

**DIACILGLICEROL INDUCE LA REACCIÓN ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS
MEDIANTE LA ACTIVACION DE RASGRP1 EN AUSENCIA DE CALCIO Y AMPc**

Altamirano KN¹; Lucchesi O¹; Ruede MC¹; Belmonte SA¹

¹ IHEM CONICET-FCMédicas-UNCuyo. e-mail: karina.altam@gmail.com

El espermatozoide contiene un gran gránulo secretorio (acrosoma) que excita frente a diferentes estímulos. Este proceso se denomina reacción acrosomal y es requerido para que ocurra la fertilización. Nuestro laboratorio demostró que el diacilglicerol (DAG) estimula la exocitosis acrosomal induciendo un ciclo de retroalimentación positiva dependiente de PKC y fosfolipasa D1 (PLD1) que provee continuamente fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). Llamativamente, DAG es capaz de inducir la exocitosis en ausencia de calcio extracelular activando dos vías de señalización, una que conduce a la síntesis de IP₃ y salida de calcio del reservorio acrosomal, y otra que conduce a la activación de Rab3A y ensamble de las SNAREs. El módulo de señalización cAMP/Epac/Rap1/PLC_ε/IP₃ moviliza calcio del acrosoma durante la exocitosis del espermatozoide. Hasta ahora se ha descrito que en espermatozoides humanos Epac (exchange protein directly activated by cAMP) activa la pequeña GTPasa Rap1. Nosotros postulamos una vía alternativa donde DAG podría también activar la Rap1 a través de un GEF (factor intercambiador de nucleótidos, RasGRP1). Rap1-GTP entonces activaría PLC_ε sin la necesidad de cAMP y Epac. Utilizando la esponja de cAMP permeable a membranas, secuestramos el cAMP endógeno y luego agregamos DAG. El DAG indujo exocitosis en ausencia de cAMP. Usando FAR-immunofluorescence demostramos que DAG es capaz de activar Rap1. Mediante Western blot usando anticuerpos específicos, demostramos la presencia de una proteína de 81 kDa, RasGRP1, y por inmunofluorescencia indirecta determinamos que se localizaba en la región acrosomal de espermatozoides humanos. Para estudiar el efecto de dicha proteína en la RA realizamos ensayos de exocitosis acrosomal donde evaluamos la pérdida del acrosoma mediante la tinción con lectina de *Pisum sativum* acoplada a FITC. Las células se contaron en un microscopio de fluorescencia o por citometría de flujo. Incubamos espermatozoides permeabilizados con el anticuerpo específico contra RasGRP1 y observamos que a una concentración de 70 nM el anticuerpo bloqueó la exocitosis inducida por DAG. Para estudiar en profundidad el efecto de RasGRP1 en la exocitosis, se produjo la proteína recombinante GST-RasGRP1. Agregamos la proteína en dosis crecientes 25-40 nM a gametas permeabilizadas y observamos que éste factor es capaz de inducir reacción acrosomal produciendo un efecto máximo a 35 nM. Mediante ensayos funcionales determinamos que al secuestrar DAG con el dominio C1 de Munc13-1 (1µM) se inhibió significativamente la exocitosis acrosomal estimulada por RasGRP1. En este trabajo presentamos evidencia directa de la presencia y función de un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (RasGRP1) activado por DAG en espermatozoides humanos. En este trabajo, proponemos una nueva vía de activación de Rap1 durante la exocitosis acrosomal.