CERAMIDA Y CERAMIDA 1-FOSFATO INDUCEN EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS: ASPECTOS BIOQUÍMICOS Y MORFOLÓGICOS.

Cintia C. Vaquer (1), Laila Suhaiman (1), Anahí B. Pacheco (1), Lucas Resa (1), Gerardo De Blas (1) Silvia A. Belmonte (1).

(1) Instituto de Histología y Embriología Mendoza "Dr. Mario Burgos", CCT Mendoza-CONICET. FCM, UNCuyo. Email: sbelmont@fcm.uncu.edu.ar

La cabeza del espermatozoide contiene una gran vesícula secretoria denominada acrosoma. La fusión de la membrana de esta vesícula con la membrana plasmática (MP) es una exocitosis regulada, calcio dependiente, denominada reacción acrosomal (RA). Esta es un requerimiento absoluto para la fertilización del ovocito por el espermatozoide. En el espermatozoide humano la exocitosis se puede detener reversiblemente en diferentes etapas antes de la fusión de la MP con la membrana acrosomal externa (MAE) del gránulo. Así se determinó por TEM, que primero se produce un hinchamiento del gránulo acrosomal ("swelling") y el ondulado de la MAE forzando el acercamiento de la misma con la MP. Luego, ambas membranas se fusionan en los puntos de contacto. Sobreviene entonces, la vesiculización y exposición del contenido acrosomal [1]. Las vesículas híbridas liberadas están formadas por MP y MAE. En nuestro laboratorio estudiamos la participación de los esfingolípidos en la exocitosis acrosomal (EA). Demostramos que esfingosina 1-fosfato (S1P) induce RA en espermatozoides humanos impactando sobre receptores de membrana acoplados a proteína G [2]. La ceramida es un precursor casi inmediato de S1P, por lo tanto decidimos estudiar cuál era su rol durante la exocitosis. Para determinar esto, agregamos concentraciones de ceramida crecientes a espermatozoides humanos capacitados. Observamos que ceramida C6 (C6) a una concentración de 10 μM inducía exocitosis en un porcentaje similar al diacilglicerol (DAG), inductor conocido de la EA (Fig. 1A). Lo mismo ocurría con el metabolito bioactivo de ceramida, ceramida 1-fosfato (C1P) (Fig.1A). Sin embargo, al agregar lípidos exógenos a las células puede ocurrir que se desestabilicen las membranas y ocurra ruptura de las mismas, produciendo el vaciamiento de la vesícula acrosomal por un mecanismo que no siga las vías de transducción de señales ya descriptas [2,3]. El objetivo de este trabajo es determinar si C6 y C1P activan las vías de señalización conocidas e inducen los cambios morfológicos normales de la EA. Para resolver este objetivo utilizamos ensayos de exocitosis, medición de calcio en célula única y microscopía electrónica convencional. En primer lugar, quelamos el calcio extracelular con BAPTA 5mM antes del tratamiento con los lípidos (Fig. 1A). Luego, medimos EA por tinción con lectina de Pisum sativum acoplada a FITC (PSA-FITC) contando las células que presentaban tinción del acrosoma o no por microscopía de fluorescencia (Fig. 1B). Nuestros resultados indican que la exocitosis inducida por C6 y C1P requiere calcio extracelular para proceder. Para confirmar que el tratamiento produce aumento de calcio intracelular, condición indispensable para que ocurra la exocitosis, cargamos los espermatozoides humanos con una sonda de calcio fluorescente permeable a membranas: Fluo3-AM. Luego medimos las variaciones de calcio en células vivas, en tiempo real y con alta resolución espacial y temporal. Ambos lípidos incrementaron la concentración de calcio intracelular (Fig.2, solo muestra ceramida C6). El mismo resultado se obtuvo también en población por espectrofluorometría. Para evaluar si C6 y C1P ejercen los cambios morfológicos arriba descriptos, incubamos espermatozoides durante 15' con el ionóforo de calcio A23187 (control positivo), con C6 o con C1P. Luego las células fueron procesadas para TEM convencional. Las fotos de la Fig. 3 muestran la ultraestructura de espermatozoides intactos, hinchados y reaccionados (A, B y C respectivamente). Cuantificamos la cantidad de células en diferentes estadíos. Observamos que el tratamiento con C6 o C1P incrementó la cantidad de células con "swelling" y reaccionadas a un nivel similar al inducido por el ionóforo de calcio. Concluimos que C6 y C1P son capaces de inducir EA, provocando un incremento del calcio intracelular y cambios morfológicos ultraestructurales compatibles con los estadíos descriptos para este proceso biológico en espermatozoides humanos.

REFERENCIAS

[1] N. Zanetti, L.S. Mayorga, Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction., Biol. Reprod. 81 (2009) 396–405. doi:10.1095/biolreprod.109.076166.

[2] L. Suhaiman, G.A. De Blas, L.M. Obeid, A. Darszon, L.S. Mayorga, S.A. Belmonte, Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase are involved in a novel signaling pathway leading to acrosomal exocytosis., J. Biol. Chem. 285 (2010) 16302–14. doi:10.1074/jbc.M109.072439.

[3] L.E. Pelletán, L. Suhaiman, C.C. Vaquer, M.A. Bustos, G.A. De Blas, N. Vitale, et al., ADP ribosylation factor 6 (ARF6) promotes acrosomal exocytosis by modulating lipid turnover and Rab3A activation, J. Biol. Chem. 290 (2015) 9823–9841. doi:10.1074/jbc.M114.629006.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Servicio de Microscopía del IHEM, Ings. N Domizio, E Bocanegra y J Ibañez y a SECTyP-UNCuyo, ANPCyT Y CONICETque proveyeron financiación.

FIGURAS

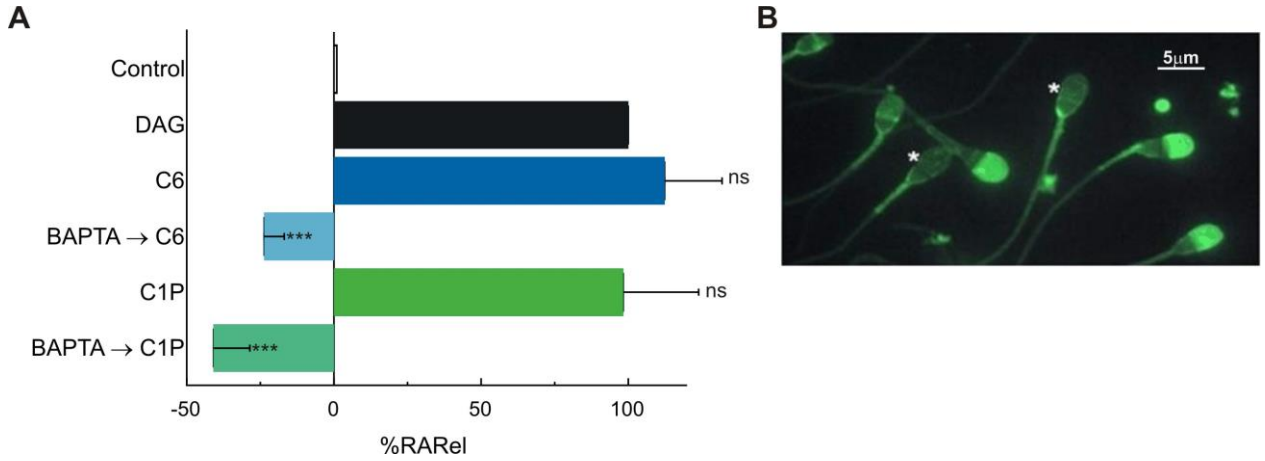

Figura 1: Ceramida y ceramida 1-fosfato necesitan calcio extracelular para promover la EA. A) Espermatozoides capacitados fueron estimulados durante 15' con DAG (10µM) como control positivo, con C6 (10µM) o C1P (10µM) en ausencia y presencia del quelante de calcio BAPTA (5mM) (preincubación durante 15'). A cada tratamiento se le descontó el porcentaje de EA espontánea y se lo relativizó en relación a DAG como el 100% de EA ns: p>0,05; ***: p≤0,001. **B)** Los ensayos funcionales son evaluados por microscopía de fluorescencia utilizando PSA-FITC; la misma se une a los residuos manosa presentes en el acrosoma del espermatozoide, diferenciando así los espermatozoides que conservan el acrosoma intacto de los que lo han exocitado (*).

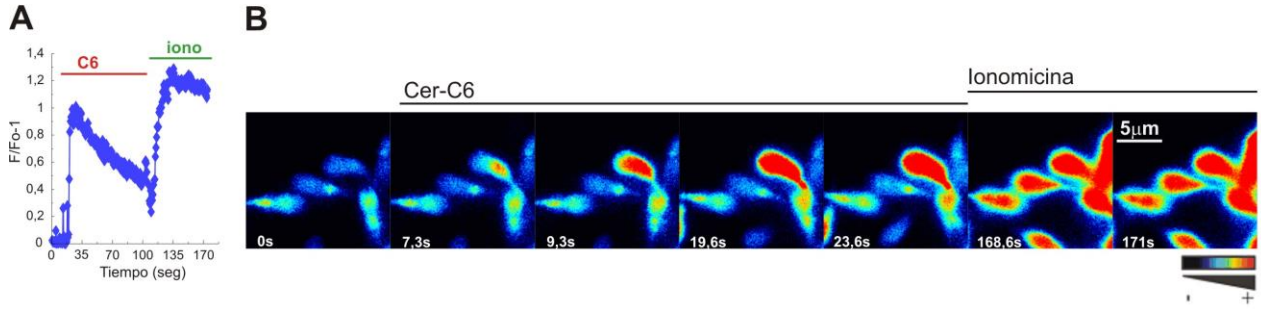

Figura 2: Ceramida y ceramida 1-fosfato promueven aumento en los niveles de calcio intracelular. Espermatozoides capacitados se cargaron con Fluo3-AM (2µM) durante 30' y luego se monitorearon los niveles de calcio intracelular antes y después del tratamiento. **A)** Curva representativa del aumento del calcio intracelular en célula única cuando se le agrega C6 (10µM) y luego ionomicina (20µM) como control positivo. **B)** Secuencia de imágenes de células donde se muestra el aumento en la concentración de cacio intracelular luego de la adición de C6 (7,3 seg) y luego de la adición de ionomicina (168,6 seg). Escala de pseudocolor $[Ca^{2+}]i$ (-: bajo Ca^{2+}; + : alto Ca^{2+}).

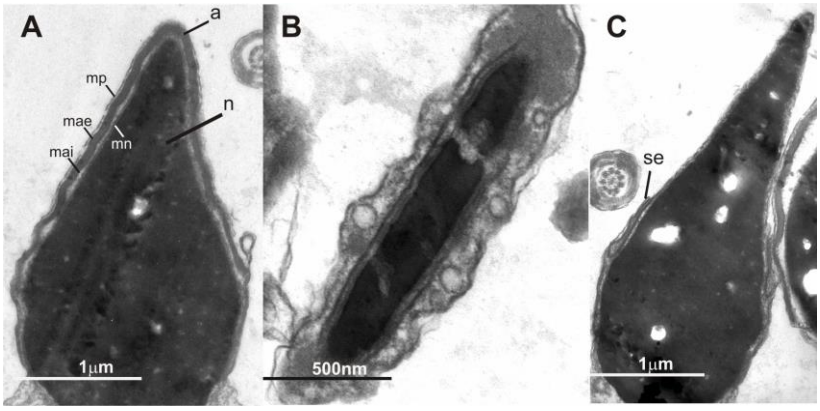

Figura 3: Cambios ultraestructurales inducidos por ceramida y ceramida 1-fosfato. Espermatozoides capacitados se trataron con ionóforo de calcio, A23187, (10µM), C6 (10µM) o C1P (10µM) durante 15'. Se fijaron las células con glutaraldehido (2,5%) y se procesaron para TEM. **A, B y C:** Fotos representativas de cada etapa que ocurre en el espermatozoide cuando es enfrentado a inductores de la EA. **A)** Espermatozoide intacto, el acrosoma (a) se visualiza electrondenso, se pueden distinguir la membrana plasmática (mp,) la membrana acrosomal externa (mae), la membrana acrosomal interna (mai) y la membrana nuclear (mn). **B)** *Swelling*. **C)** Espermatozoide reaccionado, queda la membrana acrosomal interna expuesta al medio extracelular y el segmento ecuatorial (se) intacto.