

SIMPOSIO: BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION**REGULACIÓN DE LA UNIÓN ESPERMATOZOIDE-ZONA PELÚCIDA POR LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH)****PATRICIO MORALES***Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.*

La fecundación en mamíferos es un proceso complejo, que involucra la interacción secuencial del espermatozoide con el cúmulo oóforo, la zona pelúcida (ZP) y la membrana plasmática del ovocito. Después de atravesar el cúmulo oóforo, el espermatozoide fecundante se une a la ZP. La unión del espermatozoide fecundante con la ZP es indispensable para que éste experimente la reacción acrosomal (RA) y pueda atravesar la ZP y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

A pesar de la importancia del proceso de reconocimiento y unión espermatozoide-ZP, sólo existe información muy limitada respecto del o los mecanismos involucrados en él. En el presente trabajo se presenta evidencia que sugiere que la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) regula la unión espermatozoide-ZP en mamíferos.

El tratamiento de los espermatozoides con GnRH y agonistas aumenta significativamente su capacidad de unión a la ZP. La curva dosis-respuesta de GnRH toeme forma de "U" invertida, con actividad máxima a 50 nM. Este efecto es específico sobre el espermatozoide y es inhibido por un antagonista específico de GnRH (Ac-3,4-dehidro-Pro1,-p-fluoro-D-Phe2,D-Trp3,6-LHRH)

(4pF). Uniones peptídicas de GnRH no tienen efecto. El efecto de GnRH no se debe a cambios en: a) el porcentaje de RA; b) el patrón de movimiento espermático; o c) la frecuencia de colisiones espermatozoide-ZP. El efecto estimulador de GnRH sobre la unión espermatozoide-ZP depende de la presencia de calcio en el medio extracelular. Además, GnRH estimula entrada de calcio al espermatozoide.

Resultados adicionales indican que el antagonista 4pF tiene un efecto inversamente proporcional a la dosis sobre la unión espermatozoide-ZP. A bajas dosis no afecta la unión pero a altas dosis es inhibitorio. Este efecto tampoco se debe a cambios en la RA, patrón de movimiento o frecuencia de colisiones espermatozoide-ZP. Finalmente, resultados en la rata indican que la fecundación es bloqueada *in vivo* por la inyección local en el oviducto de un antagonista de GnRH.

Los resultados sugieren que GnRH podría tener un efecto regulador sobre la unión espermatozoide-ZP en mamíferos. Este efecto podría deberse a cambios en la afinidad del receptor espermático para la ZP. (Financiado por DIPUC 362-09).

TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DURANTE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL INICIADA POR PROGESTERONA Y ZONA PELÚCIDA

EDUARDO ROLDAN

Dpto. de Reproducción Animal, Centro de Investigación y Tecnología, INIA Ctra. de La Coruña km 5.9, 28040-Madrid, España.

La exocitosis en espermatozoides (la reacción acrosómica) es un proceso esencial durante la fecundación, ya que libera o expone las enzimas necesarias para penetrar las cubiertas del ovocito. La exocitosis se inicia en respuesta a la progesterona o la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida (ZP), las cuales se encuentran presentes en las cubiertas que atraviesa el espermatozoide. Se ha reconocido también que agonistas tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) podría ser un co-factor importante en la iniciación de la exocitosis. El papel de la progesterona parece estar relacionado con una "sensibilización" previa de los espermatozoides que van a ser estimulados por la ZP, pues la exposición secuencial de espermatozoides capacitados a estos agonistas induce máxima activación de mecanismos de señalización intracelular y exocitosis. La progesterona actúa sobre, al menos, dos receptores de superficie. Uno de ellos es un receptor tipo GABAA que puede activarse por GABA y muscimol e inhibirse con bicuculina, mientras que el otro receptor parece estar ligado a un canal de Ca²⁺. La acción de la progesterona está mediada por una tirosina-kinasa y no pare-

ce haber participación de proteínas Gi en las vías de transducción activadas por este esteroide. Por otra parte, la acción de la ZP está mediada por receptores acoplados a tirosina-quinasas y proteínas Gi.

La acción de la progesterona o ZP conduce a una generación considerable de diacilglicerol (DAG). Una parte de este DAG deriva de la hidrólisis de polifosfoinosítidos aunque el mecanismo principal de generación de este metabolito es la activación de una fosfolipasa C que hidroliza preferentemente a la fosfatidilcolina. En espermatozoides de mamíferos la fosfolipasa D no parece estar involucrada en la generación de DAG.

El DAG cumple funciones importantes como segundo mensajero. Una de estas funciones parece estar relacionada con la activación de fosfolipasa A2. Esta enzima hidroliza fosfatidilcolina, -serina y -etanolamina, liberando ácidos grasos (tales como ácido araquidónico) y lisofosfolípidos. Estos metabolitos son importantes para las etapas finales de la exocitosis (fusión de membranas), donde interactúan con el sistema de cAMP/proteína kinasa A y proteínas G de bajo peso molecular tales como rab3.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DURANTE LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS

PABLO VISCONTI

Division of Reproductive Biology. Dept. of Obstetrics and Gynecology. University of Pennsylvania, PA 19104, USA.

La capacitación en espermatozoides de mamíferos se define funcionalmente como el proceso o procesos bioquímicos que le confieren al esper-

matozoide la capacidad de fertilizar al ovocito maduro ya sea *in vivo*, en el tracto genital femenino o *in vitro*. Hasta el momento no se conoce el me-

canismo molecular por el que ocurre el proceso de capacitación. La capacitación se correlaciona con cambios en las concentraciones iónicas intracelulares, con un aumento en la fluidez de la membrana, aumento en el metabolismo y en la motilidad. No está claro cuál de estos procesos es necesario para que ocurra la capacitación. El proceso de capacitación puede llevarse a cabo en un medio definido, que debe contener concentraciones apropiadas de electrolitos, sustratos metabólicos y una fuente proteica que en general es albúmina bovina. Existen muchos trabajos que describen la importancia del calcio, del bicarbonato, y de la albúmina en la regulación del proceso de capacitación. Se cree que la albúmina bovina es responsable de la remoción de colesterol de la membrana plasmática, lo que le confiere al espermatozoide una mayor fluidez de membrana. Este cambio en la concentración de colesterol, permitiría una mayor fluidez iónica. El aumento en la concentración intracelular de cal-

cio y de bicarbonato estimularía la actividad de adenilato ciclasa, con un subsecuente aumento en los niveles de AMPc, que a su vez se correlacionan con el proceso de capacitación. Siguiendo este modelo, nuestro laboratorio demostró una correlación entre el proceso de capacitación y la fosforilación en tirosina de varias proteínas. Para la fosforilación en tirosina de estas proteínas es necesaria la presencia de calcio, bicarbonato y albúmina en el medio de capacitación. En ausencia de estos compuestos no hay inducción de la fosforilación en tirosina. Esta falta de fosforilación en tirosina puede ser compensada si se agrega al medio de capacitación análogos permeables de AMPc. La fosforilación en tirosina y la capacitación se inhiben en presencia de inhibidores específicos de proteína quinasa A (PKA). La regulación de la fosforilación en tirosina por PKA en espermatozoide es la primera demostración de intercomunicación entre estos dos tipos de señales de transducción.

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE FUSIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO

PATRICIA CUASNICU

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Buenos Aires.

La fusión de membranas entre un espermatozoide y un ovocito es un evento crucial dentro del proceso de fertilización. Sin embargo, es muy escasa la información disponible sobre los mecanismos moleculares involucrados en esta etapa. Nuestro laboratorio desde hace varios años está dedicado al estudio de fusión de gametas y a la participación de una proteína epididimaria (proteína "DE") en el mismo. DE (PM 37 kDa) se asocia a la región dorsal de la cabeza del espermatozoide a medida que los mismos transitan por el epidídimo y migra al segmento ecuatorial (region fusogénica) luego de la reacción acrosomal. Tanto la presencia del anticuerpo policlonal anti-DE, como el de proteína DE, durante la co-incubación de gametas, inhibe significativamente la fusión espermatozoide-ovocito, confirmando no solo la participación de DE en el proceso de fusión, sino la existencia de sitios complementarios

para esta proteína en la superficie del ovocito. Dichos sitios se localizan en toda la superficie del ovocito, excepto en la región por la cual raramente ocurre la fusión. Estos resultados constituyeron la primera evidencia de la existencia de sitios específicos para una proteína del espermatozoide en la superficie del ovocito de mamíferos. Recientemente hemos encontrado que DE participa en el proceso de fusión de gametas en el ratón a través del mismo mecanismo descrito anteriormente en la rata. Si bien hasta el momento el único mecanismo de fusión de gametas propuesto ha sido el de la unión de una desintegrina del espermatozoide a integrinas del ovocito, el reciente análisis de la secuencia de la proteína DE ha demostrado que la misma no presenta dominios de desintegrinas, indicando así la existencia de un mecanismo molecular nuevo y/o alternativo en el proceso de fusión de gametas.