

Señalización del calcio en el proceso de fertilización

Dr. Rafael Fissore¹

En la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento, incluyendo a los mamíferos, el ingreso del espermatozoide al ovocito causa la activación del mismo y la consecuente iniciación del desarrollo embrionario. Es sabido que el mecanismo mediante el cual el espermatozoide induce esta activación depende de las concentraciones intracelulares de calcio (Ca^{2+}) libre del ovocito. El incremento de Ca^{2+} es observado al momento de la fecundación, sin embargo la forma y el patrón de los picos varía entre diversas especies.

La primer parte de esta presentación se centrará en el mecanismo mediante el cual los espermatozoides inducen la activación del ovocito mediante Ca^{2+} y en cómo este incremento adopta un patrón oscilatorio de incremento repetitivo que ocurre cada 10 a 30 minutos y puede durar hasta 10 horas. Si bien aún no ha sido confirmado mediante modelos genéticos, vastas son las evidencias que demuestran que el espermatozoide de mamíferos transporta una fosfolipasa C (PLC, por su denominación en inglés) específica denominada zeta 1. Al momento de la fecundación, PLCzeta1 es liberada en el ooplasma y desencadena el patrón de oscilaciones de Ca^{2+} que es característico en los mamíferos. Las propiedades tanto de estructura como de función de PLCzeta1 que permiten a esta enzima mantener las oscilaciones persistentemente serán discutidas. Así como

también serán discutidas las variaciones especie-específicas en la potencia de esta enzima y el impacto que generan sobre la fertilidad defectos de expresión de la misma. Por último, investigaciones recientes sugieren un mecanismo adicional que involucra a una proteína *novel* PAWP que contribuye a la activación del ovocito en mamíferos. Estos hechos serán presentados en el contexto de PLCzeta1 y la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} .

En la segunda parte de la presentación, se expondrán algunos de los mecanismos necesarios para mantener las oscilaciones de manera persistente en el tiempo. Específicamente, se presentarán evidencias que muestran que el Ca^{2+} extracelular es requerido para la acumulación de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático (ER, por su denominación en inglés) que actúa como depósito intracelular de este ion en el ovocito. Mediante la utilización de un constructo de FRET, se midieron el Ca^{2+} intra-ER simultáneamente con las oscilaciones de Ca^{2+} citoplasmático inducidas por la fecundación. Nuestros resultados indicaron que las 2 primeras oscilaciones inducidas por el espermatozoide promueven una entrada marginal de Ca^{2+} a los depósitos, mientras que subsecuentes oscilaciones promueven un entrada de Ca^{2+} importante que contribuye a recargar el ER a tal punto que la tasa de recarga de los depósitos controla la frecuencia de las oscilaciones.

¹Dept. of Vet. & Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, MA. USA.

Tanto durante el estado de vesícula germinal como las oscilaciones posteriores a la fecundación, los bajos niveles de Ca^{2+} en el ER podrían ser el estímulo que promueve la entrada de Ca^{2+} en estas condiciones. Por ello, examinamos la posibilidad de que esta entrada de Ca^{2+} , a fin de llenar los depósitos, se encuentre asociada con la activación de los mecanismos de *Store Operated Ca²⁺ Entry* (SOCE). En primer lugar, encontramos que los efectores moleculares de SOCE, Stim1 y Orai1, se expresan en el ovocito de ratón. Luego determinamos que la expresión heteróloga de Stim1 y Orai1 potenció el influjo de Ca^{2+} en ovocitos y recapituló la inactivación progresiva de la entrada de Ca^{2+} en general, y SOCE en particular, que se desarrolla durante la

maduración. Por otro lado, los intentos de inactivar SOCE con formas mutantes dominantes negativas de Stim1 y Orai1 fallaron en afectar los niveles de Ca^{2+} en el ER durante la maduración o luego de las oscilaciones seguidas de la inyección de ARNm de PLCzeta. Estos resultados sugieren que un mecanismo alternativo a SOCE tal vez sea importante para el llenado de los depósitos de Ca^{2+} durante la maduración y la mantención de las oscilaciones luego de la fecundación. Finalmente, hemos encontrado que los ovocitos de ratón expresan varios miembros de la familia de canales *transient receptor potential* (TRP). Como parte de esta presentación, presentaremos además estrategias para probar la función y posible rol de estos canales durante los procesos de maduración y fecundación en ovocitos de mamíferos.