

**SIMPOSIO 4.
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

MEDICINA (Buenos Aires) 2004; 64 (Supl. II): 33-35

**ROL FUNCIONAL DE LA PROTEINA REGULADORA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS AGUDA (StAR)
EN EL CUERPO LÚTEO HUMANO**

LUIGI DEVOTO^{1,2}, PAULINA KOHEN², INGRID ESPINOZA² Y JEROME F. STRAUSS III³

Departamento de Obstetricia y Ginecología¹-Instituto de Investigaciones Materno Infantiles (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Center for Research on Reproduction and Women's Health² and Department of Obstetrics and Gynecology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

La síntesis de progesterona por el cuerpo lúteo humano (CL) controla la ciclicidad menstrual, el establecimiento y mantención del embarazo inicial. La producción esteroidea lútea depende primariamente de LH, via cAMP/proteína quinasa A (PKA). StAR es una fosfoproteína dependiente de cAMP, que regula la translocación intra-mitocondrial del colesterol, siendo el paso limitante en la biosíntesis esteroidea. En el ovario humano, el gen y la proteína de la StAR se expresan en las células tecales desde etapas tempranas del desarrollo folicular, sin embargo, las células de la granulosa comienzan a expresar los transcritos de StAR y proteína posterior al pico de LH y durante la fase lútea inicial e intermedia experimentando un declinar progresivo en la fase lútea tardía y en el CL de regresión. Simultáneamente, hemos evaluado la expresión temporal de otras proteínas involucradas en la biosíntesis de P4 (Adrenoxin, P450scc y 3 β -HSD) en el CL durante la fase lútea. Sin embargo, entre todas estas proteínas, la StAR es la única que declina en forma significativa en fase lútea tardía, sugiriendo un rol crítico de StAR en la reducción de la síntesis de P4. La administración de hCG durante la fase lútea incrementa la expresión del mRNA de StAR y su proteína además de la síntesis de P4 de CL durante la fase lútea media y tardía. Esta estimulación señala que StAR es un componente importante en el rescate de la función lútea en

el ciclo concepcional. La administración de GnRH antagonista (2 mg s/c) en fase lútea produce a las 2 h una disminución significativa de LH seguida de una reducción a las 6 h de P4. Este descenso agudo en la esteroidogénesis no se asocia a una reducción del mRNA de la StAR y su proteína en las primeras h posterior a la administración de GnRH. Una reducción significativa en el mRNA (50%) y de su proteína 30 kDa (30%) se observa a las 24-48 hrs. El análisis de homogeneizados de CL intermedio por electroforesis 2D revela la expresión de 4 isoformas de StAR. Las formas más acídicas representan la especies fosforiladas y posiblemente las más activas, las cuales disminuyen al ser tratadas in vivo con GnRH Antagonista. En resumen, se sugiere que la disminución de la esteroidogénesis durante la fase lútea tardía es una resultante de la disminución de la expresión de StAR. A su vez la aguda reducción en la esteroidogénesis posterior a la administración de GnRH probablemente se asocia a una disminución en la fosforilación de la StAR. Estas observaciones demuestran que tanto la transcripción de la StAR como modificaciones post traslación controlan la actividad de la StAR en el CL y determina el potencial del CL para producir P4

Financiado por Conycit, FONDAPE Chile 15010006 y NIH grants TW-001485 y HD-06274

MECANISMO DE FUSIÓN DE MEMBRANAS DURANTE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL

CLAUDIA TOMES

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET.
Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Cuyo.*

La fertilización es el proceso por el cual las gametas femenina (ovocito) y masculina (espermatozoide) se unen para generar un nuevo individuo. La cabeza del espermatozoide contiene una gran vesícula secretoria deno-

minada acrosoma. La fusión regulada de la membrana de esta vesícula con la membrana plasmática tiene lugar durante la reacción acrosómica (RA), requerimiento absoluto para la penetración de la zona pelúcida por el

espermatozoide y por ende, la fertilización. La exocitosis es un complejo proceso de fusión de membranas altamente regulado consistente en múltiples etapas que se inicia con la movilización de la vesícula a exocitar hacia la periferia celular. Allí, se produce una asociación laxa entre las membranas de la vesícula y la plasmática, seguida por la activación de la maquinaria de fusión y el posterior anclaje de la vesícula a la membrana plasmática en el punto donde sucederá la fusión. Una señal de calcio culmina el ciclo, conduciendo a la apertura del poro. En todas las células exocíticas, la fusión de membranas es gobernada por GTPasas de la familia rab, las chaperonas «-SNAP y NSF, las proteínas de fusión SNARE y el sensor de calcio sinaptotagmina. Por medio de un modelo de permeabilización con estreptolisina O (SLO) desarrollado en nuestro laboratorio hemos demostrado que, como sucede en células somáticas, el calcio es un mediador esencial de la de exocitosis acrosomal en espermatozoides humanos. Asimismo, hemos encontrado un rol para las proteínas de fusión Rab3A «-SNAP, NSF y la superfamilia SNARE y las proteínas que unen calcio sinaptotagmina VI y calmodulina en la RA. También hemos demostrado que el acrosoma se comporta como una organela de almacenamiento de calcio, donde Rab3 promueve el eflujo de este ion a través de canales sensibles al IP_3 . Un aspecto actualmente en estudio es el de la interrelación entre las cascadas mencionadas y las vías reguladas por el segundo mensajero adenosín-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). En

espermatozoides no permeabilizados el AMPC induce la RA activando la PKA, quien a su vez abre canales de calcio en la membrana plasmática. A pesar de que este comportamiento no se observaría en espermatozoides tatados con SLO, reactivos que aumentan el AMPC disparan la RA en estas células, la cual es resistente a inhibidores de PKA. Por lo tanto, proponemos una vía alternativa, PKA-independiente, de transducción de señales mediadas por el AMPC en la RA. La misma sería dependiente de Epac, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para las proteínas Rap que une y se activa por AMPC. Primero, presentamos evidencias de la presencia de Epac en espermatozoides humanos por Western blot e inmunofluorescencia. Segundo, la estimulación con el análogo selectivo para Epac 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP induce exocitosis *per se*. Esta exocitosis mantiene el requerimiento de toda la maquinaria de fusión (Rab3, «-SNAP/NSF, SNAREs) activa. Tercero, anticuerpos anti-Epac bloquean la RA disparada por todos los inductores testeados. Cuarto, la introducción en espermatozoides de reactivos que bloquean Rap previene la RA. En resumen, nuestros resultados sugieren que la activación de la vía Epac/Rap es necesaria y suficiente para desencadenar todos los fenómenos inherentes a la fusión de membranas durante la exocitosis acrosomal. El estudio de los mecanismos involucrados abre la excitante perspectiva de desentrañar el interjuego entre las cascadas mediadas por segundos mensajeros con las que gobiernan la fusión.

RNA DE INTERFERENCIA EN OVOCITOS Y EMBRIONES DE RATÓN: MUCHO MÁS QUE UNA HERRAMIENTA ÚTIL

PAULA STEIN

Departamento de Biología, Universidad de Pensilvania, Filadelfia, Pensilvania, USA

El fenómeno de RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo post-transcripcional de silenciamiento de genes altamente conservado en los reinos vegetal y animal. El proceso es iniciado por moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) y conduce a la degradación de RNA mensajeros cuya secuencia sea homóloga a la del dsRNA. Este mecanismo se encuentra presente en ovocitos y embriones preimplantatorios de ratón, donde la degradación del RNA mensajero ocurre en forma dosis y tiempo-dependiente. En el laboratorio hemos desarrollado un sistema de RNAi transgénico en el cual la producción de dsRNA se encuentra bajo el control de un promotor específico de ovocito. Usando este sistema hemos reproducido el fenotipo de los ratones deficientes en el gen Mos, es decir una falla en el arresto de la

segunda división meiótica en metafase II y la consiguiente activación partenogenética. Asimismo, otros cuatro genes han sido silenciados de esta manera en el laboratorio, lo cual nos ha permitido estudiar su función durante el desarrollo del ovocito, la maduración meiótica, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Utilizando microarreglos y RT-PCR cuantitativa hemos estudiado la especificidad del efecto en ovocitos, usando para ello los ratones transgénicos deficientes en Mos. No observamos ninguna evidencia de inespecificidad ni de una respuesta antiviral mediada por interferón, que se han reportado en algunos sistemas. Por otro lado, realizamos estudios para determinar cuál podría ser la función biológica del RNAi en el ovocito y embrión temprano. En eucariotas inferiores, el papel principal del RNAi es el de

proveer un sistema immune primitivo. El RNA de interferencia se ocupa de silenciar virus o transposones, protegiendo de esta manera la integridad genómica del individuo. En mamíferos, sin embargo, se desconoce cuál es la función del RNAi. Los elementos móviles o transposones se producen en forma masiva cuando se activa el genoma embrionario, que en el ratón ocurre en el estadio de dos células. Para dilucidar si RNAi está involucrado en restringir la expresión de estos transposones, inhibimos el mecanismo de RNAi y estudiamos los niveles de expresión

de dos retrotransposones (MuERV y IAP) en embriones de ocho células. La microinyección de embriones de una célula con dsRNA contra Dicer, que es la enzima que inicia el mecanismo, produjo una inhibición parcial (~50%) del RNAi en embriones de 8 células. Al mismo tiempo, observamos un aumento de un 50% en los niveles de RNA mensajero para IAP y MuERV. Estos resultados nos permiten concluir que una de las funciones del RNAi en embriones tempranos de ratón sería la de proteger la integridad genómica de la invasión de secuencias repetitivas.

REGULATION OF CAPACITATION BY PHOSPHORYLATION AND CHANGES IN THE MEMBRANE POTENTIAL

PABLO E. VISCONTI

Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

Capacitation is a complex series of molecular events that occurs in sperm after epididymal maturation and confers on sperm the ability to fertilize an egg. This process can be mimicked *in vitro* in defined media, the composition of which is based on the electrolyte concentration of oviductal fluid. In most cases, capacitation media contain energy substrates, such as pyruvate, lactate and glucose, a cholesterol acceptor (usually serum albumin), NaHCO_3 , Ca^{2+} , low K^+ , and physiological Na^+ concentrations. The mechanism of action by which these compounds promote capacitation is poorly understood at the molecular level; however, some molecular

events significant to the initiation of capacitation have been identified. For example, capacitation correlates with cholesterol efflux from the sperm plasma membrane, increased membrane fluidity, modulations in intracellular ion concentrations, hyperpolarization of the sperm plasma membrane and a cAMP-dependent increase in protein tyrosine phosphorylation. These molecular events are required for subsequent changes in the sperm motility pattern and for the induction of the exocytotic acrosome reaction. This talk will discuss recent progress that has been made in elucidating mechanisms that regulate sperm capacitation.