SEASON ONE
18 Marzo 2021

In che modo i mitocondri regolano la movimentazione di calcio intracellulare negli spermatozoi di suino?

Olga Blanco-Prieto[1], Marcella Spinaci[1], Giovanna Galeati[1], Cinzia Cappannari[1], Carlo Tamanini[1], Diego Bucci[1]

[1] DIMEVET – Servizio di Anatomia e Fisiologia

Background - La capacitazione, processo mediante il quale i gameti maschili acquisiscono la capacità di fecondare l'oocita, è un processo complesso che coinvolge anche modificazioni dell'attività mitocondriale degli spermatozoi. Si assiste a un aumento della produzione di energia [1] ed il calcio intracellulare si accumula nella testa e nel segmento intermedio della coda degli spermatozoi [2], mentre nel gamete a riposo il calcio si trova negli acrosomi, nei mitocondri e nelle strutture della membrana nucleare del collo [3,4]. Durante la capacitazione, inoltre, il calcio è utilizzato come messaggero secondario nell'attivazione della protein chinasi A, un importante intermediario del processo capacitativo [6-8]. Nei mitocondri il trasporto di calcio da altri siti di stoccaggio, con relativo aumento di concentrazione, innesca meccanismi di apoptosi cellulare nelle cellule somatiche [5], un processo che presenta analogie con la capacitazione spermatica.
Scopo del lavoro - L'obiettivo delle ricerche è lo studio dei meccanismi mitocondriali di regolazione del movimento del calcio cellulare durante la capacitazione *in vitro* degli spermatozoi di suino.
Materiali e metodi - In questo studio verranno effettuati due esperimenti. Nel primo esperimento, al fine di valutare la movimentazione citoplasmatica del calcio, spermatozoi di suino saranno incubati per 4 ore in diversi media:
- Non capacitante
- Capacitante
- Capacitante senza calcio o con EGTA (chelante del calcio)
- Capacitante con Ru360 (inibitore del mitochondrial calcium uniporter (MCU)) [9]
- Capacitante con BAPTA (chelante del calcio intracellulare) [10]

Nel secondo esperimento, al fine di valutare l'uptake di calcio nei mitocondri, gli spermatozoi saranno incubati per 4 ore in diversi media:
- Non capacitante
- Capacitante
- Capacitante senza calcio
- Capactitante con erastina (inibitore dei "voltage dependent anionic channels" VDAC2/VDAC3) [11]

In entrambi gli esperimenti si analizzerà la motilità utilizzando il sistema CASA, l'attività mitocondriale valutando la respirazione mitocondriale e la produzione di ATP, il grado di capacitazione degli spermatozoi e la movimentazione del calcio intracellulare mediante microscopia a fluorescenza, citometria a flusso e Western blotting, l'attività del citocromo C mediante colorimetria.

Risultati e conclusioni - I risultati che ci proponiamo di ottenere dovrebbero permetterci di chiarire il ruolo dei mitocondri nella movimentazione dei depositi di calcio intracellulare durante la capacitazione *in vitro* e nel controllo dei canali del calcio MCU e VDAC2/VDAC3.

Bibliografia

[1] Ramió-Lluch L, Yeste M, Fernández-Novell JM, Estrada E, Rocha L, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Concha II, Ramírez A, Rodríguez-Gil JE. Oligomycin A-induced inhibition of mitochondrial ATP-synthase activity suppresses boar sperm motility and in vitro capacitation achievement without modifying overall sperm energy levels. Reprod Fertil Develop (2014) 26: 883-897.

[2] Yeste M, Fernández-Novell JM, Ramió-Lluch L, Estrada E, Rocha LG, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Concha II, Ramírez A, Rodríguez-Gil JE. Intracellular calcium movements of boar spermatozoa during 'in vitro' capacitation and subsequent acrosome exocytosis follow a multiple-storage place, extracellular calcium-dependent model. Andrology (2015) 3: 729-747.

[3] Publicover S, Harper C, Barratt,C.[Ca2+] signalling in sperm: making the most of what you've got. Nature Cell Biol (2007) 9: 235–242.

[4] Correia J, Michelangeli F, Publicover S. Regulation and roles of Ca2+ stores in human sperm. Reproduction (2015) 150: R65–R76.

[5] Webster KA. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. Future Cardiol (2012) 8: 863–884.

[6] Battistone MA, Da Ros VG, Salicioni AM, Navarrete FA, Krapf D, Visconti PE, Cuasnicú PS. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and downregulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. Mol Hum Reprod (2013) 19: 570–580.

[7] Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, et al. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. Cell Metab (2005) 2: 21–33.

[8] Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab (2005) 2: 9–19.

[9] Garcia-Rivas G de J, Carvajal JK, Correa F, Zazueta C. Ru360, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats in vivo. Br J Pharmacol (2006) 149: 829-837.

[10] Zhou S, Yuan X, Liu Q, Zhang X, Pan X, Zang L, Xu L. BAPTA-AM, an intracellular calcium chelator, inhibits RANKL-induced bone marrow macrophages differentiation through MEK/ERK, p38 MAPK and Akt, but not JNK pathways. Cytokine (2010) 52: 210-214.

[11] Nguyen TM, Combarnous Y, Praud C, Duittoz A, Blesbois E. Ca2+/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinases (CaMKKs) Effects on AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Regulation of Chicken Sperm Functions. PLoS One (2016) 25: e0147559.

- La **casata** di appartenenza

[ ] One Health
[ ] Blue Growth
[X] Fundamental Sciences
[ ] Clinical Sciences
[ ] Animal Production

- La **tipologia** del proprio progetto

[X] Individual Research
[ ] Team Work
[ ] Travelling Scientists