

SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DURANTE LA EXOCITOSIS DEL ACROSOMA Y RELEVANCIA PARA LA EVALUACIÓN DE CAPACIDAD FECUNDANTE

Eduardo R. S. Roldan

Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC).
José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid. Correo electrónico: roldane@mncn.csic.es.

Resumen

La exocitosis del acrosoma del espermatozoide es un proceso esencial para la fecundación. Se han caracterizado varios eventos de señalización molecular que son importantes durante este proceso, teniendo especial relevancia aquellos que involucran a lípidos de membrana. La acción de los agonistas fisiológicos (progesterona y zona pelúcida) causan una activación de fosfolipasas (PLC y PLA₂) y la subsiguiente generación de lípidos mensajeros, substratos y metabolitos activos, los cuales participan en los procesos de fusión de la membrana plasmática y la membrana externa del acrosoma.

Palabras clave Espermatozoide, acrosoma, transducción de señal, progesterona, zona pelúcida.

Durante la interacción con el óvulo, los espermatozoides experimentan la exocitosis del acrosoma (la *reacción acrosómica*), un proceso que es esencial para la fecundación. Existen dos agonistas principales de la exocitosis que se encuentran en las cubiertas del óvulo: la progesterona, que está atrapada en la matriz del *cumulus oophorus* o que puede ser producida por las células del *cumulus*, y la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida. Ambos agonistas actúan en conjunto para iniciar y completar la exocitosis; se considera que la progesterona sensibiliza y estimula al espermatozoide para una estimulación subsiguiente de la zona (Roldan *et al.*, 1994a).

Se ha reconocido desde hace varios años que el influjo de calcio extracelular al interior del espermatozoide es un evento temprano y obligatorio durante la reacción acrosómica. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la señalización durante la exocitosis del acrosoma son todavía poco conocidos. Esto se debe en gran medida al hecho de que existe aún limitada información sobre los receptores espermáticos que interactúan con la progesterona o con la zona. Sin embargo, se han producido avances considerables en relación a la señalización intracelular mediada por lípidos y que conduce a la fusión de la membrana plasmática con la membrana externa del acrosoma (Roldan, 1998).

La estimulación de los espermatozoides con pro-

gesterona, zona pelúcida u otras sondas moleculares (por ejemplo, ionóforos de Ca²⁺ tales como A23187 o ionomicina), conduce a la exocitosis del acrosoma, ocasiona activación de fosfolipasas y la subsiguiente producción de mensajeros lipídicos. Una de las primeras respuestas reconocidas después de esta estimulación es la activación de una fosfolipasa C específica de fosfoinosítidos (PIP₂ y PIP), seguida de una activación de una fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) y la liberación de varias especies moleculares de diglicéridos (diacil- y alquilacilgliceroles) (Roldan y Murase, 1994; Murase y Roldan, 1996; Vazquez y Roldan, 1997a,b).

Los estudios realizados con un sistema modelo (espermatozoides de morueco) estimulados con la sonda molecular A23187, en presencia de Ca²⁺, han puesto en evidencia que la activación de una fosfolipasa A₂ (PLA₂) es también un evento importante que subyace a la exocitosis del acrosoma (Roldan y Fragio, 1993; Roldan *et al.*, 1994b). La activación de PLA₂ requiere la internalización de Ca²⁺ y conduce a la hidrólisis de varios fosfolípidos (siendo PC el más importante) y liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos que tienen papeles fundamentales en la fusión de membranas.

Con el fin de comprender cómo se produce la activación de PLA₂ en respuesta a agonistas fisiológicos, se ha empleado un modelo de espermatozoides de cobaya capacitados *in vitro*, marcados con precursores radiac-

tivos y estimulados con progesterona o zona pelúcida (Yuan *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005). Se ha encontrado que ambos agonistas estimulan la liberación de ácido araquidónico y lisoPC y un descenso en los niveles de PC, cambios que son indicativos de activación de PLA₂. La inclusión de ácido aristolóquico (un inhibidor de PLA₂) conduce a una inhibición de estos cambios lipídicos, así como a una inhibición de la exocitosis del acrosoma, lo que sugiere que los cambios lipídicos son importantes para la exocitosis.

La acción de la progesterona parece estar mediada por un receptor similar a los receptores GABA_A de neuronas. La inclusión de bicuculina (un antagonista de los receptores GABA_A) bloquea la liberación de ácido araquidónico y la exocitosis (Shi y Roldan, 1995). Además, el tratamiento con GABA mimetiza el efecto de la progesterona estimulando la liberación de ácido araquidónico (indicativo de actividad PLA₂) y la exocitosis.

La acción de la zona pelúcida no involucra la activación de receptores de tipo GABA sino que parece estar mediada por proteínas G_i, ya que la inclusión de toxina *pertusis* bloquea la liberación de ácido araquidónico y la exocitosis. No está claro si la acción sobre PLA₂ es directa o si está involucrado algún mensajero como el diacilglicerol, ya que trabajos previos demostraron que este lípido estimula la actividad de la PLA₂ (Roldan y Fragio, 1994; Roldan *et al.*, 1994b). Este efecto del diacilglicerol podría ser directo sobre la PLA₂ o mediado por proteína quinasa C (O'Toole *et al.*, 1996a; 1996b). Es posible que exista una participación de la PKC, ya que la estimulación de la PLA₂ inducida por tratamiento con progesterona o zona pelúcida se encuentra inhibida por estaurosporina, un inhibidor de la PKC (Shi *et al.*, 2005).

La activación de la PLA₂ puede estar regulada también por otros sistemas de señalización intracelular tales como la vía que involucra AMP cíclico y proteína quinasa A (Garde y Roldan, 2000). Se ha encontrado evidencia a favor de esta hipótesis, ya que la inclusión de H-89, un inhibidor de PKA, conduce a una ausencia de liberación de ácido araquidónico y de exocitosis cuando los espermatozoides son estimulados con progesterona o zona pelúcida (Shi *et al.*, 2005). Otra vía que también puede modular la actividad de PLA₂ incluye la MAP quinasa. Se obtenido evidencia preliminar que indica que dicha vía es importante en la regulación de la PLA₂ ya que la actividad de la enzima (y la exocitosis) se encuentra inhibida cuando se tratan los espermatozoides con inhibidores de la vía de la MAP quinasa.

Los estudios moleculares de la exocitosis del acrosoma pueden servir de base para el diseño de pruebas de evaluación de capacidad fecundante de los esperma-

tozoides. Estudios recientes han mostrado la concordancia fenotípica de varios parámetros del eyaculado y la relación de algunos de ellos con la fertilidad (Malo *et al.*, 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- GARDE, J.; ROLDAN, E. R. S. (2000). «Stimulation of Ca²⁺-dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A₂». *Reprod. Fertil.*, 118:57-68.
- MALO, A. F.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J.; GARCIA, A. J.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. S. (2005). «Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 72:822-829.
- MURASE, T.; ROLDAN, E. R. S. (1996). «Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis». *Biochem. J.*, 320:1017-1023.
- O'TOOLE, C. M.; ROLDAN, E. R. S.; FRASER, L. R. (1996a). «Protein kinase C activation during progesterone-stimulated acrosomal exocytosis in human spermatozoa». *Mol. Hum. Reprod.*, 2:921-927.
- O'TOOLE, C. M.; ROLDAN, E. R. S.; HAMPTON, P.; FRASER, L. R. (1996b). «A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis». *Mol. Hum. Reprod.*, 2:317-326.
- ROLDAN, E. R. S. (1998). «Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis». *Front. Biosci.*, 3:D1109-1119.
- ROLDAN, E. R. S.; FRAGIO, C. (1993). «Phospholipase A₂ activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa». *J. Biol. Chem.*, 268:13 962-13 970.
- (1994). «Diacylglycerols stimulate phospholipase A₂ and subsequent exocytosis in ram spermatozoa. Evidence that the effect is not mediated via protein kinase C». *Biochem. J.*, 297:225-232.
- ROLDAN, E. R. S.; MARTINEZ-DALMAU, R.; MOLLINEDO, F. (1994a). «Diacylglycerol and alkylacylglycerol stimulate ram sperm phospholipase A₂». *Int. J. Biochem.*, 26:951-958.
- ROLDAN, E. R. S.; MURASE, T. (1994). «Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. Effect is not mediated by protein kinase C». *J. Biol. Chem.*, 269:23 583-23 589.
- ROLDAN, E. R. S.; MURASE, T.; SHI, Q. X. (1994b). «Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida». *Science*, 266:1578-1581.
- SHI, Q. X.; CHEN, W. Y.; YUAN, Y. Y.; MAO, L. Z.; YU, S. Q.; ROLDAN, E. R. S. (2005). «Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A₂ during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa». *J. Cell. Physiol.* [En prensa]
- SHI, Q. X.; ROLDAN, E. R. S. (1995). «Evidence that

- a GABA_A-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 52:373-381.
- VAZQUEZ, J. M.; ROLDAN, E. R. S. (1997a). «Diacylglycerol species as messengers and substrates for phosphatidylcholine re-synthesis during Ca²⁺-dependent exocytosis in boar spermatozoa». *Mol. Reprod. Dev.*, 48:95-105.
- (1997b). «Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine». *Mol. Reprod. Dev.*, 47:105-112.
- YUAN, Y. Y.; CHEN, W. Y.; SHI, Q. X.; MAO, L. Z.; YU, S. Q.; FANG, X.; ROLDAN, E. R. S. (2003). «Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa». *Biol. Reprod.*, 68:904-913.