diferentes grupos manteniendo la mayoría de ellos unos niveles de actividad entre 300 y 400 UP/ mg.

3.2. Piroglutamil-aminopeptidasa II (PGAII)

3.2.1. FRACCIÓN PROSTASOMAL UNIDA A MEMBRANA

En el caso de este enzima solo se ha determinado su actividad en la fracción prostasomal unida a membrana ya que no se ha descrito su presencia en la fracción soluble. En la tabla 6 se presentan los resultados de la actividad de la PGAII en la fracción prostasomal unida a membrana, la significación calculada por medio de una ANOVA, así como las medias y los erro-

res estándar en cada diagnóstico. Tal y como ocurría con la actividad de la PGAL, en este caso tampoco se producen variaciones significativas ($p < 0.1604$) de la actividad de la PGAL entre los distintos grupos. Los valores de actividad oscilan entre las 100 y 200 UP/ mg.

3.3. Prolil endopeptidasa (PE)

3.3.1. LÍQUIDO SEMINAL

Los resultados de la actividad de la PE en el líquido seminal se presentan en la tabla 7 donde así mismo se muestra el grado de significación estadística y las medias y los errores estándar en cada diagnóstico. Por otro lado, en la tabla 8 aparecen las diferencias significativas entre los distintos grupos y con los diferentes test estadísticos empleados.

Tal y como se aprecia en la tabla 7, existen variaciones significativas de la actividad de este enzima entre los distintos grupos (ANOVA, $p < 0.0199$). Los mayores niveles de actividad se producen en el diagnóstico oligo-asteno-necroteratozoospermia mientras que los menores se encuentran en los grupos asteno-teratozoospermia y normozoospermia. El test de Fisher indica la existencia de diferencias significativas entre los grupos que aparecen en la tabla 8.

3.3.2. FRACCIÓN PROSTASOMAL SOLUBLE

En la tabla 9 se presentan los resultados de la actividad de la PE en la fracción prostasomal soluble, el grado de significación, así como las medias y los errores estándar en cada diagnóstico. En esta fracción no parecen producirse diferencias significativas en la actividad de este enzima en los distintos diagnósticos seminales estudiados.

3.3.3. FRACCIÓN PROSTASOMAL UNIDA A MEMBRANA

En la tabla 10 se presentan los resultados de la actividad de la PE en el líquido seminal. Asimismo en esta tabla se muestra el índice de significación, así como las medias y los errores estándar en cada diagnóstico. No se producen variaciones significativas de la actividad de este enzima en esta fracción seminal.

4. DISCUSIÓN

El problema de la infertilidad humana es una causa de preocupación para un sector importante de la sociedad. Actualmente y debido a las continuas investigaciones en este campo, siguen apareciendo nuevos factores implicados en la fertilidad que aumentan la complejidad de este proceso.

Como ya se ha mencionado anteriormente, entre los factores más recientemente involucrados en este proceso destacan la hormona liberadora de tiotropina (TRH) y sus péptidos análogos. Se ha descrito la presencia de estos péptidos en próstata y semen de varias especies animales (14, 17) presentando altas concentraciones en semen humano (6, 17). De entre todos estos, el tripéptido piroglutámico-glutámico-prolinamida, denominado péptido promotor de la fecundación (FPP), parece ser que es el que se encuentra más directamente relacionado (15).

Uno de los principales mecanismos de control de la acción de los péptidos es mediante su degradación por peptidasas. En este sentido, cualquier alteración de la estructura de estos tripéptidos puede anular su función biológica. Así, puede ser que las alteraciones en las enzimas degradadoras de péptidos presentes en semen afecten a los niveles de alguna de las sustancias peptídicas implicadas en la fertilidad, lo que podría provocar alguna alteración de la misma.

El papel de los enzimas estudiados en el presente proyecto de investigación en la degradación peptídica es conocido relativamente bien. Sin embargo, no existen apenas trabajos que estudien la degradación peptídica a nivel de líquido seminal humano (24). Con respecto a esto, en el presente estudio hemos encontrado que todos los enzimas con potencialidad de degradar TRH se encuentran presentes en semen, algunas de ellas con valores similares a los encontrados en otros tejidos.

En el caso de la PGAI, los mayores niveles de actividad se presentan en la fracción prostasomal soluble (± 850 UP/ mg), seguida de la fracción prostasomal unida a membrana (± 350 UP/ mg) y del líquido seminal (± 120 UP/ mg). Los niveles de actividad encontrados en este enzima son del mismo orden, e incluso algo superiores en la fracción soluble prostasomal, que los encontrados en otros tejidos. Lo que nos sugiere que puedan tener alguna función importante en el semen.

La actividad de la PGAI, solo ha sido determinada en la fracción prostasomal unida a membrana, ya que no ha sido descrita a nivel soluble. Los niveles de actividad son del mismo rango (± 150 UP/ mg) que los que presenta la PGAI en la fracción del líquido seminal y similar a los encontrados en homogenados cerebrales. Por ello, este enzima también parece tener su importancia a este nivel.

Por otro lado, hemos observado que en el líquido seminal se producen variaciones significativas de la actividad de la PGAI en diversas patologías espermáticas. En este sentido cabe destacar que los individuos que presentan la patología de teratozoospermia tienen mayores niveles de actividad de este enzima que los normozoospermicos o los reconocidos como fértiles.

Asimismo, también en la fracción soluble prostasomal se producen diferencias significativas entre los distintos grupos en la actividad de este enzi-

ma. En este caso los mayores niveles se obtienen en el grupo normozoospermia y sobre todo en el fértil, siendo menores los niveles de actividad del enzima en las diferentes patologías descritas. Es decir, las modificaciones de la actividad de la PGAI en prostasomas y en líquido seminal son de distinto sentido. Siendo por lo general los niveles de actividad en prostasomas más alta en individuos fértiles o normozoospermicos. Sin embargo, en líquido seminal la actividad en muchas de las patologías es mayor que en individuos fértiles, por lo que la inclusión de la actividad PGAI en el prostasoma podría tener algún papel en la fertilidad. Este enzima podría actuar regulando los niveles de péptidos análogos de la TRH, que han sido descritos en semen humano, lo cual podría provocar alteraciones en la capacidad fertilizante del esperma.

Por último, en la fracción prostasomal unida a membrana no se producen variaciones significativas de la actividad de este enzima.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en estas fracciones seminales, se puede sugerir que la PGAI podría estar implicada en estos trastornos de la fertilidad en las fracciones de líquido seminal y fracción prostasomal soluble. Es decir, que solamente la forma soluble de este enzima parece implicada en estos procesos, no pareciendo en principio que la forma unida a membrana tome parte en ellos.

En lo que se refiere a la PGAIL, no se producen diferencias significativas de su actividad en los distintos diagnósticos. Al igual que ocurre con el enzima anterior, parece ser que a nivel de membrana estas peptidasas no están implicadas en la variabilidad de estos tipos de diagnósticos.

Finalmente, en lo que respecta a la prolil endopeptidasa (PE) se ha encontrado el mismo patrón, en cuanto a niveles de actividad enzimática se refiere, que en la PGAI. Así, los mayores resultados se obtienen en la fracción prostasomal soluble (± 550 UP/mg) seguida por la unida a membrana (± 300 UP/mg) y por último la fracción del líquido seminal (± 100 UP/mg). En el caso de este enzima los valores obtenidos son de un rango inferior a los descritos en otros tejidos.

A la hora de comparar la actividad enzimática de este enzima en los distintos diagnósticos seminales, únicamente se han encontrado variaciones significativas de la actividad en el líquido seminal. En esta fracción se observan, al igual que ocurría en el caso de la PGAI, los mayores niveles de actividad en el grupo oligo-asteno-necro-teratospermia, presentando asimismo variaciones significativas entre este grupo y los grupos normozoospermia y fértil respectivamente. Esto indica que en esta patología los niveles de los péptidos análogos de la TRH relacionados con la fertilidad podrían estar especialmente alterados. En las otras fracciones no se aprecian variaciones significativas. Estos datos vuelven a poner de manifiesto como parecen ser las formas solubles de estas peptidasas, es decir aquellas que no se encuentran ancladas a la membrana, las que pudieran estar involucradas en este tipo de trastornos seminales.

Por otro lado, uno de los objetivos del proyecto era el de determinar si estas enzimas se podrían utilizar como marcadores de los distintos diagnósticos seminales. Si bien es cierto que algunas de las actividades enzimáticas presentan variaciones significativas entre los distintos grupos, caso de la PGAI y de la PE, estas diferencias no son lo suficientemente grandes como para que puedan servir; por el momento, como marcadores fiables en el diagnóstico de las patologías relacionadas con la fertilidad. Sin embargo, dado que presentan variaciones en las distintas alteraciones espermiáticas aquí estudiadas, si que podrían tener alguna función en la regulación de la fertilidad masculina.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. ARATAN-SPIRE, S.; MOILANEN, K. AND CZERNICHOV, P. Postnatal developmental pattern of thyrotropin releasing hormone-degrading activity in rat plasma, hypothalamus and liver: role of tri-iodothyronine. *J. Endocrinol.* (1983), 97: 409-418.
2. BAUER, K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur. J. Biochem.* (1994), 224: 387-386.
3. BRADFORD, MA. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976), 72: 248-254.
4. BROWNE, P. and O'CUINN, G. An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur. J. Biochem.* (1983), 137: 75-87.
5. CARLINI, E.; PALMERINI, CA.; COSMI, EV. and ARIENI, G. Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Arch. Biochem. Biophys.* (1997), 343: 6-12.
6. COKLE, SM.; PRATER, GV.; THELFORD, CR.; HAMILTON, C.; MALONE, PR. and MUNDY, AR. Peptides related to thyrotrophin-releasing hormone (TRH) in human prostate and semen. *Biochim. Biophys. Acta.* (1994), 1227: 60-66.
7. COLLINS, JA. and CROSIGNANI, PG. Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. *Int. J. Gynaecol.* (1992), 39: 267-275.
8. FABIANI, R.; JOHANSSON, L.; LUNDKVIST, O. AND RONQUIST, G. Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* (1994), 57: 181-188.
9. FABIANI, R.; JOHANSSON, L.; LUNDKVIST, O. AND RONQUIST, G. Prolongation and improvement of prostatic promotive effect on sperm forward motility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* (1995), 58: 191-198.
10. FRASER, LR.; HANYALOGOU, A. AND COCKLE, SM. A fertilization promoting peptide (FPP)-related tripeptide competitively inhibits responses to FPP: a cause of male subfertility? *Mol. Reprod. Dev.* (1997), 48:529-535.
11. GALLAGHER, SP.; O'LEARY, RM. and O'CONNOR, B. The development of two fluorimetric assays for the determination of pyroglutamyl aminopeptidase type II activity. *Anal. Biochem.* (1997), 250: 1-9.

12. GANDARIAS, JM.; IRAZUSTA, J.; GIL, J.; FERNANDEZ, D. and CASIS, L. Brain soluble and membrane-bound Tyr-aminopeptidase activities during the stages of estrous and proestrous in the female rat. *Brain Res.* (1993), 620: 146-148.
13. GANDARIAS, JM.; IRAZUSTA, J.; FERNANDEZ, D.; ECHEVARRIA, E.; GIL, J. AND CASIS, L. Age-related changes in the soluble and the membrane-bound tyr-aminopeptidase activities in several areas of the male and the female rat. *Reprod. Fertil. Dev.* (1996), 8: 465-469.
14. GKONOS, PJ.; KWOK, CK.; BLOCK, NL. AND ROOS, BA. Identification of the human seminal TRHlike peptide pGlu-Phe-ProNH₂ in normal human prostate. *Peptides* (1993), 15: 1281-1283.
15. GREEN, CM.; COCKLE, SM.; WATSON, PF. AND FRASER, LR. Fertilization promoting peptide, a tripeptide similar to thyrotrophin-releasing hormone, stimulates the capacitation and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum. Reprod.* (1996), 11: 830-836.
16. KALWANI, S. AND PORTER, AG. Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase. *Biochem. J.* (1991), 276: 237-244.
17. LINDEN, H.; DEL RIO GARCIA, J.; HUBER, A.; KREIL, G. and SMYTH, D. The TRH-like peptides in rabbit testis are different from the TRHlike peptide in the prostate. *FEBS Lett.* (1996), 379: 11-14.
18. O'CONNOR, B. and O'CUINN, G. Purification and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pGlu-aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* (1985), 144: 271-278.
19. O'CUINN, G; O'CONNOR, B. and ELMORE, B. Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone by enzymes of brain tissue. *J. Neurochem.* (1990), 54: 1-13.
20. O'LEARY, RM. and O'CONNOR, B. Identification and localization of a synaptosomal membrane prolyl endopeptidase from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* (1995), 227: 277-283.
21. OMBELET, W.; MENKVELD, R.; KRUGER, TF. and STEENO, O. Sperm morphology assesment: historical review in relation to fertility. *Hum. Reprod. Updat.* (1995), 1: 543-557.
22. PRASSAD, C. Cyclo (His-Pro): its distribution, origin and function in the human. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (1988), 12: 19-22.
23. RONQUIST, G and BRODY, I. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim. Biophys. Acta.* (1985), 822: 203-218.
24. SIVIER, RJ. and COKLE, SM. Peptides related to thyrotrophin-releasing hormone are degraded in seminal plasma by an enzyme similar to prolyl endopeptidase. *J. Endocrinol.* (1995), 144: 61-66.
25. STEGMAYR, B. and RONQUIST, G. Scand. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol. Res.* (1982), 10: 253-257.

Tablas de resultados

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA I (LIQUIDO SEMINAL)			
PROBABILIDAD		P<0.0001	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	58.95	8.61
(AT)	Asteno-teratospermia	150.1	20.18
(AneT)	Asteno-necro-teratospermia	123.6	14.91
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	225.6	22.07
(NeT)	Necro-teratospermia	150.2	18.97
(N)	Normozoospermia	84.90	14.75
(F)	Fértil	137.8	10.46

Tabla 1: Niveles de actividad de la piroglutamyl aminopeptidasa I (PGAI) en los distintos diagnósticos seminales en el líquido seminal.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS			
A vs AT	FISHER PLSD		
A vs ANeT	FISHER PLSD		
A vs OANeT	FISHER PLSD		SCHEFFE F-TEST
A vs NeT	FISHER PLSD		
A vs F	FISHER PLSD		
AT vs OANeT	FISHER PLSD		
ANeT vs OANeT	FISHER PLSD		
OANeT vs NeT	FISHER PLSD		
OANeT vs N	FISHER PLSD		SCHEFFE F-TEST
OANeT vs F	FISHER PLSD		

Tabla 2: Diferencias significativas entre los distintos grupos seminales.

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA I (PROSTASOMAS SOLUBLE)			
PROBABILIDAD		P<0.0425	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	922.7	228
(AT)	Asteno-teratospermia	840.4	221
(ANeT)	Asteno-necro-teratospermia	1082	280
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	726.4	248
(NeT)	Necro-teratospermia	665.1	202
(N)	Normozoospermia	1156	498
(F)	Fértil	1812	252

Tabla 3: Niveles de actividad de la piroglutamyl aminopeptidasa I (PGAI) en los distintos diagnósticos seminales en la fracción prostasomal soluble.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS	
A vs F	FISHER PLSD
AT vs F	FISHER PLSD
ANeT vs F	FISHER PLSD
OANeT vs F	FISHER PLSD
NeT vs F	FISHER PLSD

Tabla 4: Diferencias significativas entre los distintos grupos seminales.

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA I (PROSTASOMAS MEMBRANA)			
PROBABILIDAD		P<0.4136	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	415.5	66.33
(AT)	Asteno-teratospermia	461.7	56.39
(ANeT)	Asteno-necro-teratospermia	316.3	38.24
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	310.2	46.41
(NeT)	Necro-teratospermia	269.5	36.46
(N)	Normozoospermia	397.2	53.24
(F)	Fértil	389.1	41.55

Tabla 5: Niveles de actividad de la piroglutamyl aminopeptidasa I (PGAI) en los distintos diagnósticos seminales en la fracción prostasomal unida a membrana.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).

PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA II (PROSTASOMAS MEMBRANA)			
PROBABILIDAD		P<0.1604	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	160.8	23.62
(AT)	Asteno-teratospermia	180.1	23.81
(AneT)	Asteno-necro-teratospermia	140.8	10.22
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	205.0	22.09
(NeT)	Necro-teratospermia	137.1	18.15
(N)	Normozoospermia	114.2	14.74
(F)	Fértil	164.5	10.97

Tabla 6: Niveles de actividad de la piroglutamil aminopeptidasa II (PGAII) en los distintos diagnósticos seminales en la fracción prostasomal unida a membrana.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).

PROLIL ENDOPEPTIDASA (LIQUIDO SEMINAL)			
PROBABILIDAD		P<0.0199	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	94.56	10.29
(AT)	Asteno-teratospermia	79.63	9.73
(AneT)	Asteno-necro-teratospermia	85.34	9.05
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	148.8	18.30
(NeT)	Necro-teratospermia	104.0	12.68
(N)	Normozoospermia	80.25	9.12
(F)	Fértil	110.2	7.17

Tabla 7: Niveles de actividad de la prolil endopeptidasa (PE) en los distintos diagnósticos seminales en el líquido seminal.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS	
A vs OANeT	FISHER PLSD
AT vs OANeT	FISHER PLSD
AT vs F	FISHER PLSD
ANeT vs OANeT	FISHER PLSD
OANeT vs N	FISHER PLSD
OANeT vs F	FISHER PLSD

Tabla 8: Diferencias significativas entre los distintos grupos seminales.

PROLIL ENDOPEPTIDASA (PROSTASOMAS SOLUBLE)			
PROBABILIDAD		P<0.4875	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	722.7	118.3
(AT)	Asteno-teratospermia	547.8	60.37
(AneT)	Asteno-necro-teratospermia	565.8	66.29
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	790.6	102.3
(NeT)	Necro-teratospermia	424.2	80.7
(N)	Normozoospermia	526.1	108.1
(F)	Fértil	549.1	76.10

Tabla 9: Niveles de actividad de la prolil endopeptidasa (PE) en los distintos diagnósticos seminales en la fracción prostasomal soluble.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).

PROLIL ENDOPEPTIDASA (PROSTASOMAS MEMBRANA)			
PROBABILIDAD		P<0.3007	
GRUPO		MEDIA	ERROR
(A)	Astenospermia	341.8	46.00
(AT)	Asteno-teratospermia	379.8	43.13
(AneT)	Asteno-necro-teratospermia	286.2	29.12
(OANeT)	Oligo-asteno-necro-teratospermia	292.4	38.51
(NeT)	Necro-teratospermia	256.1	35.79
(N)	Normozoospermia	288.9	34.43
(F)	Fértil	378.4	32.13

Tabla 10: Niveles de actividad de la prolil endopeptidasa (PE) en los distintos diagnósticos seminales en la fracción prostasomal unida a membrana.

Los resultados están expresados en unidades de peptidasa por miligramo de proteína (UP/ mg proteína).