Tema para Seminario de investigación

Orientación: Biología

Título del tema: Lípidos involucrados en la inducción fisiológica de la exocitosis acrosomal por zona pelúcida humana

Investigadores/docentes a cargo: Silvia Alejandra Belmonte

Contacto: belmonte.silviaalejandra@gmail.com

Descripción: El espermatozoide humano es una célula terminal, muy polarizada cuya única función es transferir el material genético al ovocito. Para que esto ocurra debe secretar el contenido de su gránulo apical denominado acrosoma. Este proceso se denomina exocitosis o reacción acrosomal, tiene un mecanismo complejo y está altamente regulado.

Objetivo general.

La zona pelúcida ovocitaria (ZP) es uno de los inductores fisiológicos de la exocitosis acrosomal más importante. Sin embargo, la cascada de señalización que ésta dispara está parcialmente descripta y existen numerosos puntos oscuros por develar en este proceso. La identificación y caracterización de los lípidos que participan en los procesos de fusión de membranas en la exocitosis ha comenzado hace pocos años, así como la integración de los mismos con la maquinaria proteica que participa en este proceso. Por esa razón el objetivo general de esta propuesta consistirá en investigar específicamente los mecanismos moleculares de la exocitosis acrosomal del espermatozoide humano inducida por ZP que involucren lípidos.

Objetivos específicos.

1- Evaluar si existe conexión entre la vía de señalización disparada por ZP y la inducida por esfingosina 1-fosfato (S1P) (Suhaiman et al, 2010) mediante ensayos de exocitosis acrosomal analizando la participación de los distintos receptores.

2- Determinar si la exocitosis acrosomal inducida por ZP regula la síntesis de diferentes esfingolípidos bioactivos (esfingosina 1-fosfato, ceramida 1-fosfato) (Suhaiman et al, 2010; Vaquer, Suhaiman et al, 2020; Belmonte et al, 2016)

La disponibilidad de ZP humana es muy limitada y requiere la obtención y separación de las glicoproteínas para analizar el efecto de cada una de ellas. El único grupo en el mundo que produce ZP humana recombinante en células eucariotas de insecto con la actividad biológica específica esperada es el de la Dra. Chirinos del Centro de Investigación Biomédica, Inst. Nac. de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, DF, México. Nuestro laboratorio mantiene una colaboración activa con este centro por lo tanto contamos con la glicoproteína humana recombinante. Este proyecto implica el aprendizaje de las siguientes técnicas: Western blot, inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo, manejo de microscopios ópticos, de fluorescencia, confocal y electrónicos. Ensayos de exocitosis o funcionales usando tinción con lectina de Pisum sativun acoplada a un fluoróforo. Se realizarán ensayos funcionales (de exocitosis) en espermatozoides humanos como se describe en (Suhaiman et al, 2021). Se evaluará el estado del acrosoma contando los espermatozoides teñidos con lectina de Pisum sativum acoplada a fluoresceína en microscopio de fluorescencia o por citometría de flujo. Western blotting e inmunofluorescencia. Estas metodologías serán utilizadas para detectar la presencia y/o localización de determinadas proteínas en los espermatozoides humanos. Espectrofluorometría. La dinámica del calcio intracelular se medirá con sondas fluorescentes sensibles a los cambios de concentración de dicho ion y será monitoreada por espectrofluorometría en tiempo real según la metodología descrita en nuestras publicaciones (Lopez, Pelletán et al, 2012 y Pelletán et al, 2015) Mediciones de calcio en células vivas, en tiempo real con alta resolución espacial y temporal como se describe en nuestras publicaciones (Lopez, Pelletán et al, 2012 y Pelletán et al, 2015).