

PARTICIPACIÓN DE PKC/ERK EN LA FOSFORILACIÓN DE ESFINGOSINA KINASA DURANTE LA REACCIÓN ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Lucas A. Resa Jurin¹, Laila Suhaiman¹, Silvia A. Belmonte¹.

¹Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos", CONICET-UNCuyo. Mendoza

El espermatozoide posee una única vesícula secretoria que exocita frente a diferentes estímulos. Este proceso se denomina reacción acrosomal (RA) y es requerido para la penetración de la zona pelúcida del ovocito por el espermatozoide y para la fertilización. Nuestro interés se centró en el efecto ejercido por esfingosina 1-fosfato (S1P) y la enzima que regula su producción, esfingosina quinasa (SK), en la exocitosis regulada. En trabajos previos, determinamos que S1P inducía la RA en espermatozoides humanos activando receptores acoplados a proteína Gi. El lípido provocó un aumento de calcio intracelular en células vivas, activó PLC, PKC y la pequeña GTPasa, Rab3A. Presentamos evidencia de la presencia, localización y requerimiento de SK1 para que ocurra la RA. Los ensayos funcionales demostraron que el diacilglicerol (DAG) (lípido inductor de la RA) necesita la activación de SK1 para inducir exocitosis. Demostramos que el espermatozoide humano sintetiza S1P y que a través de una acción autocrina-paracrina dispara la RA. A partir de estos resultados se abrieron una serie de interrogantes que pretendemos resolver en este trabajo. En principio nos preguntamos si los receptores descritos para S1P (S1PR1-5) estaban presentes en espermatozoides humanos e intervenían en la exocitosis. Utilizando Western blot detectamos los cinco receptores descritos, y su localización mediante IFI. Usando agonistas y antagonistas de los S1PR1, 2 y 3 en ensayos de RA, detectamos que S1PR 1 y 3 intervienen en la RA inducida por DAG y por un éster de forbol, PMA. Nuestros resultados indican que estimulando la RA con PMA se activa SK y aumenta la concentración de S1P producida por el espermatozoide. Algunos autores observaron que el tratamiento con PMA, conducía a una fosforilación de SK y a la activación de la misma. Para demostrar si la quinasa que intervenía en este proceso era PKC o ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) realizamos experimentos funcionales usando inhibidores de PKC y ERK. Para dilucidar si PKC estaba "upstream" de ERK1/2 utilizamos inhibidores de PKC antes de aplicar el estímulo de S1P o de PMA. Considerando que ERK1/2 se activa por fosforilación analizamos por WB la presencia de P-ERK1/2. Observamos incremento de P-ERK1/2 en el tratamiento con el estímulo y su disminución en presencia de los inhibidores de PKC. Para determinar si ERK es la encargada de fosforilar SK incubamos los espermatozoides con S1P o PMA en presencia o no de los inhibidores de ERK y analizamos por WB el estado de fosforilación de SK con un anti-P-SK. Detectamos la presencia de P-SK en ensayos tratados solamente con el inductor, mientras que en tratamientos con inhibidores no fue detectado. Corroboramos estos resultados evaluando por IFI con anticuerpos anti P-ERK y anti P-SK la presencia de las proteínas fosforiladas luego de un estímulo exocítico. Utilizando inhibidores de ERK1/2 o de su vía (PD98059 y U0126) en ensayos funcionales observamos inhibición de la exocitosis inducida por S1P o DAG. Por lo tanto proponemos que el aumento de DAG causado por un estímulo exocítico produce la activación de la siguiente vía: PKC→pERK→pSK→S1P.