

PROGESTERONA INDUCE UNA ONDA DE Ca^{2+} INTRACELULAR A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE CATSPER EN ESPERMATOZOIDES DE HUMANO.

Rodolfo J. Arias (1), Claudia M. Sosa (1), Santiago Poblete (1), Luis S. Mayorga (1), Gerardo A. De Blas (1,2).

(1) IHEM-CONICET. Facultad de Ciencias Médica. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina
(2) Área de Farmacología. Facultad de Ciencias Médica. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina
rodojosearias@gmail.com

Durante la capacitación el espermatozoide adquiere una preparación para sufrir la reacción acrosomal (RA), un evento esencial para la fertilización en mamíferos. La progesterona producida por el cúmulus del ovocito se ha asociado con varios procesos de la fisiología del espermatozoide, incluyendo la RA. El acrosoma es una vesícula secretora localizada en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide que contiene enzimas líticas en su interior. Durante la RA -un evento exocítico, regulado y calcio dependiente- la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan en múltiples sitios lo que permite la liberación de las enzimas líticas presentes en el acrosoma. El espermatozoide expone así nuevos componentes de membrana requeridos para que se fusione con el ovocito. La RA está orquestada por una compleja cascada de señalización, cambios en la permeabilidad iónica e incremento del calcio citoplasmático provocado tanto por ingreso desde el espacio extracelular como por la salida de reservorios intracelulares [1]. Durante la RA se produce una activación de la maquinaria de fusión de membranas [2], hinchamiento del gránulo acrosomal y formación de vesículas híbridas para la posterior liberación de la matriz del acrosoma. Trabajos previos han demostrado que progesterona (Pg) activa de manera directa un canal de Ca^{2+} llamado CatSper, que se localiza exclusivamente en la membrana plasmática de la cola de espermatozoides. Pg abre este canal y dispara un incremento rápido de calcio intracelular. Este ión es crucial para la fisiología del espermatozoide tales como la capacitación, la hiperactivación y la RA [3]. El objetivo de este trabajo es estudiar la acción de Pg en medios con diferente concentración de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_e$) para identificar blancos de la hormona que provoquen un incremento de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) no relacionados a CatSper. Para cumplir con este objetivo realizamos ensayos dinámicos en células individuales -en tiempo real con alta resolución espacial y temporal- y en población utilizando un espectrofluorómetro. Los espermatozoides de humano capacitados se cargaron con diferentes sondas fluorescente de calcio -Fluo3-AM y Fura2-AM-. Para identificar en qué etapa de la fisiología del espermatozoide participaría este fenómeno, realizamos estudios de RA y evaluamos parámetros de movilidad. Una vez que los espermatozoides se cargaron con las sondas de Ca^{2+} se incubaron en medios con diferentes concentraciones de $[Ca^{2+}]_e$ y finalmente se trataron con Pg. Observamos que en ausencia de $[Ca^{2+}]_e$ Pg provoca un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ que comienza en la pieza media y cuello y se propaga hasta la región apical de la cabeza. Además observamos que este incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por la salida del ión desde los reservorios intracelulares no es suficiente para inducir la RA. Estos resultados nos indican que Pg puede activar la salida de Ca^{2+} de reservorios intracelulares por un mecanismo independiente de CatSper [3].

REFERENCIAS

- [1] Bedu-Addo K, Barratt CL, Kirkman-Brown JC, Publicover SJ (2007) Patterns of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol.* 302(1):324-32.
- [2] De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS (2005) Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol.* 3(10): e323.
- [3] Alasmari W, Costello S, Correia J, Oxenham SK, Morris J, Fernandes L, Ramalho-Santos J, Kirkman-Brown J, Michelangeli F, Publicover S, Barratt CL. (2013) Ca^{2+} signals generated by CatSper and Ca^{2+} stores regulate different behaviors in human sperm. *J Biol Chem.* 288(9):6248-58.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la sección de Microscopía del IHEM-CONICET, Mendoza, Argentina. Este trabajo está financiado por los siguientes subsidios: Universidad Nacional de Cuyo, Argentina [06/J388, L.S.M.]; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina [PIP 112-200801-02277, L.S.M., PIP 114-201101-00409, G.A.DB.];

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina [PICT-2011-2310, L.S.M.]

FIGURAS

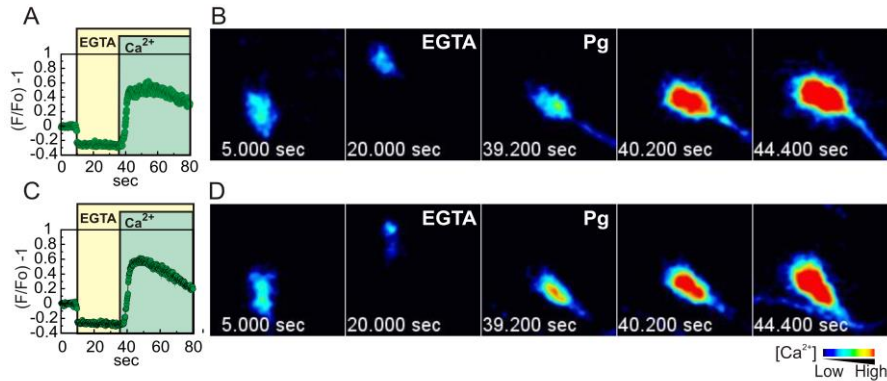


Figura 1. Pg induce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en un medio libre de Ca^{2+} en mediciones en célula única. Espermatozoides capacitados se cargaron con Fluo3-AM y se monitoreó la $[Ca^{2+}]_i$ en un medio de registro con Nominal de $[Ca^{2+}]_e$ al cual se le agregó 2mM EGTA para obtener la condición de calcio libre. Se observan cambios espacio-temporal del $[Ca^{2+}]_i$ en células individuales estimulados con 15 μ M de Pg (A,B,C,D). B,D. Secuencia de imágenes de 2 células individuales donde se muestra la resolución espacial del incremento del Ca^{2+} antes (5 sec), luego de la adición de 2mM EGTA (20sec) y después de la adición de 15 μ M Pg. Escala de pseudocolor $[Ca^{2+}]_i$ (low: bajo Ca^{2+} ; high: alto Ca^{2+}).

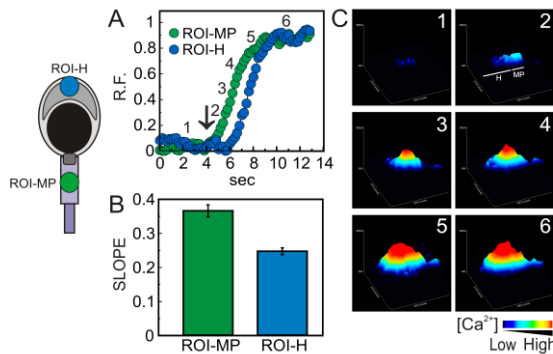


Figura 2. Progesterona induce un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ que comienza en la pieza media y se propaga a la cabeza. A. Regiones seleccionadas en la pieza media (ROI-MP) y cabeza (ROI-H) del espermatozoide. B. Gráfico representativo de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. C. Secuencia de imágenes en tres dimensiones con pseudocolor que muestran la propagación del Ca^{2+} . D. Gráfico de las pendientes del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de las dos regiones seleccionadas.

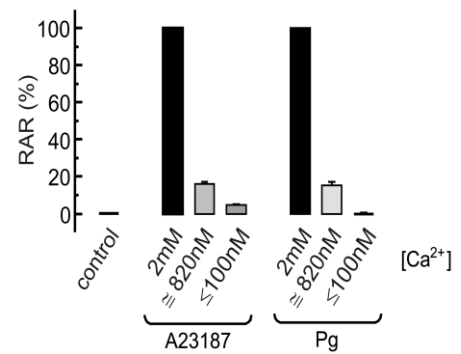


Figura 3. Pg no dispara la RA en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Espermatozoides capacitados se incubaron con diferentes $[Ca^{2+}]_e$ (2mM; \approx 820nM y \leq 100nM) en ausencia (control) o presencia de 10 μ M de ionóforo de Ca^{2+} A23187 y 15 μ M de Pg. Los datos representan las medias \pm E.S. de al menos 3 experimentos independientes.

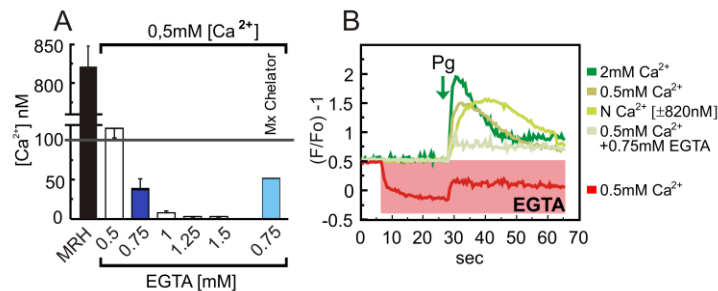


Figura 4. Cuantificación de $[Ca^{2+}]_i$. A. Titulación de Ca^{2+} en el Medio de Registro Humano (MRH) con Fura2. Barra negra: indica la $[Ca^{2+}]_i$ en el MRH-N (N: nominal), barra azul: indica la $[Ca^{2+}]_i$ en el MRH \leq 100nM, barra celeste: indica la $[Ca^{2+}]_i$ calculada con el software Max Chelator (<http://maxchelator.stanford.edu/>). La línea negra indica la $[Ca^{2+}]_i$ fisiológica presente en el citoplasma del espermatozoide. B. **Cinética del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ activada por Pg en mediciones realizadas en población con diferentes concentraciones de $[Ca^{2+}]_e$.** Espermatozoides capacitados se cargaron con Fluo3-AM y se monitoreó la $[Ca^{2+}]_i$ en un espectrofluorómetro en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} extracelular.