



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“La vía Fibronectina/Integrina/FAK/MEK1y2/ERK2/GEF-
H1/RhoA regula la polimerización del citoesqueleto de
actina durante la capacitación”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. MONICA LIZBETH SALGADO LUCIO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOLOGÍA CELULAR

Director de la Tesis:

Dr. ENRIQUE OTHÓN HERNÁNDEZ GONZÁLES

Ciudad de México

Julio, 2020

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No. 51 perteneciente al Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unida Zacatenco (CINVESTAV), bajo la tutoría del Dr. Enrique Othón Hernández Gonzáles y la asesoría de: la Dra. Guadalupe Reyes Cruz del Departamento de Biología Celular CINVESTAV, el Dr. José Manuel Hernández Hernández del Departamento de Biología Celular CINVESTAV, la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega del Departamento Toxicología CINVESTAV y la Dra. Leticia Moreno Fierros de la UBIMED, FES-I, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de doctorado No. 263011, así como para el proyecto No. 248342. Además, se contó con el apoyo de económico del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología COMECYT a través de la beca de doctorado No. 2018AD0003-11.

Agradezco a la Dra. Ana Lilia Roa Espitia (Auxiliar de Investigación) por su ayuda en la estandarización y asesoría de las técnicas implementadas en este trabajo, así como de su valiosa asesoría.

También agradezco a la M. en B.E. Danelia Ramírez Ramírez y a la M. en C. Coral Yamileth Jorge Cruz por su apoyo en la realización y sugerencias en las técnicas realizadas; también a la Lic. Eva Delgado Sandoval por su servicio técnico; asimismo agradezco al M. en C. Jaime Escobar Herrera (Auxiliar de Investigación, responsable del microscopio confocal) por su asesoría en el manejo y capacitación del microscopio confocal.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada muy especialmente a mi madre Ma. Artemia Lucio Fulgencio, quien siempre ha sido mi más grande apoyo, a mi padre Julio Salgado Gómez quien es parte indispensable en mi formación, gracias a los dos por el apoyo incondicional que me brindan, al cual ha sido parte fundamental para cumplir mis metas. A mi esposo Ulises Villagrán Paz, por apoyarme y acompañarme en este largo camino. A mi hija Naomi Villagrán Salgado, porque gracias a ti he aprendido a ver la vida de distinta forma. A mis hermanos Filiberto Armando Salgado Lucio y Julio Cesar Salgado Lucio, porque nunca perdí su apoyo. A mi suegra Delfina Paz Padilla, por el apoyo incondicional que nos ha brindado a Ulises y a mí. A mis cuñadas, a mi suegro y a mis sobrinos, por siempre tener un concejo y sonrisa para brindarme, y llenarme de alegría. A todos y cada uno de ustedes les dedico y les digo que este logro también les pertenece.

Nuevamente a mi Tutor Dr. Enrique Othón Hernández González que con sus enseñanzas no solo me preparaban en lo académico sino también en lo personal, a mis asesores la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, el Dr. José Manuel Hernández Hernández, la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega y la Dra. Leticia Moreno Fierros que con su apoyo y tiempo ayudaron a que el trabajo estuviera listo para poder presentarlo, a la Dra. Ana Lilia Roa Espitia (Auxiliar de investigación) por su asesoría en las técnicas, y por brindarme su amistad y apoyo. Así como a mis compañeros, Cesar, Coral, Aideé Saraí Tania y Deneb por su apoyo y sus asesorías en el laboratorio. A mi compañera y amiga Danelia, por ir más allá del apoyo académico y brindarme tu amista.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
El espermatozoide	1
Morfología del espermatozoide	1
Capacitación	2
Reacción Acrosomal	3
Remodelación del citoesqueleto de actina	4
Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2)	6
ERK1/2 y el citoesqueleto de actina	7
ERK1/2 en los espermatozoides de los mamíferos	7
Cinasa de adhesión focal (FAK)	9
ANTECEDENTES DIRECTOS	10
JUSTIFICACIÓN	12
HIPOTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Reactivos	14
Anticuerpos	14
Animales	15
Capacitación de los espermatozoides	15
Ensayo de fluorescencia con la clortetraciclina (CTC)	16
Ensayos de inmunofluorescencia indirecta	16
Ensayo de Western blot (WB)	17
Fosforilación de las proteínas en tirosinas	18
Evaluación de la F-actina	19
Coinmunoprecipitación	20
Ensayo de activación de RhoA	20

Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
ERK1/2 participan en la RA inducida con progesterona	22
ERK1/2 participan en la polimerización de actina que se da en el acrosoma durante la capacitación ...	26
La interacción espermatozoide-espermatozoide activa a ERK2	28
FAK activa ERK2 durante la capacitación.....	31
La fosforilación de FAK en Tyr925 incrementa durante la capacitación	32
Grb2 se asocia con FAK durante la capacitación	33
Expresión y activación de GEF-H1 en espermatozoides de cobayo	36
FAK y ERK2 participan en la activación de RhoA durante la capacitación	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS.....	50

RESUMEN

La remodelación y polimerización del citoesqueleto de actina son procesos importantes para la capacitación espermática, ya que son indispensables para que se den de forma exitosa la reacción acrosomal y la fertilización. Recientemente, nuestro laboratorio ha reportado: 1) la participación de FAK en la polimerización de la actina en espermatozoides de cobayo, sin embargo, el mecanismo por el cual FAK regula este proceso es desconocido; 2) que ERK2 se activa en los primeros minutos de la capacitación y que su inhibición directa reduce significativamente la reacción acrosomal, pero no la capacitación; y 3) durante la capacitación espermática, FAK se fosforila en Tyr925, fosforilación necesaria para estimular la vía de activación de ERK2; la inhibición de FAK reduce significativamente la activación de ERK2. Por lo tanto, en el presente trabajo investigamos el papel de ERK2 en la polimerización del citoesqueleto de actina, así como los componentes de la vía que regulan este proceso FNT/integrina/FAK/Grb2/MEK/ERK2/GEF-H1/RhoA. Nuestros resultados muestran que ERK1/2 participan en la reacción acrosomal inducida con progesterona, además corroboramos, a través de la distribución de microdominios de membrana y la fosforilación de residuos Tyr, que ERK1/2 no participan en la capacitación. También demostramos que la inhibición MEK1/2 (quinasas activadoras de ERK1/2) o la inhibición directa de ERK1/2 bloquean la polimerización de la actina. Por otro lado, encontramos que la fibronectina (FNT), en junto con las integrinas $\beta 1$ o $\beta 3$, participan en la interacción espermatozoide-espermatozoide, así como en la activación de ERK2. Confirmamos la participación de FAK en la activación de ERK2, mediante la observación de la fosforilación de FAK en Tyr925 y su asociación con Grb2 durante la capacitación. Adicionalmente encontramos la presencia de GEF-H1, su fosforilación en residuos Thr que es catalizada por ERK1/2, la cual regula su actividad y asociación con RhoA. Asimismo, observamos la activación de RhoA durante la capacitación y su participación en la polimerización de la actina. Tanto la fosforilación del GEF-H1, como la asociación GEF-H1/RhoA, así como la activación de RhoA se evitaron al inhibir a FAK o a ERK1/2. Finalmente, nuestros resultados muestran que la vía FNT/integrina/FAK/Grb2/MEK/ERK2/GEF-H1/RhoA es una de las vías de señalización que regulan la polimerización de la actina asociada a la capacitación espermática.

ABSTRACT

Actin cytoskeleton remodeling and polymerization are important for sperm capacitation, indispensable processes for successful acrosome reaction and fertilization. Recently, we have reported: 1) The participation of FAK in the actin polymerization in guinea pig sperm, however, the mechanism by which FAK regulates this process is unknown; 2) ERK2 is activated in the first minutes of capacitation and reduces the acrosomal reaction by direct inhibition of ERK2, but inhibition does not affect capacitation; and 3) during capacitation, FAK is phosphorylated in Tyr925, phosphorylation required to stimulate the ERK2 activation pathway; FAK inhibition reduces ERK2 activation. Therefore, in the present work we investigate the role of ERK2 on actin cytoskeleton polymerization, as well as the components of the pathway that regulate this process. Our results showed that ERK1/2 participates in the progesterone-induced acrosome reaction; furthermore, we corroborate through the distribution of membrane microdomains and the phosphorylation of Tyr residues that ERK1/2 does not participate in the capacitation. We also demonstrate that inhibition of MEK1/2 (kinases that activate ERK1/2) or direct inhibition of ERK1/2 block actin polymerization. On the other hand, we found that Fibronectin together with β -integrin participate in the sperm-sperm interaction, as well as in the activation of ERK2. We confirm the participation of FAK in ERK2 activation, FAK phosphorylation in Tyr925 and its association with Grb2 during capacitation was observed, which is involved in ERK1/2 activation. In addition, we found the presence of GEF-H1, its phosphorylation at Thr residues, which is catalyzed by ERK1/2, such phosphorylation regulates its activity and association with RhoA. Likewise, we observed the activation of RhoA during capacitation and its participation on actin polymerization. GEF-H1 phosphorylation, GEF-H1/RhoA association, and RhoA activation were prevented by inhibiting of FAK or ERK1/2. Finally, our results indicate that fibronectin/integrin/FAK/Grb2/MEK/ERK2/GEF-H1/RhoA is one of the signaling pathways that regulates the polymerization of action associated with sperm capacitation.

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de la espermatogénesis, el cual se da a través de fases mitótica, meiótica y post-meiótica sucesivas dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. El espermatozoide solo tiene como fin entregar el material genético para fecundar al óvulo (Toshimori and Eddy, 2015).

Morfología del espermatozoide

Los espermatozoides de mamíferos se componen de la cabeza y el flagelo, los cuales están unidos por la pieza conectora (Fig. 1).

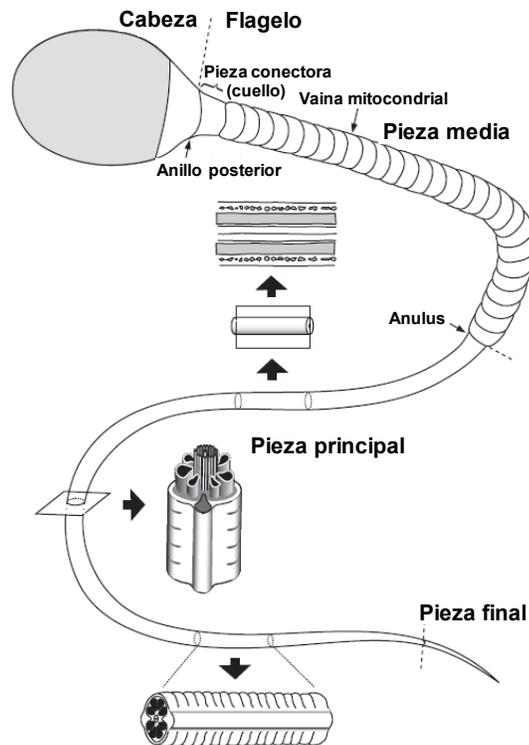


Figura 1. Características generales de los espermatozoides de los mamíferos. La cabeza del espermatozoide se une al flagelo por la pieza conectora. Las regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza final. La pieza media contiene la vaina mitocondrial, mientras que la pieza principal contiene la vaina fibrosa. Vistas longitudinales y transversales de la pieza principal y un segmento de la vaina fibrosa están indicadas por flechas (Toshimori and Eddy, 2015).

La cabeza contiene el núcleo y el acrosoma. El núcleo contiene una cromatina muy condensada debido a su asociación con las protaminas (Toshimori and Eddy, 2015). El acrosoma es una vesícula de membrana cerrada que contiene las enzimas hidrolíticas que se liberan durante la reacción acrosomal (RA). La acción enzimática es necesaria para que el espermatozoide pueda penetrar a través de las envolturas del óvulo y así lograr la fertilización (Tulsiani et al., 1998).

El flagelo se divide en tres segmentos distintos: la pieza media, la pieza principal y la pieza final. Los principales componentes estructurales del flagelo son: el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa (Fig. 1). El axonema se extiende a lo largo de todo el flagelo. Las fibras densas externas se extienden desde la pieza conectora a la parte posterior de la pieza principal. La vaina mitocondrial rodea inmediatamente las fibras densas externas en la pieza media. La vaina fibrosa se encuentra en la pieza principal rodeando a las fibras densas externas (Toshimori and Eddy, 2015).

Capacitación

Los espermatozoides de mamíferos recién eyaculados son incapaces de fertilizar al óvulo. Para lograr su maduración funcional los espermatozoides deben de residir durante un período de tiempo dentro del tracto reproductor femenino (Florman and Fissore, 2015). A los espermatozoides que completan este proceso se les llama “capacitados” (Chang, 1951).

La capacitación está asociada con cambios fisiológicos y bioquímicos del espermatozoide, algunos de estos cambios son los siguientes:

- Remoción y/o redistribución de los esteroides de la membrana plasmática como el colesterol, teniendo como consecuencia un incremento en la fluidez de la membrana y del transporte de iones como Ca^{2+} , HCO_3^- y Cl^- , con un consecuente incremento del pH intracelular (Demarco et al., 2003; Salicioni et al., 2007; Chavez et al., 2012; Nishigaki et al., 2014).

- El aumento intracelular del Ca^{2+} y HCO_3^- trae como consecuencia la activación de la adenilato ciclasa soluble (ACs) incrementando al adenosín monofosfato cíclico (AMPc), lo que lleva a la activación de la proteína cinasa A (PKA), la cual activa a las proteínas tirosina cinasas (PTK) (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Signorelli et al., 2012). Como consecuencia aumenta la fosforilación de proteínas en sus residuos de tirosina (p-Tyr) (Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b).
- Aumento del metabolismo que se observa como un aumento de la concentración intracelular de ATP (Florman and Fissore, 2015).
- Cambios en la composición de los fosfolípidos de la membrana plasmática atribuibles a la activación de la enzima escramblasa que transloca fosfolípidos, tales como: fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielina (Gadella and Harrison, 2000).
- Hiperpolarización de la membrana plasmática, requerida para la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Arnoult et al., 1999; Munoz-Garay et al., 2001; Demarco et al., 2003).
- Polimerización y remodelación del citoesqueleto de actina (Brener et al., 2003; Cabello-Agueros et al., 2003; Breitbart et al., 2005; Ickowicz et al., 2012).

Los cambios funcionales que se dan como consecuencia de la capacitación son:

- ✓ La direccionalidad de la motilidad en respuesta a un gradiente de agentes quimioattractores (Ralt et al., 1991; Eisenbach, 2004; Sun et al., 2005).
- ✓ La adquisición de la hiperactivación de la motilidad o hipermotilidad (Yanagimachi, 1994; Visconti et al., 1995a; Salicioni et al., 2007), que se caracteriza porque el flagelo muestra una mayor amplitud y una longitud de onda más corta, como consecuencia la trayectoria de la cabeza de los espermatozoides es menos lineal y abarca un área más grande que la observada en la motilidad activada del espermatozoide recién eyaculado.

Reacción Acrosomal

Una vez que los espermatozoides se capacitan, estos están preparados para experimentar la RA, la cual es un proceso de exocitosis regulado por el Ca^{2+} (Abou-Haila

and Tulsiani, 2009; Tulsiani and Abou-Haila, 2012; Santi et al., 2013), donde se exponen nuevos dominios de membrana, los cuales son indispensables para la fertilización (Abou-Haila and Tulsiani, 2000; Brener et al., 2003; Abou-Haila and Tulsiani, 2009). La RA es un proceso controlado de fusión y fisión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (Fig. 2) que resulta en la formación de vesículas heterogéneas y con ello la aparición de fenestras por las cuales se libera el contenido de la matriz acrosomal, la cual contiene una variedad de proteínas con diferentes actividades líticas como: proteasas, glicohidrolasas, esterases, arilsulfatasas, péptidos bioactivados y otras proteínas con funciones inciertas. Las enzimas hidrolíticas y proteolíticas disuelven la matriz de la zona pelúcida (ZP), por donde el espermatozoide penetra (Llanos et al., 1993) y en conjunto con la hiperactivación de la motilidad hacen posible que el espermatozoide pueda penetrar la ZP, para tener contacto con la membrana plasmática del óvulo y finalmente fecundarlo (Yanagimachi, 1994; Tulsiani et al., 1998; Inoue et al., 2011; Jin et al., 2011).

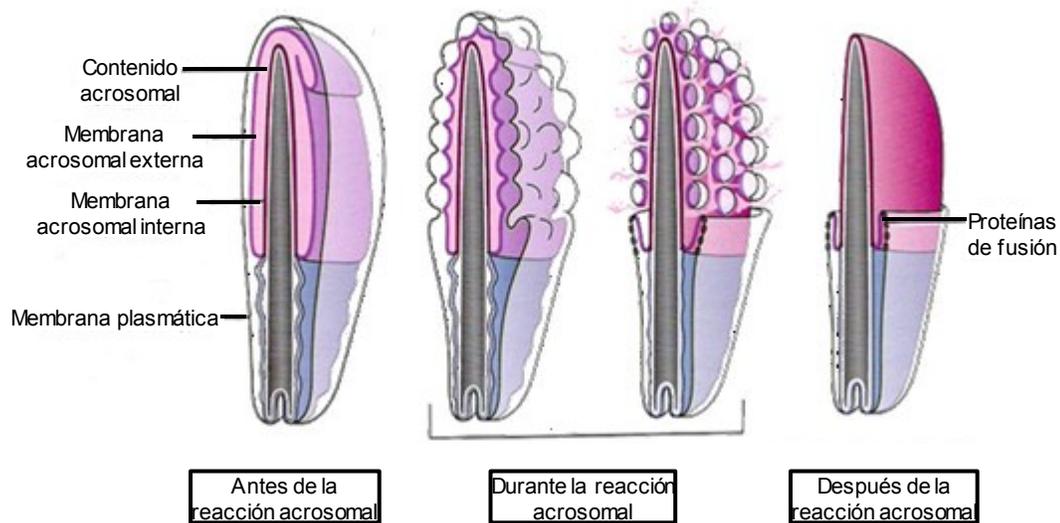


Figura 2. Esquema de la reacción acrosomal. Secuencia que sigue un espermatozoide con acrosoma intacto a un espermatozoide reaccionado, por medio de la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Rivera-Gaona, 2012).

Remodelación del citoesqueleto de actina

Como ya se mencionó anteriormente, la remodelación y polimerización del citoesqueleto de actina es uno de los cambios que se generan durante la capacitación

(Brener et al., 2003). En los espermatozoides de los mamíferos, la polimerización de la actina es muy importante, ya que el inhibirla tiene consecuencias sobre la fertilización. Se ha observado que los espermatozoides tratados con citocalasina-D, un inhibidor de la polimerización de actina, tienen una marcada disminución en la tasa de fertilización *in vitro* (Rogers et al., 1989; Castellani-Ceresa et al., 1993; Brener et al., 2003), ya que no permite la fusión de las membranas plasmáticas del ovuló y del espermatozoide (Sanchez-Gutierrez et al., 2002). Esto puede deberse a que la proteína Izumo, no se relocaliza en la región ecuatorial de los espermatozoides (Sosnik et al., 2009), lo cual es esencial para que se dé la fusión de las membranas (Sutovsky, 2009).

Por otro lado, la polimerización de la actina es también importante para que la fosfolipasa C se reubique, del citosol a la membrana plasmática donde participa en la fusión de las membranas durante la RA (Spungin et al., 1995; Breitbart et al., 2005). Por otra lado, se ha sugerido que la presencia del citoesqueleto de actina-espectrina en la superficie cortical de la membrana plasmática evita la fusión temprana de las membranas ya que la desestructuración del citoesqueleto de actina mediante citocalasina-D o latrunculina A facilita la RA (Hernandez-Gonzalez et al., 2000; Roa-Espitia et al., 2016).

La presencia de proteínas de unión a la actina en los espermatozoides de los mamíferos sugiere que el ensamble, así como el desmontaje de los filamentos de actina, está bien controlado. Se han encontrado que proteínas como WASP, Arp2/3, profilinas I y II, y las GTPasas pequeñas como Cdc42, RhoA, RhoB y Rac1 participan en la polimerización de la actina de *novο* (Delgado-Buenrostro et al., 2005; Ducummon and Berger, 2006). Adicionalmente, se ha sugerido que la vía de señalización, RhoA/ROCK/LIMK/Cofilina en espermatozoides de bovino y ratón podría estar relacionada con la polimerización de la actina durante la capacitación (Fiedler et al., 2008; Romarowski et al., 2015).

Se ha propuesto que la polimerización de la actina en los espermatozoides, depende de vías de señalización no relacionadas con las proteínas Rho, por ejemplo, la activación de la fosfolipasa D1 (PLD1), que se da por el aumento de PIP₂, y una vez activa PLD1 hidroliza a la fosfatidilcolina (PC) para producir ácido fosfatídico (PA), el cual

es necesario para la polimerización de la actina (Breitbart et al., 2005; Ickowicz et al., 2012; Shabtay and Breitbart, 2016; Breitbart and Finkelstein, 2018). Otro miembro propuesto para esta vía es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que estimula las vías de señalización relacionadas con PI3K/ARF/PI4K y PLC/PKC, las cuales llevarían a la activación de PLD1 (Breitbart and Etkovitz, 2011).

Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2)

El genoma de los espermatozoides está altamente compactado, por lo que son transcripcional y traduccionalmente inactivos (Engel et al., 1973). En la ausencia de la síntesis de proteínas, la funcionalidad de esta célula depende de modificaciones post-traduccionales de sus proteínas dirigidas por vías de señalización (Nixon et al., 2010).

Entre las vías señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) más estudiadas se encuentra la vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), la cinasa ERK1 (MAPK3) tiene un peso molecular de 44 kDa, mientras que ERK2 (MAPK1) tiene un peso de 42 kDa (Cargnello and Roux, 2011). En las células somáticas, ERK1/2 son activadas en respuesta a diferentes factores como son: el factor de crecimiento derivado de placenta (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), la insulina, por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), citosinas, estrés osmótico y desorganización de los microtúbulos (Cargnello and Roux, 2011; Roskoski, 2012).

La cascada de señalización de ERK1/2 incluye a las proteínas adaptadoras Shc y Grb2, al factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) SOS, a las GTPasas pequeñas de la familia Ras o Rho como Rap y Ras, a la MAP3K Raf (Ser/Thr), a la MAP2K MEK1/2 (Ser/Thr y Tyr), y finalmente a las MAPK ERK1/2 (Ser/Thr) (de Lamirande and Gagnon, 2002; Nixon et al., 2010). La activación en cascada de esta vía puede durar entre 20 min de manera transitoria y hasta 2 o 3 horas de manera sostenida (Wortzel and Seger, 2011). Considerando que la acción de la mayoría de las MAPKs se dirige principalmente hacia la activación de factores de transcripción, ERK1/2 también

pueden desencadenar eventos citoplasmáticos, a través de la fosforilación de distintas proteínas.

ERK1/2 y el citoesqueleto de actina

ERK1/2 pueden mediar la remodelación del citoesqueleto de actina y/o la formación de nuevos filamentos de actina, a través de la fosforilación directa o indirecta de proteínas de unión a la actina (Huang et al., 2004; Kelley et al., 2010; Tanimura and Takeda, 2017). Se ha reportado que en células somáticas, ERK1/2 pueden fosforilar tanto a paxilina como a FAK, mediando de esta manera su unión (Hunger-Glaser et al., 2003; Yoon and Seger, 2006; Dobkin-Bekman et al., 2009; Zheng et al., 2009). Por otro lado, se ha reportado que la inhibición de ERK1/2 reduce significativamente la activación de RhoA y con ello, la actividad de la vía ROCK/LIMK. LIMK regula la actividad de cofilina, que dependiendo de su estado de fosforilación, interviene en los procesos de polimerización y despolimerización de la actina (Xiao et al., 2015). Curiosamente, también se sabe que ERK1/2 pueden estar regulando la activación de RhoA a través de la fosforilación del GEF-H1 en su residuo Thr678. Esta fosforilación mejora la actividad del GEF-H1 y es un requerimiento previo para la activación de RhoA (Fujishiro et al., 2008; Waheed et al., 2013), ya que este GEF también puede regular la activación de Rac1, pero para ello requiere la fosforilación en el residuo Ser885 (Waheed et al., 2013).

ERK1/2 en los espermatozoides de los mamíferos

ERK1/2 han sido localizadas en espermatozoides de mamíferos, tanto en la cabeza (Luconi et al., 1998a; Luconi et al., 1998b) como en el flagelo (Almog et al., 2008; Nixon et al., 2010). Además, los elementos centrales en esta vía: Shc, Grb2, RAS, RAF1, MEK y ERK1/2 han sido encontrados en espermatozoides de ratón, cerdo y seres humanos (de Lamirande and Gagnon, 2002; Awda and Buhr, 2010; Nixon et al., 2010). En espermatozoides de ratón, se ha reportado la activación máxima de ERK1/2 después de 10 min de incubación en un medio capacitante (Jaldety and Breitbart, 2015). Durante la capacitación, se les ha relacionado a ERK1/2 en la regulación de la fosforilación de los residuos de tirosina (de Lamirande and Gagnon, 2002; O'Flaherty et al., 2005; 2006a;

2006b; Luna et al., 2012), aunque no se ha observado que tengan una participación directa en la vía de AMPc/PKA/TPK (Luna et al., 2012). ERK1/2, también se les relaciona con la regulación de la fosforilación de tirosinas de superficie, las cuales se relacionan con la interacción espermatozoide-zona pelúcida (Nixon et al., 2010).

Por otro lado, la inhibición de la vía ha mostrado la inhibición de la RA inducida por: ZP, ionóforo de calcio A23187 (du Plessis et al., 2001; Almog et al., 2008; du Plessis et al., 2010), lisofosfatidilcolina (de Lamirande and Gagnon, 2002) o por progesterona (Luconi et al., 1998b). Los hallazgos sugirieron que ERK1/2 están involucradas en la RA, a través de tres posibles vías: 1) mediante la regulación del flujo de Ca^{2+} que conduce a la RA (Jaldety and Breitbart, 2015); 2) a través de la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2), la cual media la liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos importantes para la fusión de las membranas durante la RA (Chen et al., 2005); y 3) por la fosforilación de los motivos treonina-glutámico-tirosina (Thr-Glu-Tyr) que se producen 15 min después de inducir la RA (Liguori et al., 2005). En todos los casos, estos efectos fueron inhibidos por U0126 y PD098059, antagonistas específicos de MEK1/2, cinasas que activan a ERK1/2.

La identidad del ligando fisiológico y el receptor responsable de la activación de la vía de ERK1/2 en el espermatozoide sigue siendo controversial. Se han detectado receptores en los espermatozoides de los mamíferos que pudieran estar relacionados con dicha activación, incluyendo: el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1R y IGF2R), el receptor de adenosina A1 y su señalización por sus proteínas Gq/11 y Gai2 acopladas (Minelli et al., 2008) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Lax et al., 1994; Naz and Padman, 1999; Cotton et al., 2006; Luna et al., 2012; Jaldety and Breitbart, 2015). Además, la progesterona se ha propuesto como el ligando natural que podría participar en la activación de la vía de ERK1/2, ya que esta hormona induce la activación de ERK1/2 (Luconi et al., 1998b). Otras hormonas que se han sugerido participan en la activación de ERK1/2 es el estradiol, la testosterona o 4-androsteno-3,17-diona (precursor del estradiol) (Aquila et al., 2003), el 17β -estradiol activando a los receptores de estrógenos α y β (Aquila et al., 2003), la leptina (Aquila et al., 2008) y la melatonina

(Espino et al., 2011). Cabe mencionar que a todas estas hormonas se les ha relacionado con la supervivencia de los espermatozoides.

Sin embargo, a pesar de estas investigaciones, se desconoce si estos receptores y ligandos están relacionados con la activación de ERK1/2 que se da *in vitro* en los espermatozoides durante su incubación en un medio capacitante.

Cinasa de adhesión focal (FAK)

La cinasa de adhesiones focales (FAK), también conocida como proteína tirosina cinasa 2 (PTK2), es una proteína de 125 kDa que no tiene un receptor tirosina cinasa conocido, desempeña un papel integral en el ensamble de adhesiones focales, además juega un papel central en la señalización por integrinas que se da por la adhesión célula-matriz extracelular y es importante en la transmisión de señales celulares funcionando como andamio para otras proteínas (Franchini, 2012). Se sabe que la ruta de activación clásica de FAK implica su asociación con la integrina $\beta 1$ o $\beta 3$, cuando la integrina se une a una proteína de matriz extracelular como la fibronectina (FNT) expone los péptidos trancos del dominio citoplasmático en donde FAK se une, enseguida FAK experimenta un cambio conformacional, se autofosforila en Tyr397 y se activa (Schaller et al., 1994; Cooper et al., 2003). Adicionalmente, varios estudios en células somáticas sugieren que FAK después de su activación, es fosforilada en Tyr925 por cinasas de la familia Src. Esta fosforilación induce el reclutamiento de Grb2-SOS (Hall et al., 2011; Lu and Rounds, 2012), lo que conduce a la activación de la GTPasa Ras y como consecuencia la subsecuente activación de la vía Raf1/MEK/ERK1/2 (Renshaw et al., 1999). Este antecedente sugiere que esta vía podría ser un fuerte candidato en la activación de ERK1/2 en espermatozoides.

La presencia de FAK en los espermatozoides de mamíferos es poco conocida, existen evidencias de la cinasa relacionada con FAK PyK2 (PTK2B), la cual ha sido relacionada con la regulación de la fosforilación de proteínas durante la capacitación de espermatozoides de seres humanos, bovino y caballo a través de la activación de la cinasa dependiente de calmodulina II (CaMKII) (Gonzalez-Fernandez et al., 2013; Battistone et al., 2014; Rotfeld et al., 2014).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Se ha reportado la presencia de FNT en la superficie celular de los espermatozoides de mamíferos (Koehler et al., 1980; Vuento et al., 1984; Glander et al., 1987; Fusi and Bronson, 1992; Miranda and Tezon, 1992; Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005b; Thys et al., 2009). La cual es el ligando de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, y su presencia también se han reportado en espermatozoides de diferentes especies de mamíferos (Barraud-Lange et al., 2007; Thys et al., 2009; Boissonnas et al., 2010). Además, como ya mencionamos anteriormente están involucradas en la activación de FAK (Schaller et al., 1994; Cooper et al., 2003).

Además, resultados de nuestro laboratorio mostraron la presencia de FAK en espermatozoides de seres humanos, ratón y cobayo, el cual se activa por autofosforilación en el residuo Tyr397 durante la capacitación (Roa-Espitia et al., 2016). Resulta interesante, que el inhibir a FAK tiene importantes efectos sobre los espermatozoides: induce la RA de manera dependiente de Ca^{2+} extracelular y no permite la polimerización de la actina durante la capacitación (Roa-Espitia et al., 2016). Nuestro grupo además demostró que FAK está asociada con la integrina- $\beta 1$ en espermatozoides de cobayo (Roa-Espitia et al., 2016).

También hemos observado que ERK1/2 están en espermatozoides de cobayo y detectamos que la isoforma con mayor presencia es ERK2, mientras que ERK1 se encontró en menor cantidad (Salgado-Lucio, 2014). Encontramos que ERK2 se activa a tiempos tempranos durante la capacitación, llegando a su pico máximo a los 10 min (Salgado-Lucio, 2014), de igual manera como lo han reportado para otras especies (Jaldety and Breitbart, 2015). Observamos además, mediante el ensayo de clortetraciclina y la inhibición de ERK1/2 (por el inhibidor específico FR180204) que ERK1/2 participan en la RA espontánea pero no en la capacitación (Salgado-Lucio, 2014). Por otro lado, resultados de nuestro laboratorio por dos diferentes técnicas

sugieren que la vía de activación de ERK2 es a través de FAK, ya que la inhibición de FAK no permite la activación de ERK2 (Salgado-Lucio, 2014).

Además, obtuvimos evidencia que sugiere que RhoA participa en la polimerización de la actina, ya que su inhibición bloquea la polimerización de ésta y la inhibición de la cinasa de Rho (ROCK1) un efector de RhoA, también inhibe la polimerización de la actina (Reyes-Miguel, 2013). En conjunto estos datos apoyan la existencia de una vía de señalización regulada por FAK que regula la polimerización de la actina durante la capacitación, en la que interviene RhoA/ROCK1.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales procesos que ocurren durante la capacitación es la polimerización de actina, pero se sabe poco acerca de cómo se regula este proceso. Además, se desconoce cuál es el ligando y el receptor responsable de la activación de la vía de ERK1/2 en los espermatozoides de mamíferos incubados en condiciones capacitante. Adicionalmente la vía de ERK1/2 podría estar participando en la regulación de la polimerización del citoesqueleto de actina que se da durante la capacitación probablemente al activar a un GEF de RhoA como el GEF-H1.

HIPOTESIS

Proponemos que probablemente fibronectina/integrina/FAK/ERK2/RhoA es una de las vías responsables en la regulación de la polimerización de actina. Sugerimos que debido a que algunas especies de mamíferos forman rosetas interactuando entre sí a través de la cabeza, esta interacción podría darse a través de la unión integrina-fibronectina. Además, esta interacción es una buena candidata como posible vía de activación de ERK2, la cual llevaría a la activación de RhoA y finalmente a la participación en la polimerización del citoesqueleto de actina.

OBJETIVO GENERAL

Investigar la vía de señalización, tanto río arriba como río abajo, que relaciona a la cinasa de adhesiones focales (FAK) y a las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) con la polimerización de actina durante la capacitación.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la participación de ERK1/2 en la RA inducida por progesterona en espermatozoides de cobayo.
2. Comprobar si ERK1/2 participan en la capacitación.
3. Definir si ERK1/2 participan en la polimerización de actina.
4. Determinar la presencia de FNT asociada a la membrana plasmática de los espermatozoides de cobayo.
5. Determinar si la interacción fibronectina-integrina β 1 participa en la formación de las rosetas durante la capacitación.
6. Determinar si las integrinas participan en la activación de ERK1/2.
7. Corroborar la participación de FAK en la activación de ERK1/2.
8. Determinar la presencia del GEF-H1 en espermatozoides de cobayo y su relación con FAK y ERK1/2.
9. Definir la participación del GEF-H1 en la activación de RhoA.
10. Confirmar la participación de RhoA en la polimerización de actina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Piruvato de sodio, ácido láctico, DL-ditiotreitol, Triton X-100, yodoacetamida, benzamidina, aprotinina, pepstatina, paminobenzamidina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, (PMSF), Trizma base, ortovanadato de sodio, floruro de sodio y el inhibidor de PKA Rp-cAMPS sal de trietilamonio (A165), fueron comprados de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El cóctel de inhibidor de proteasas (tabletas Complete™) se obtuvo de Roche Diagnostics y Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania). Las membranas de nitrocelulosa, acrilamida, N'-metileno-bisacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). El reactivo de quimioluminiscencia mejorada (ECL) se adquirió de Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido) o Millipore (Billerica, MA). Clorhidrato de clortetraciclina (CTC) (C-4881) se obtuvo de Sigma-Aldrich. El inhibidor de ERK1/2 FR180204 (sc203945), el inhibidor de MEK1/2 PD98059 (sc-3535A) y el inhibidor de FAK 14 (sc-203950) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). El inhibidor de Rho C3 (CT04) se adquirió de Cytoskeleton Inc. El inhibidor de FAK PF573228 (3239) se obtuvo de Tocris Bioscience (Bristol, BS11, Reino Unido).

Anticuerpos

El anti-ERK1/2 (M5670) se obtuvo de Sigma-Aldrich, el anti-p-Tyr-100 (9411S) de Cell Signaling Technology y el Anti-p-Thr (139200) de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Los anticuerpos anti-FAK (sc-551), anti-p-FAK-Y925 (sc-11766), anti-Grb2 (sc-255), anti-Flot2 (sc-28320) y anti-p-ERK1/2 (sc7383) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). El anti-GEF H1 (GTX125893) se obtuvo de Gene Tex, Inc. (Irvine, USA) y el anti-RhoA (ab68826) de Abcam (Cambridge, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP), rodamina (TRITC) o fluoresceína (FITC) se obtuvieron de Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (West Grove, PA). El anticuerpo anti-utrofina 71 (Up71) fue amablemente donado por el Dr. Dominique Mornet, del INSERM U592 (París, Francia).

El anticuerpo anti-fibronectina (anti-FNT) se elaboró en el laboratorio 51 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

Animales

Los cobayos (*Cavia porcellus*) machos Dunkin-Hartley que pesaban entre 800-1000 g se obtuvieron del bioterio del Cinvestav-IPN. Todos los experimentos con animales y procedimientos de manejo fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de CINVESTAV-IPN (CICUAL No. 0122-14), siguiendo las pautas de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Así como las normas de la asociación americana de medicina veterinaria. Se hizo todo lo posible para minimizar el potencial dolor, estrés o angustia de los animales.

Capacitación de los espermatozoides

La capacitación se realizó según lo descrito por Rogers y Yanagimachi (1975). Los espermatozoides se obtuvieron a partir del conducto deferente y la cola del epidídimo de los cobayos y después se lavaron en PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM y Na₂HPO₄ 8.1 mM) pH 7.4. Los espermatozoides se capacitaron a una dilución de 35 x 10⁶ células/ml en medio mínimo de cultivo (MCM-PL) que contenía: NaCl 105.9 mM, CaCl₂ 1.71 mM, NaHCO₃ 5.07 mM, piruvato de sodio 0.25 mM, DL-ácido láctico 85% 20 mM, pH 7.8 y fueron incubados a 37°C. La capacitación se llevó a cabo durante distintos tiempos, los cuales se describe en los pies de figura. Los espermatozoides también se capacitaron en presencia de diferentes inhibidores (PF573228 (5 µM) o inhibidor FAK 14 (5 µM) inhibidores de FAK, PD98059 (50 µM) inhibidor de MEK1/2, FR180204 (10 µM) inhibidos de ERK1/2, C3 (1 µg/mL) inhibidor de RhoA o Rp-cAMPS (500 µM) inhibidor de PKA, estos fármacos se agregaron desde el inicio de la capacitación. Cualquier cambio se indica en los pies de figura.

Ensayo de fluorescencia con la clortetraciclina (CTC)

Este procedimiento, descrito por primera vez por Ward y Storey (1984) (Ward and Storey, 1984), se modificó para los espermatozoides de cobayo (Maldonado-Garcia et al., 2017). La RA se indujo fisiológicamente en ausencia o presencia del inhibidor FR180204, y durante la capacitación, los espermatozoides se incubaron con progesterona (4-Pregnene-3,20-dione, 10 μ M) por 20 min antes de realizar el ensayo con CTC. En el momento del ensayo, se mezcló 45 μ l de la suspensión de espermatozoides no capacitada o capacitada por 90 min en ausencia o en presencia del inhibidor FR180204 con 45 μ l de solución de CTC (CTC 750 mM en NaCl 130 mM, cisteína 5 mM, TRIS 20 mM, pH 7.8) y se incubó durante 20 s a 37°C. Inmediatamente después de la incubación, las suspensiones de espermatozoides-CTC se fijaron a temperatura ambiente con 0.75 μ l de glutaraldehído (12.5%) en TRIS 1M (pH 7.4) para obtener una concentración final 0.1% de glutaraldehído y 0.5 Mm de TRIS. TRIS 0.5 mM (pH 7.4). Una muestra de 10 μ l de la suspensión espermática-CTC se colocó en un portaobjeto de vidrio, se cubrió con un cubreobjetos, se selló adecuadamente y se almacenó durante 48 h a 4°C para eliminar la fluorescencia de fondo. La solución de CTC se mantuvo en un recipiente protegido de la luz a 4°C en todo momento. Todas las imágenes de fluorescencia se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX5) usando para registrar las imágenes el software Nis-Element 3.1. Quinientos espermatozoides por muestra se clasificaron como que expresaban uno de los tres patrones de tinción de CTC: Patrón F: no capacitados, espermatozoides con el acrosoma intacto con una fluorescencia tenue en la región del acrosomal; Patrón B: capacitados, espermatozoides con el acrosoma intacto con fluorescencia brillante en la región acrosomal y a lo largo del segmento ecuatorial; Patrón AR: RA fisiológica, espermatozoides sin acrosoma con fluorescencia en la región post-acrosomal y el segmento ecuatorial (excitación CTC a 330-380 nm, emisión a 420 nm).

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta

A muestras de espermatozoides en suspensión no capacitados y capacitados en presencia o ausencia de algún inhibidor se les adicionó una solución fijadora (PBS con

formaldehído al 3% v/v y glutaraldehído al 0.2% v/v) en una proporción 1:1 para obtener con una concentración final de formaldehído al 1.5% (v/v) y glutaraldehído al 0.1% (v/v). Después de una hora de fijación, los espermatozoides se recogieron por centrifugación (600 g durante 3 min). Los espermatozoides sedimentados se incubaron en NH₄Cl 50 mM (diluido en PBS) durante 15 min, se hicieron dos lavados con PBS y finalmente se suspendieron con agua bi-destilada. Se prepararon frotis en portaobjetos usando esta suspensión, se secaron al aire a temperatura ambiente durante 48 h y se almacenaron a 4°C.

Los espermatozoides en los frotis se permeabilizaron en PBS-Tritón 0.1% durante 20 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo PBS con 1% de BSA: ERK (1:100), p-ERK (1:50), FAK (1:50), Grb2 (1:50), Flot2 (1:50) y GEF-H1 (1:50), y se aplicaron sobre las células y se incubaron en los portaobjetos durante toda la noche a temperatura ambiente, en una cámara húmeda y protegidos de la luz, después los portaobjetos se lavaron con PBS, enseguida los portaobjetos se incubaron durante 2 h en cámara húmeda, protegidos de la luz a 37°C con el anticuerpo secundario conjugado con TRITC o FITC (1:50) diluido en solución de bloqueo. Las muestras se montaron con cubreobjetos de vidrio utilizando Gelvatol, se sellaron adecuadamente y se almacenaron a -20°C hasta su observación. La presencia de FNT en las superficies de los espermatozoides se determinó mediante el procedimiento mencionado anteriormente, excepto que los espermatozoides no se permeabilizaron después de la fijación y se trataron directamente con el anticuerpo FNT (1:100) diluido en solución de bloqueo. Finalmente, se tomaron imágenes de las células teñidas con un microscopio confocal (Leica TCS SP8) y se analizaron utilizando el software de imágenes LAS AF Lite (Ver. 2.6.3).

Ensayo de Western blot (WB)

Los espermatozoides no capacitados y capacitados en diferentes tiempos en presencia o ausencia de algún inhibidor se centrifugaron a 600 x g durante 3 min y se suspendieron en una solución tampón RIPA (TRIS-HCl 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1% y SDS al 0.1%), suplementado con inhibidores

de proteasas (5 mg/ml inhibidor de tripsina, 100 mg/ml de benzamidina, 30 mg/ml de pepstatina, 30 mg/ml de leupeptina, 30 mg/ml de aprotinina, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM (PMSF) diluido en dimetilsulfóxido, 20 mg/ml de yodoacetamida, orovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 10 mM, glicerol al 10%, cóctel de inhibidores de proteasas al 2.5% [1 tableta diluida en 1 ml de H₂O]). Las muestras se incubaron durante 20 min en hielo y se centrifugaron a 5000 x g durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron y la concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Después, las muestras fueron hervidas durante 7 min en la solución tampón para muestra de Laemmli pH 7 (Laemmli, 1970) y se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10%. Después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979) y se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS con Triton al 1% (pH 7.4). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: anti-ERK1/2 (1:5000), anti-p-ERK1/2 (1:250), anti-FAK (1:250), anti-p-FAK-Tyr925 (1:250), anti-GEF H1 (1:500), anti-Grb2 (1:250) y anti RhoA (1:500) diluidos en PBS-Tritón al 1% con BSA al 3%, posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS-Tritón al 1% (pH 7.4). Las membranas se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios: anti-conejo conjugado con HRP (1:5000), anti-ratón conjugado con HRP (1:5000), o anti-cabra conjugado con HRP (1:5000). Las membranas de nitrocelulosa se lavaron con Amersham ECL y se expusieron a una película MXB dentro de un casete de autorradiografía o a través del sistema de imágenes Odyssey Fc. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.8.0_112. La carga del gel se normalizó con base a Up71 (1:500).

Fosforilación de las proteínas en tirosinas

Los espermatozoides capacitados a 35×10^6 células/ml en ausencia o presencia del inhibidor de ERK1/2 FR180204, del inhibidor de MEK1/2 PD98059 o el inhibidor de PKA Rp-cAMPS, después de la suspensión de espermatozoides se tomaron 1×10^7 células, se centrifugaron (3000 x g por 2 min) para quitar el medio de capacitación, y se suspendieron en PBS suplementado con inhibidores de fosfatasa (cóctel de inhibidor de proteasa completo [1 tableta diluida en 50 ml de PBS], ortovanadato de sodio 1.0 mM y

genisteína 0.02 mM), se lavó tres veces con la misma solución, finalmente los espermatozoides se suspendieron en la solución tampón para muestra (Laemmli, 1970) sin 2-mercaptoetanol y hervido a 100°C durante 5 min como se describió previamente (Visconti et al., 1995a). Después se centrifugaron a 5000 x g durante 20 min a 6°C, se descartó el sedimento y al sobrenadante se le añadió 2-mercaptoetanol al 5% y se almacenó a -70°C. Cada muestra se hirvió una segunda vez durante 5 min en la solución tampón para muestra, se separó en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). Las membranas se bloquearon usando PBS que contenía 0.1% de Tween-20 y 5% de leche descremada durante 2 h en agitación constante, enseguida las membranas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.1%. Los anticuerpos contra residuos de tirosinas fosforiladas (anti-p-Tyr) se diluyeron (1:2000) en la solución de bloqueo (PBS-Tween 0.1% suplementada con BSA 3%), se añadieron a las membranas y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 5 veces durante 7 min y después se incubaron con el anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP diluido en la solución de bloqueo (1:5000). Las proteínas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando Amersham ECL y se expusieron el sistema de imágenes Odyssey Fc. Se utilizó el análisis densitométrico del programa ImageJ 1.8.0_112, considerando la suma de la densitometría de todas las bandas que aparecen para cada carril. Se usó Up71 para normalizar la carga de gel.

Evaluación de la F-actina

Los espermatozoides no capacitados y capacitados en ausencia o presencia del inhibidor PD98059 o FR180204 se fijaron y se colocaron en portaobjetos como se describió anteriormente en la sección de inmunofluorescencia indirecta. Los frotis de espermatozoides se incubaron durante 60 min a 37°C con faloidina-FITC (1:25) diluida en PBS y se lavaron 5 veces en PBS. Las muestras se montaron con cubreobjetos de vidrio utilizando Gelvatol. Todas las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX5) y se analizó la intensidad de fluorescencia de la región acrosomal de 500 espermatozoides por cada condición, utilizando el software de imágenes NIS-Elements 3.1. La intensidad de fluorescencia de los diferentes tiempos de capacitación (N) se normalizó con respecto a la exhibida por

los espermatozoides no capacitados (N0). La relación N/N0 muestra los cambios que experimenta la actina filamentosa (F-actina) durante la capacitación.

Coinmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación, el anticuerpo anti-GEF-H1 o anti-FAK se unieron a la proteína A/G-agarosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit). Brevemente, 20 µg de cada anticuerpo se acoplaron a 20 µl de la resina de agarosa-proteína A/G, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y después se lavaron para eliminar el exceso de los anticuerpos. EL entrecruzamiento se logró incubando el anticuerpo unido en presencia de DSS 2.5 mM a temperatura ambiente durante 60 min y posteriormente se lavó para eliminar el exceso de anticuerpo no entrecruzado. Los extractos de proteínas de espermatozoides no capacitados, capacitados o capacitados en presencia de inhibidores (PF573228 5 µM, FR180204 10 µM) se obtuvieron como se describe en la sección de ensayo de WB, 500 µg de proteína se incubó con la resina de anticuerpo-A/G-agarosa en agitación constante durante 12 h a 4°C. Las proteínas no unidas al anticuerpo-A/G-agarosa se recuperaron por centrifugación a 4000 x g y después se realizaron 3 lavados con el amortiguador de lavado (Tris 0.025M, NaCl 0.15M, EDTA 0.001M, NP-40 1% y glicerol 5%, pH 7.4). Las proteínas asociadas se eluyeron de la resina incubando con el amortiguador de elución pH 2.8 incubando por 15 min y se recuperaron mediante centrifugación a 4000 x g; se hirvieron en el amortiguador de muestra de Laemmli durante 7 min y se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se describió previamente en la sección ensayo de WB.

Ensayo de activación de RhoA

La actividad de RhoA se determinó mediante un ensayo de *pull-down* (*RhoA Pull-down Activation Assay Biochem Kit, Citoesqueleto*). Se incubaron 300 µg de proteína de espermatozoides no capacitados, capacitados o capacitados en presencia de algún inhibidor (PF573228 5 µM, FR180204 10 µM o 1 µg/mL C3) con Rhotekin-RBD conjugado con perlas de agarosa a 4°C por 60 min. Las proteínas no unidas a la Rhotekin-RBD se

recuperaron por centrifugación a 5000 x g a 4°C durante 3 min y se les agregó el amortiguador para muestra de Laemmli. Por otro lado, las perlas con la proteína RhoA-GTP unida a Rhotekin se lavaron 2 veces con el amortiguador de lavado (Tris 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 30 mM y NaCl 40 mM), luego se suspendieron en el amortiguador para muestra de Laemmli, se hirvieron a 100°C durante 7 min y se sometieron al análisis de inmunotransferencia como se describió previamente en la sección ensayo de WB. La carga del gel se normalizó en base a RhoA total.

Análisis estadístico

Los experimentos se replicaron por lo menos 3 veces. Todos los datos se presentan como la media \pm desviación estándar. Primero se determinó si los datos tenían un comportamiento normal a partir de su distribución en la campana de Gauss. La significancia estadística se analizó mediante la prueba t para las comparaciones entre dos grupos o ANOVA para comparaciones múltiples. Se utilizó SigmaPlot versión 11.0 para el análisis y una $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

ERK1/2 participan en la RA inducida con progesterona

Como ya se mencionó datos obtenidos con anterioridad a través del ensayo de CTC sugieren que la inhibición de ERK1/2 disminuye la RA espontánea. Con el fin de verificar si también afectaba la RA inducida con progesterona, los espermatozoides se capacitaron durante 90 min en ausencia o presencia del inhibidor específico de ERK1/2, FR180204 (10 μ M), y la RA fue inducida durante la capacitación incubando a los espermatozoides en presencia de progesterona 20 min antes del ensayo (10 μ M). Los resultados muestran que la RA inducida con progesterona fue significativamente menor en los espermatozoides capacitados en presencia de FR180204 que en aquellos capacitados en ausencia del inhibidor (Fig. 3). Al parecer, la inhibición de ERK1/2 no afecta la capacitación debido a que el porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B) fue significativamente mayor en los espermatozoides capacitados en presencia de FR180204, en comparación con los capacitados en ausencia de FR180204 (Fig. 3) y además, el porcentaje de espermatozoides no capacitados (patrón F) fue muy similar en ambos casos. Estos datos sugieren que la inhibición de ERK1/2 evita la RA inducida fisiológicamente, pero no la capacitación, como ya habíamos reportado anteriormente.

Para verificar que FR180204 no inhibe la capacitación, evaluamos la distribución de flotilina-2, un marcador de los microdominios de membrana, ya que la redistribución de estos marcadores se ha propuesto como una característica de la capacitación (van Gestel et al., 2005; Gadella and Boerke, 2016; Maldonado-Garcia et al., 2017). Mediante inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo específico que reconoce flotilina-2 (anti-Flot2), observamos dos tipos de patrones de inmunofluorescencia de flotillina-2 en la cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto: un patrón disperso en todo el acrosoma, que es una característica de los espermatozoides no capacitados (P1) y un patrón localizado en la región apical del acrosoma, que es una característica de los espermatozoides capacitados (P2) (Fig. 4A). Los espermatozoides capacitados (60 min) en presencia o ausencia del inhibidor FR180204 mostraron un incremento significativo

del patrón 2 en la organización de flotillin-2 con respecto a los espermatozoides no capacitados (Fig. 4B).

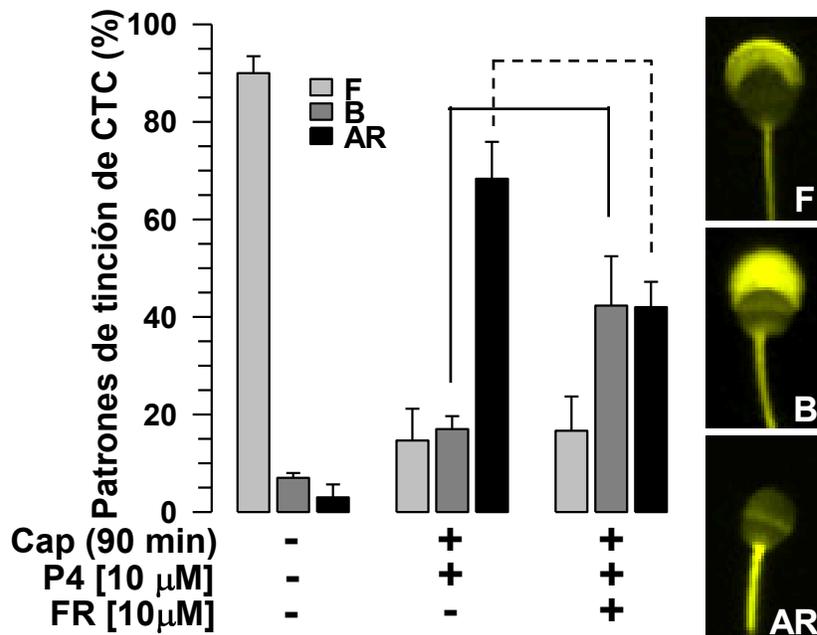


Figura 3. La inhibición de ERK1/2 disminuye la RA inducida con progesterona. Los espermatozoides se capacitaron en ausencia o presencia del inhibidor de ERK1/2, FR180204 (FR) durante 90 min y se indujo la RA fisiológica con progesterona (P4) por 20 min antes de la prueba. Los espermatozoides se tiñeron con CTC y se cuantificó el porcentaje de diferentes patrones (500 células). Los patrones cuantificados fueron: F corresponde a espermatozoides no capacitados, B corresponde a espermatozoides capacitados, AR corresponde a espermatozoides que experimentan reacción acrosomal. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$. Las imágenes del lado derecho corresponden a los tres diferentes patrones de tinción de CTC en los espermatozoides de cobayo después de la capacitación: Patrón F: fluorescencia tenue en la región del acrosoma, característica de células no capacitadas con acrosoma intacto. Patrón B: fluorescencia brillante en las regiones acrosomal y post-acrosomal y una banda a lo largo de la región ecuatorial, característico de las células capacitadas con acrosoma intacto. Patrón AR: fluorescencia brillante en el segmento ecuatorial, característico de las células con reacción acrosomal fisiológica. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

También se analizó el efecto de FR180204 sobre la fosforilación de proteínas en tirosinas (p-Tyr), el cual es considerado como el principal marcador de la capacitación espermática (Visconti et al., 1995a). El análisis del WB muestra un aumento significativo de p-Tyr a los 60 min de capacitación (Fig. 5A, B), este aumento también ocurrió en los espermatozoides capacitado en presencia de FR180204 (10 μM), y se inhibió significativamente cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia de un

inhibidor de la PKA, Rp-cAMPS (Fig. 5A, B). Esto comprueba que ERK1/2 no participan en la p-Tyr durante la capacitación de los espermatozoides de cobayo.

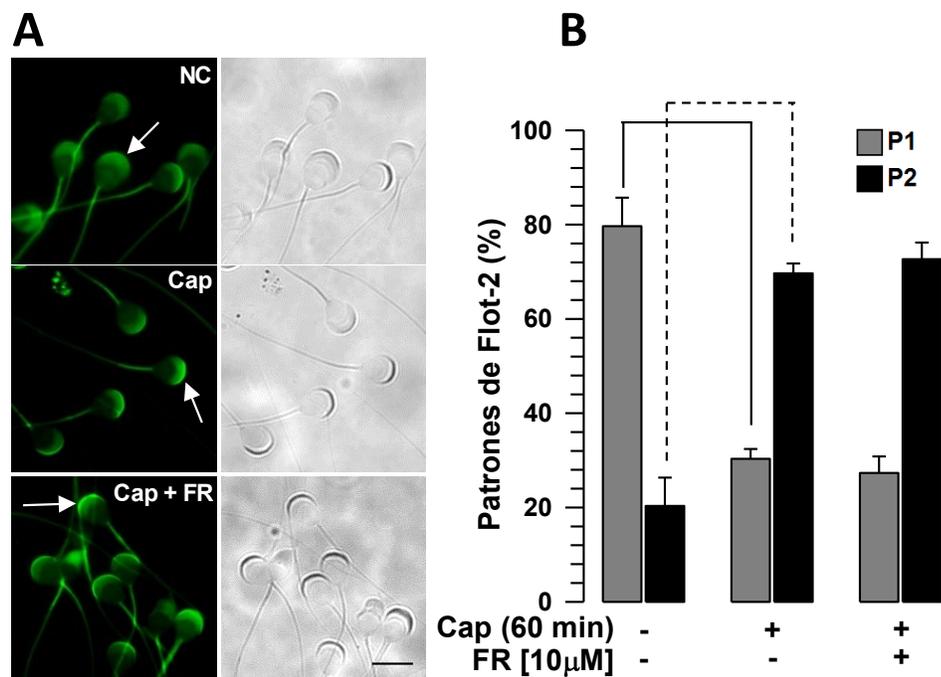


Figura 4. La inhibición de ERK1/2 no afectan la distribución de los microdominios de membrana durante la capacitación. A) Los espermatozoides no capacitados (NC), capacitados durante 60 min (Cap) y capacitados durante 60 min en presencia del inhibidor FR180204 (Cap + FR) se fijaron usando formaldehído-glutaraldehído. Las imágenes a la izquierda muestran la proteína flotilina-2 que se detectó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo anti-Flot2. Las imágenes de la derecha muestran el respectivo campo claro. La flecha en el panel superior indica a Flot2 disperso en toda la región del acrosoma (patrón P1), las flechas en el panel central y el panel inferior indican a Flot2 en la región apical del acrosoma (patrón P2). Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 10 μ m. **B)** Cuantificación de los patrones de localización de la proteína flotilina-2 (100 células) en espermatozoides no capacitados y capacitados (60 min) en ausencia o presencia del inhibidor FR180204 (FR). Los patrones cuantificados fueron: P1 que corresponde a espermatozoides no capacitados; P2 que corresponde a espermatozoides capacitados. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

Para confirmar estos resultados, se utilizó un inhibidor de las cinasas MEK1/2 (PD98059) que activan a ERK1/2 fosforándolas en Tyr204/Thr202 y Tyr185/Thr187, respectivamente (Roskoski, 2012). Los espermatozoides capacitados en presencia de PD98059 (50 μ M) mostraron una fuerte disminución en la fosforilación de ERK1/2 (Fig. 5C, D). Sin embargo, la inhibición de MEK1/2 o ERK1/2 solo produjo una disminución no significativa de p-Tyr (Fig. 5A, B).

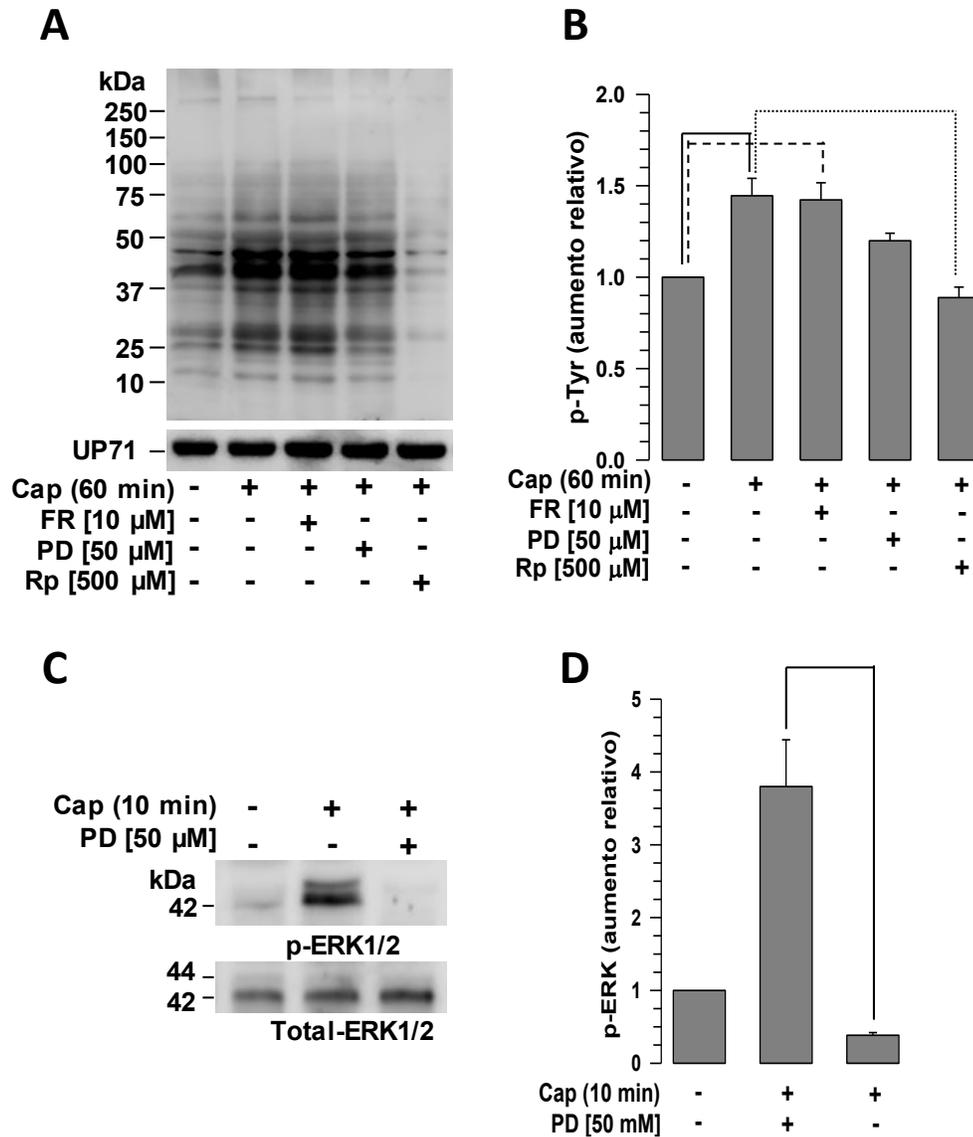


Figura 5. ERK1/2 no participan en la fosforilación de proteínas en Tyr durante la capacitación.

(A) Los espermatozoides se capacitaron durante 60 min (Cap) en ausencia o en presencia de FR180204 (FR), PD98059 (PD) o un inhibidor de PKA Rp-cAMPS (Rp) para la evaluación de la p-Tyr los extractos de espermatozoides (1×10^7 células) se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por WB. Las proteínas se detectaron usando el anticuerpo anti-p-Tyr. Se usó la proteína utrofina de 71 kDa (Up71) para asegurar una carga igual de proteína (panel inferior). **(B)** Densitometría del aumento de la p-Tyr durante la capacitación normalizada con respecto al no capacitado (NC). Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$. **(C)** Los niveles de p-ERK1/2 se determinaron por WB utilizando extractos totales (150 μ g) de espermatozoides no capacitados, capacitados durante 10 min (Cap) y capacitados durante 10 min en presencia del inhibidor MEK1/2 PD98059 (PD). Panel superior: p-ERK1/2 detectado con el anticuerpo anti-p-ERK1/2 (Tyr204). Panel inferior: ERK1/2 total detectado con el anticuerpo anti-ERK1/2. **(D)** Densitometría del aumento relativo de p-ERK1/2 Tyr204/ ERK1/2-total después de 10 min de capacitación, normalizado con respecto a los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

También se probó una concentración más alta de PD98059 (100 μ M) para determinar si era capaz de inhibir significativamente la p-Tyr. Cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia de 100 μ M de PD98059, unos minutos después del inicio de la incubación experimentaron la pérdida del acrosoma y se inmovilizaron, lo que indica que esta concentración de PD98059 es muy tóxica para los espermatozoides de cobayo (datos no mostrados).

ERK1/2 participan en la polimerización de actina que se da en el acrosoma durante la capacitación

La remodelación de los microfilamentos o del citoesqueleto de actina es uno de los principales eventos durante la capacitación (Brener et al., 2003; Roa-Espitia et al., 2016). Por lo tanto, el presente estudio exploró si la inhibición de ERK1/2 afecta la polimerización de la actina utilizando un inhibidor específico de ERK1/2 (FR180204) y un inhibidor indirecto de ERK1/2 (PD98059), el cual inhibe las cinasas MEK1/2 (Fig. 5C, D). Para lograr este objetivo, los espermatozoides se tiñeron con faloidina-FITC que reconoce específicamente los filamentos de actina (F-actina), la fluorescencia emitida fue cuantificada mediante el programa Nis3.1 (ver Métodos). Durante la capacitación, la cantidad de F-actina aumentó de manera constante hasta 60 min de incubación; después de este tiempo, la cantidad disminuyó ligeramente (Fig. 6A, B). Cuando se evaluó la F-actina en los espermatozoides capacitados en presencia del inhibidor FR180204 (10 μ M) o PD98059 (50 μ M), la cantidad aumentó de manera constante hasta los 30 min. Sin embargo, no se alcanzaron los niveles del control ya que la cantidad de F-actina fue significativamente menor a los 60 y 90 min (Fig. 6B). Estos resultados sugieren que ERK1/2 podría estar involucrado en la modulación de la polimerización de la actina durante la capacitación. Un análisis adicional de estos resultados muestra que el nivel de F-actina alcanzado en presencia de inhibidores (FR180204 y PD98059) a los 60 y 90 min de capacitación es aproximadamente 50% menor a los niveles que alcanzan los espermatozoides capacitados en ausencia de los inhibidores, pero significativamente mayor ($P \leq 0.05$) que la mostrada por los espermatozoides no capacitados (Tiempo 0 min); ésta pudiera ser suficiente para que la capacitación se realice con éxito, pero no la RA.

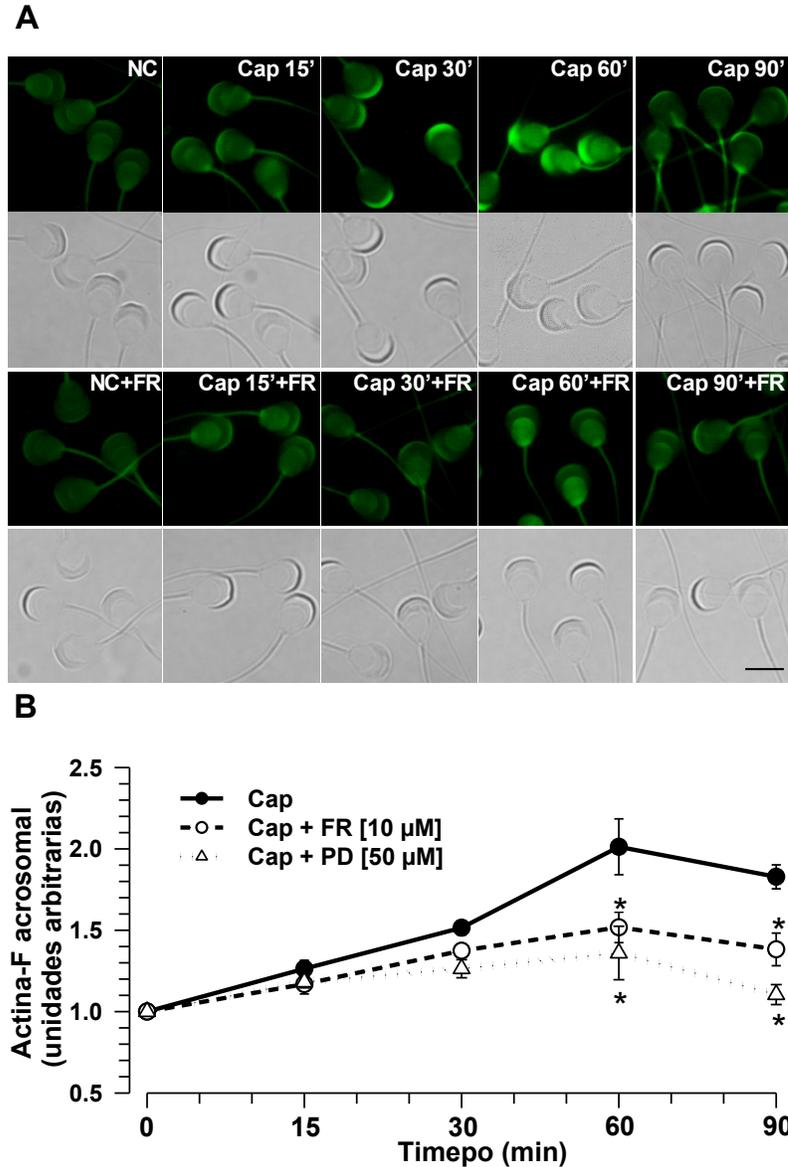


Figura 6. La inhibición de ERK1/2 suprime la polimerización del citoesqueleto de actina durante la capacitación. **A)** Los espermatozoides no capacitados (NC), capacitados (Cap) y capacitados en presencia de FR180204 (Cap+FR) se analizaron por microscopía de epifluorescencia para detectar F-actina usando faloidina-FITC. La primera fila muestra F-actina en espermatozoides capacitados; la tercera fila muestra F-actina en espermatozoides capacitados en presencia de inhibidor ERK1/2 (FR180204). Las imágenes de abajo muestran el respectivo campo claro. Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 10 μ m. **B)** Cuantificación de los niveles de fluorescencia (unidades arbitrarias) de F-actina detectada por faloidina-FITC, normalizada con respecto a niveles de faloidina-FITC de los espermatozoides no capacitados (Tiempo 0 min). La línea sólida con círculos corresponde a los espermatozoides capacitados (Cap), los guiones con círculos vacíos corresponden a los espermatozoides capacitados en presencia de FR180204 (Cap + FR) y la línea punteada con triángulos vacíos corresponden a los espermatozoides capacitados en presencia de PD98059 (Cap + PD). Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. * Datos con diferencias significativas con respecto al control (Cap) $P \leq 0.05$, $n=3$.

La interacción espermatozoide-espermatozoide activa a ERK2

Recientemente se reportó que la cinasa de adhesión focal (FAK) de 125 kDa modula la polimerización de la actina durante la capacitación ya que la inhibición de FAK por PF573228 inhibe este proceso (Roa-Espitia et al., 2016). Ahora sugerimos que la vía de señalización FAK/Grb2/SOS/Ras/MEK podría regular la activación de ERK1/2 ya que como reportamos con anterioridad, la inhibición de FAK inhibe la activación de ERK2 (Salgado-Lucio, 2014). Adicionalmente se sabe que la vía de activación clásica de FAK implica su asociación con las cadenas de integrinas $\beta 1$ o $\beta 3$; cuando se unen a una proteína de matriz extracelular, como la FNT, estas cadenas experimentan un cambio conformacional que permite la autofosforilación de FAK en Tyr397 (Schaller et al., 1994; Cooper et al., 2003). Recientemente, nuestro grupo demostró que FAK está asociado con la integrina $\beta 1$ en los espermatozoides de cobayo (Roa-Espitia et al., 2016).

Además, se ha encontrado FNT en la superficie extracelular de espermatozoides humanos, equinos, porcinos y bovinos (Koehler et al., 1980; Vuento et al., 1984; Glander et al., 1987; Fusi and Bronson, 1992; Miranda and Tezon, 1992; Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005a; Thys et al., 2009). En base a estos datos, proponemos que FAK se activa por la interacción de las cabezas de los espermatozoides durante la capacitación, cuando se forman las rosetas. Dicha interacción tendría lugar a través de unión de las integrinas con FNT, presentes en las superficies de las células espermáticas. Para corroborar esta hipótesis, observamos si los espermatozoides de cobayo expresaron FNT en su superficie. Un anticuerpo anti-FNT mostró a FNT está ubicado en la superficie de la región acrosomal y la pieza media de los espermatozoides de cobayo (Fig. 7A). El análisis de WB determinó que la proteína reconocida por el anti-FNT tenía una movilidad relativa aproximada de 250 kDa, que corresponde a FNT, como se muestra por la FNT purificada del plasma sanguíneo humano utilizado como control (Fig. 7B).

Para determinar si la formación de rosetas dependía de la interacción FNT-integrina, los espermatozoides se capacitaron en ausencia o presencia del tripéptido RGD (100 μ M) o el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (1:25), y se contó el número de rosetas por campo (Fig. 7C).

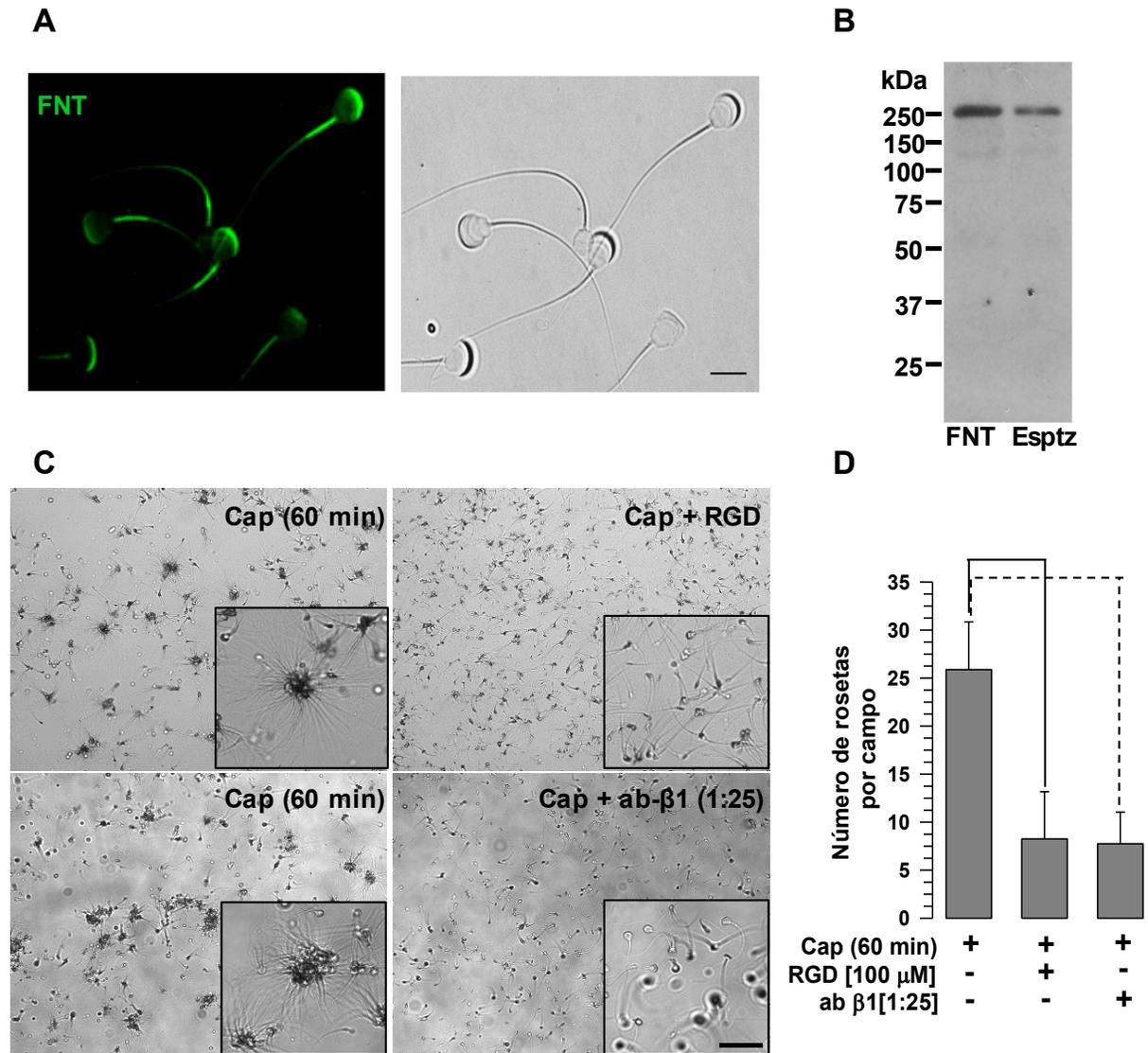


Figura 7. La interacción fibronectina/integrina regula la formación de rosetas en los espermatozoides de cobayo. A) Los espermatozoides se trataron para la localización de FNT mediante ensayo de inmunofluorescencia. La imagen a la izquierda corresponde a la localización de FNT. La imagen de la derecha muestra el respectivo campo claro. Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 10 μm. **B)** FNT purificada a partir de plasma sanguíneo humano (FNT, 50 μg) y extractos de espermatozoides no capacitados (Esptz, 150 μg) se analizaron mediante WB y se detectó la proteína FNT usando un anticuerpo anti-FNT, n=3. **C)** Los espermatozoides se capacitaron durante 60 min (Cap) en ausencia y presencia del tripéptido RGD o el anticuerpo anti-integrina β1 (ab-β1). Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 50 μm. **D)** La formación de rosetas se cuantificó por microscopía óptica. Los datos están expresados como medias ± desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, n=3.

El número promedio de rosetas por campo después de 60 min de capacitación fue significativamente menor en el caso de los espermatozoides capacitados en presencia

del tripéptido RGD o en presencia del anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ (Fig. 7D), lo que sugiere que la formación de las rosetas está mediada por la unión de las integrinas con su ligando, probablemente la FNT. Interesantemente, al capacitarse en presencia del tripéptido RGD, los espermatozoides mostraron una tendencia significativa a aumentar la RA (Fig. 8A), y se observó un efecto similar cuando los espermatozoides se capacitaban en presencia de la FNT (100 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 8B), lo que sugiere que la formación de las rosetas podría evitar una RA espontánea temprana. Finalmente, para determinar la participación de las integrinas en la activación de ERK1/2, los niveles de p-ERK2 se analizaron mediante WB para determinar si la interacción entre RGD y la integrina tuvo algún efecto sobre la activación de ERK1/2 (Fig. 9). Los resultados mostraron un aumento significativo de p-ERK2 en los espermatozoides capacitados en presencia del tripéptido RGD, en comparación con aquellos capacitados en ausencia del tripéptido (Fig. 9A, B). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la vía fibronectina/integrina está asociada a la formación de las rosetas y a la activación de ERK2.

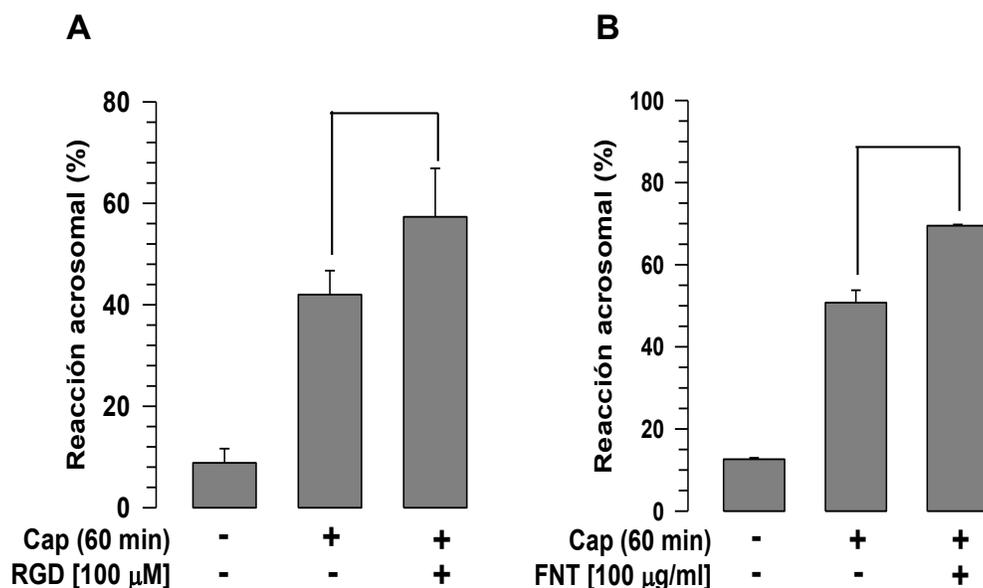


Figura 8. La presencia del tripéptido RGD o la fibronectina durante la capacitación aumenta la RA espontánea. A) Los espermatozoides se capacitaban durante 60 min en ausencia y presencia del tripéptido RGD, y se cuantificó la RA por ensayo de CTC. Los datos están expresados como media \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$. **B)** Los espermatozoides se capacitaban durante 60 min en ausencia y presencia de fibronectina (FNT), y la RA se cuantificó por ensayo CTC. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

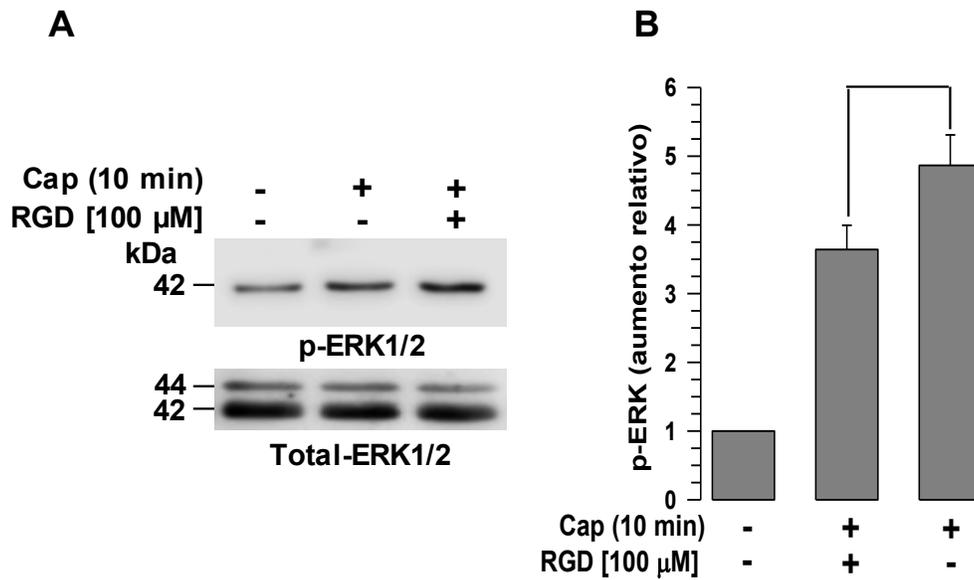


Figura 9. Tripéptido RGD aumenta los niveles de p-ERK2. **A)** Los espermatozoides se capacitaron durante 10 min en ausencia o presencia del tripéptido RGD, y el estado de fosforilación de ERK1/2 se determinó utilizando extractos proteicos (300 μg) de espermatozoides no capacitados, capacitados (Cap 10 min) y capacitados en presencia del tripéptido RGD. Los extractos se analizaron por WB. Panel superior: p-ERK1/2 detectado con el anticuerpo anti-p-ERK (Tyr204). Panel inferior: ERK1/2 total detectado con un anticuerpo anti-ERK1/2. **B)** Densitometría del aumento relativo de p-ERK2/ERK2-total durante la capacitación normalizada con respecto a los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como media \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

FAK activa ERK2 durante la capacitación

Para corroborar nuestra hipótesis, se analizó si la inhibición de FAK tenía un efecto sobre la activación de ERK2, a través de dos diferentes inhibidores: PF573228, el cual se probó con anterioridad (Salgado-Lucio, 2014) y el inhibidor de FAK 14 que se probó aquí. Debido a que ERK2 alcanzó la activación máxima a los 10 min, los espermatozoides se capacitaron durante este tiempo en ausencia o presencia de PF573228 (5 μM) o el inhibidor de FAK 14 (5 μM). Mediante WB, ERK2 se detectó fosforilada en los extractos de los espermatozoides capacitados durante 10 min, sin embargo, esta disminuye significativamente en los espermatozoides no capacitados y en los espermatozoides capacitados en presencia de PF573228 (PF) o del inhibidor de FAK 14 (FAKi14) (Fig. 10A, B).

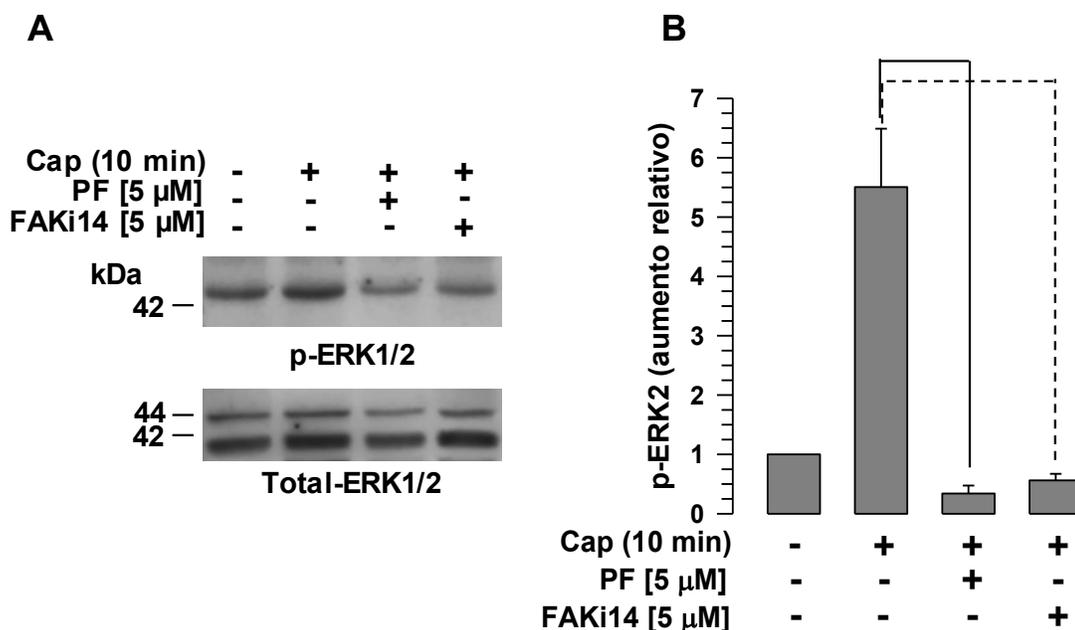


Figura 10. La inhibición de FAK inhibe la activación de ERK2. A) Los niveles de p-ERK1/2 se determinaron mediante WB utilizando extractos totales (300 μ g) de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados durante 10 min (Cap) y capacitados durante 10 min en presencia del inhibidor FAK PF573228 (PF) o inhibidor de FAK 14 (FAKi14). Panel superior: p-ERK1/2 detectado con anticuerpo anti-p-ERK1/2 Tyr204. Panel inferior: ERK1/2 total detectado con un anticuerpo anti-ERK1/2. **B)** Densitometría del aumento relativo de p-ERK1/2 Tyr204/ ERK1/2-total después de 10 min de capacitación, normalizado con respecto a los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$, $n=3$.

La fosforilación de FAK en Tyr925 incrementa durante la capacitación

Por otro lado, como se mencionó en resultados anteriores, la activación de ERK2 se da a los 10 min de la capacitación (Salgado-Lucio, 2014) y que la inhibición de FAK disminuye dicha activación (Fig. 10). Por lo tanto, investigamos la presencia de la fosforilación en Tyr925 de FAK que es indispensable para que FAK active la vía que lleva a la fosforilación de ERK1/2. Los resultados muestran que la fosforilación de FAK en Tyr925 tuvo un nivel basal en los espermatozoides no capacitados y ésta aumentó significativamente en los primeros minutos, hasta los 30 min de la capacitación, disminuyendo después de ese tiempo (Fig. 11A, B). Los resultados anteriores sugieren que FAK podría estar asociada con Grb2 durante la capacitación y, por lo tanto, activar a ERK2.

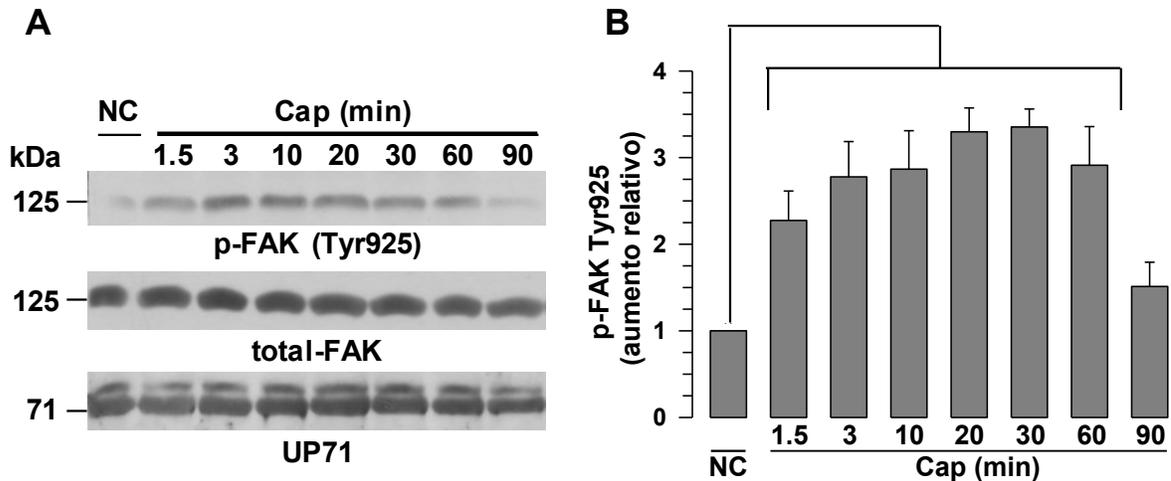


Figura 11. La fosforilación de FAK en Tyr925 aumento durante la capacitación. Para determinar el estado de fosforilación de FAK Tyr925, los extractos de espermatozoides (300 µg) no capacitados (NC) y capacitados (Cap) en los tiempos indicados (1.5-90 min) se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante WB. **A)** Panel superior: p-FAK detectado con el anticuerpo anti-p-FAK (Tyr925). Panel medio: FAK total detectado con el anticuerpo anti-FAK. Panel inferior: se usó Up71 para asegurar una carga de proteínas igual. **B)** Densitometría del aumento relativo de p-FAK Tyr925/ FAK-total durante la capacitación normalizada con respecto al no capacitado. Los datos se expresan como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

Grb2 se asocia con FAK durante la capacitación

Para verificar la participación de FAK en la activación de ERK2 se determinó la interacción de Grb2 con FAK, esto se debe a que Grb2 es una proteína de andamio que conduce a la subsecuente activación de ERK1/2 por la vía de señalización canónica. Observamos la presencia de Grb2 mediante WB, se reveló una banda de proteína a una movilidad relativa de 50 kDa en espermatozoides no capacitados y capacitados (Fig. 12A), lo que corresponde al dímero de Grb2 (Maignan et al., 1995; Lin et al., 2012). Posteriormente FAK se inmunoprecipitó, y el análisis de WB reveló que Grb2 coimmunoprecipitó junto con FAK (Fig. 12B). Un análisis densitométrico mostró que una cantidad significativamente mayor de Grb2 coimmunoprecipita con FAK en espermatozoides capacitados en comparación con espermatozoides no capacitados; dicho aumento fue inhibido por PF573228 (Fig. 12C). Además, se llevaron a cabo ensayos recíprocos y se obtuvieron resultados similares; una cantidad significativamente mayor de FAK coimmunoprecipitado junto con Grb2 en espermatozoides capacitados, en

comparación con espermatozoides no capacitados o capacitados en presencia de PF573228 (Fig. 12D, E).

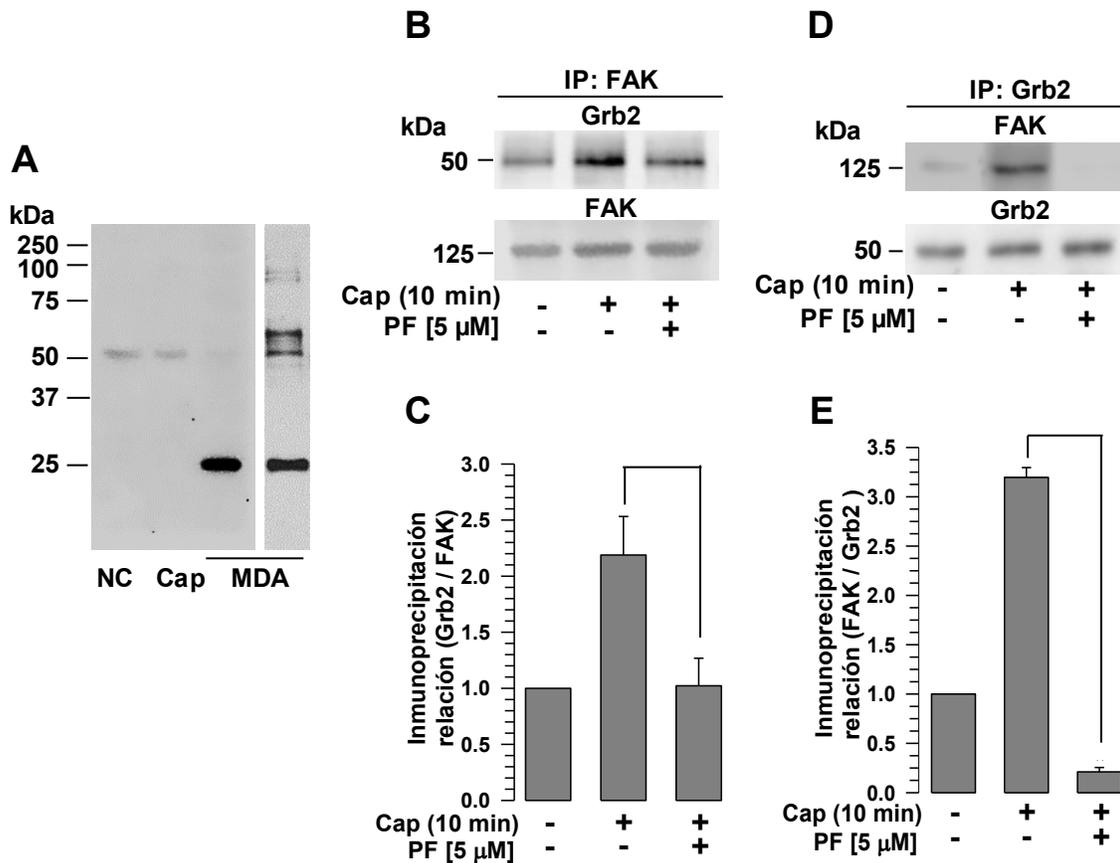


Figura 12. Grb2 se asocia con FAK en los primeros 10 min de la capacitación. **A)** Grb2 se detectó en los extractos de los espermatozoides (150 μg) no capacitados (NC, carril 1) y capacitados durante 60 min (Cap, carril 2), así como en células MDA-MB-231 (50 μg) (MDA, carril 3 y sobreexposición carril 4), los extractos se analizaron mediante WB y la proteína se detectó utilizando anti-Grb2, n=3. **B)** La interacción entre Grb2 y FAK se detectó mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación. Los extractos de espermatozoides no capacitados, capacitados durante 10 min (Cap) y capacitados durante 10 min en presencia del inhibidor de FAK PF573228 (PF) se inmunoprecipitaron usando el anticuerpo anti-FAK y se analizaron mediante WB. Panel superior: Grb2 detectado con un anticuerpo anti-Grb2. Panel inferior: FAK detectado con un anticuerpo anti-FAK. **C)** Densitometría de la relación de inmunoprecipitación Grb2/FAK después de 10 min de capacitación normalizada con respecto los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como medias ± desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, n=3. **D)** La interacción entre FAK y Grb2 se detectó mediante un ensayo de coinmunoprecipitación. Los extractos de los espermatozoides no capacitados, capacitados durante 10 min (Cap) y capacitados durante 10 min en presencia del inhibidor de FAK PF573228 (PF) se inmunoprecipitaron usando el anticuerpo anti-Grb2 y se analizaron mediante WB. Panel superior: FAK detectado con un anticuerpo anti-FAK. Panel inferior: Grb2 detectado con un anticuerpo anti-Grb2. **E)** Densitometría de la relación de inmunoprecipitación FAK/Grb2 después de 10 min de capacitación normalizada con respecto los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como medias ± desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, n=3.

Adicionalmente, la microscopía confocal muestra que tanto FAK como Grb2 se ubican en la región acrosomal y en el flagelo de los espermatozoides no capacitados y capacitados (Fig. 13).

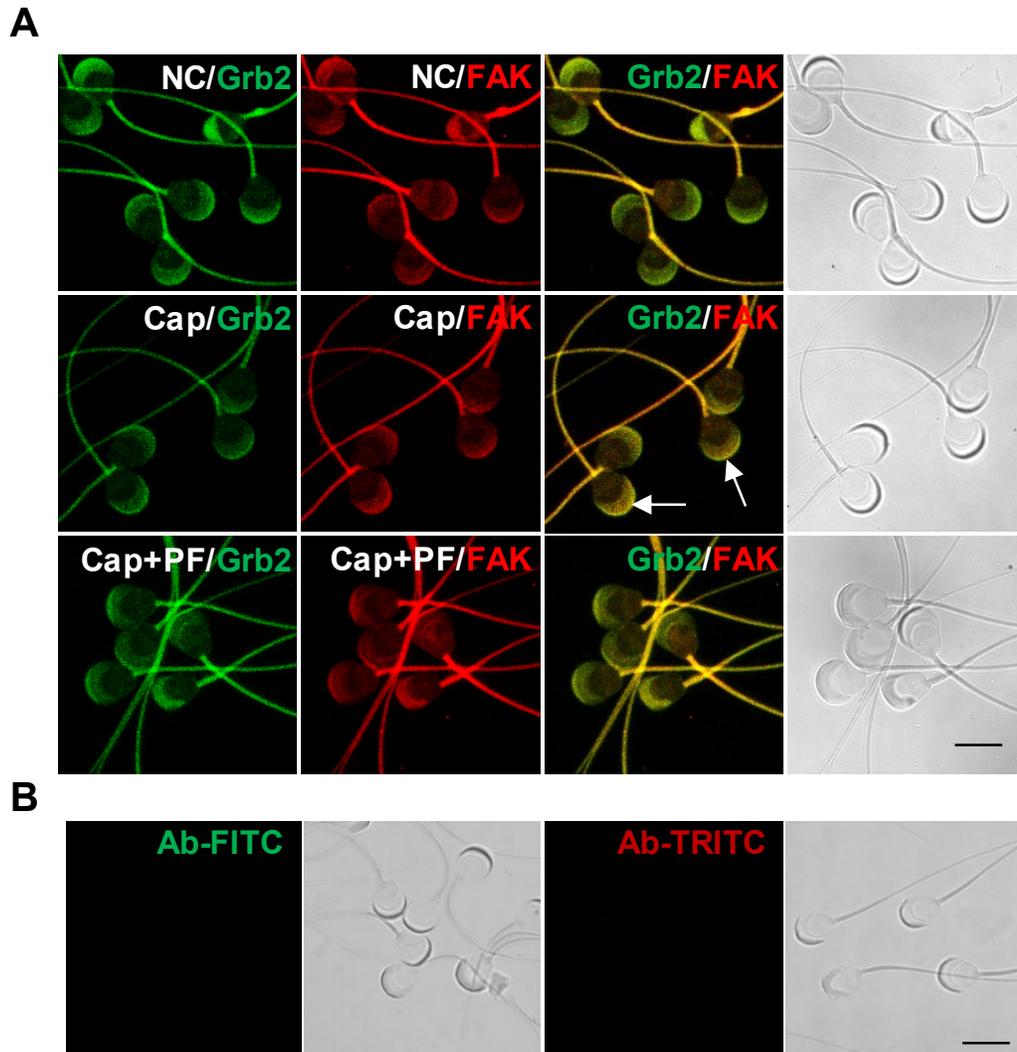


Figura 13. FAK y Grb2 colocalizan a los 10 minutos de capacitación. A) Los espermatozoides no capacitados (NC) (paneles superiores), capacitados (Cap) durante 10 min (paneles centrales) y capacitados en presencia del inhibidor de FAK PF573228 (Cap + PF) durante 10 min (paneles inferiores) se prepararon para el análisis por inmunofluorescencia para evaluar la colocalización de Grb2 y FAK por microscopía confocal. La primera columna muestra la proteína Grb2 visualizada con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde), la segunda columna muestra la proteína FAK visualizada con un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (rojo), la tercera columna muestra la superposición de Grb2 y FAK, y la cuarta columna muestra su respectivo campo claro. Las flechas indican la colocalización de Grb2 y FAK en espermatozoides capacitados (10 min). Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 10 μ m. **B)** Controles de anticuerpos secundarios conjugados con TRITC o FITC. Las imágenes de la derecha muestran el respectivo campo claro. Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 10 μ m.

En los espermatozoides no capacitados, FAK y Grb2 se encontraron colocalizadas fuertemente en todo el flagelo, pero no en la región acrosomal (Fig. 13A). Cuando los espermatozoides se capacitaron durante 10 min, encontramos que FAK y Grb2 colocalizan fuertemente en la región apical del acrosoma y a lo largo de todo el flagelo (Fig. 13A). Sin embargo, cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia de PF573228, la colocalización en la región apical del acrosoma se perdió (Fig. 13A). Estos resultados confirmaron que FAK y Grb2 forman el andamio necesario para que la vía de señalización que lleva a la activación de ERK2 se dé durante la capacitación.

Expresión y activación de GEF-H1 en espermatozoides de cobayo

En las células somáticas, ERK1/2 regulan la polimerización de la actina activado al factor de intercambio de nucleótido guanina H1 (GEF-H1) mediante la fosforilación en Thr678, el cual media la activación de RhoA, (Fujishiro et al., 2008; Waheed et al., 2013). Para saber si FAK y ERK2 regulaban la polimerización de la actina en los espermatozoides de cobayo, se investigó si ERK2 fosforilaba al GEF-H1. Primero, se evaluó la presencia del GEF-H1 mediante WB, en donde se observó una banda con una movilidad relativa de 100 kDa en espermatozoides tanto no capacitados como capacitados (Fig. 14A). Además, por ensayo de inmunofluorescencia indirecta localizamos al GEF-H1 en la región acrosomal y a lo largo del flagelo tanto espermatozoides no capacitados como en los capacitados (Fig. 14B).

Debido a que anticuerpos comerciales que detectan la fosforilación en Thr678 del GEF-H1 no están disponibles actualmente, se aisló el GEF-H1 por inmunoprecipitación y se analizó la fosforilación de treoninas usando un anticuerpo anti-p-Thr. Los resultados muestran una baja fosforilación en Thr del GEF-H1 en los espermatozoides no capacitados (Fig. 15A, B). Cuando se realizó un ensayo similar en los espermatozoides capacitados, la cantidad de fosforilación en residuos Thr aumentó significativamente (Fig. 15A), mientras que una cantidad significativamente menor de fosforilación en residuos Thr se observó en los espermatozoides capacitados en presencia del inhibidor de FAK (PF573228) o del inhibidor de ERK1/2 (FR180204) (Fig. 15A, B). Este resultado sugiere

que FAK y ERK2 están involucrados en la fosforilación que mejora la actividad de GEF-H1 para activar a RhoA.

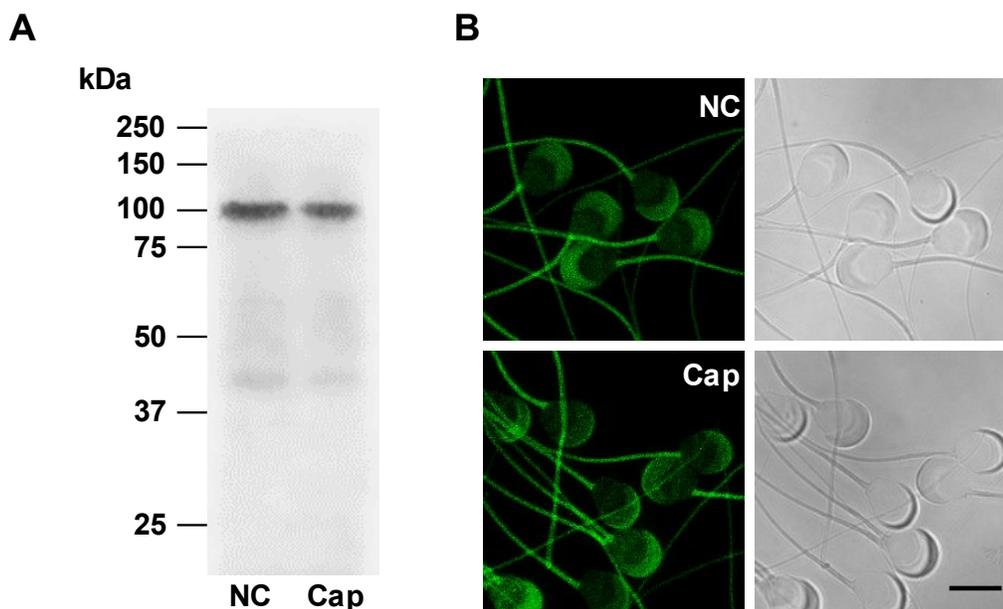


Figura 14. Presencia del GEF-H1 en espermatozoides de cobayo. **A)** La proteína GEF-H1 se detectó en extractos de los espermatozoides de cobayo (300 µg) no capacitados (NC) y capacitados durante 60 min (Cap), los extractos se analizaron mediante WB y se detectó la proteína utilizando anticuerpo anti-GEF-H1, n=3. **B)** Los espermatozoides de cobayo no capacitados (NC) y capacitados durante 60 min (Cap) se fijaron con formaldehído-glutaraldehído y la proteína GEF-H1 se localizó en espermatozoides de cobayo mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Los paneles de la izquierda corresponden a la localización de GEF-H1. Las imágenes de la derecha muestran el respectivo campo claro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra de 10 µm.

Para saber si el GEF-H1 estaba relacionado con RhoA, se aisló el GEF-H1 mediante inmunoprecipitación y después se determinó si RhoA coimmunoprecipitaba con él. Los resultados muestran que en los espermatozoides no capacitados RhoA coimmunoprecipitó con el GEF-H1 en una baja cantidad (Fig. 15C). En los espermatozoides capacitados, la cantidad de RhoA coimmunoprecipitada con el GEF-H1 aumentó significativamente (Fig. 15C). Sin embargo, cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia de PF573228 o FR180204, la cantidad de RhoA coimmunoprecipitada con el GEF-H1 fue significativamente menor que la de los

espermatozoides capacitados (Fig. 15C, D). Este resultado sugiere que GEF-H1 está involucrado en la activación de RhoA.

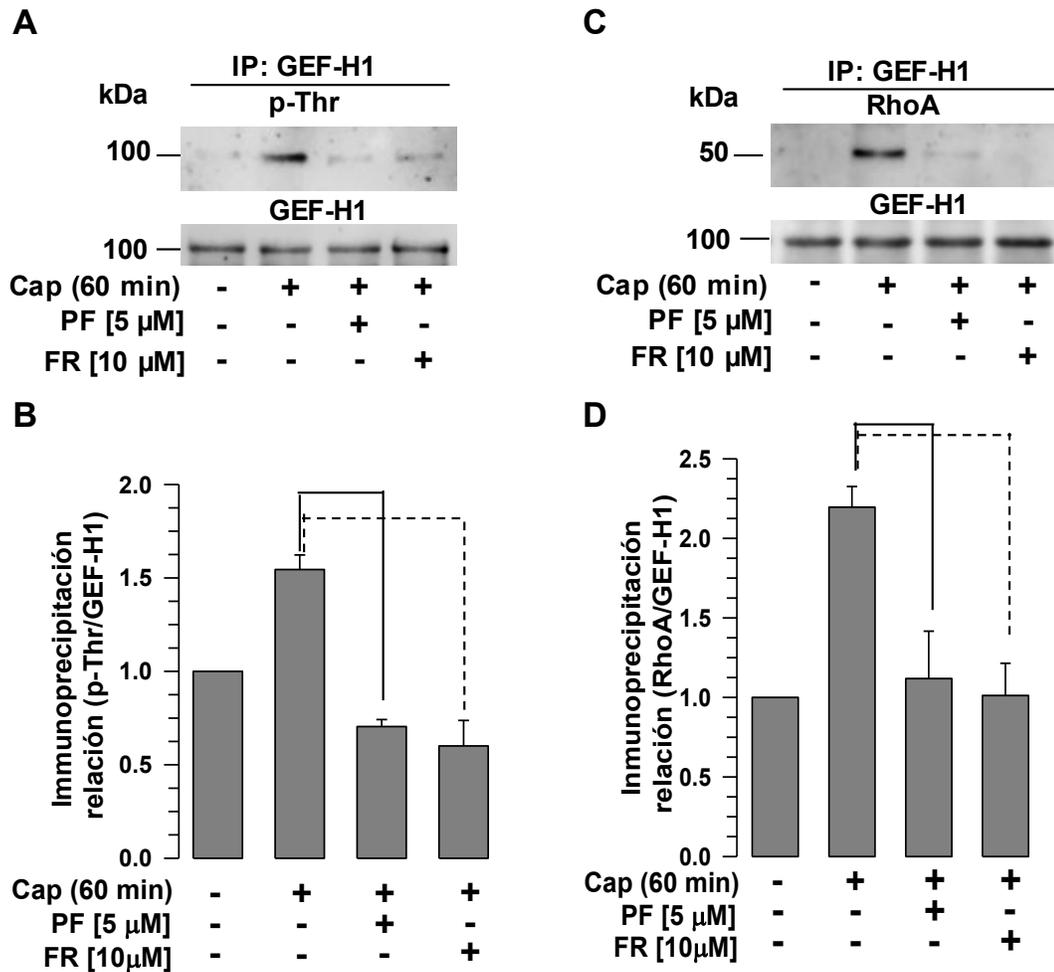


Figura 15. Presencia de p-GEF-H1 y su interacción con RhoA durante la capacitación. A) Estado de fosforilación en treoninas (Thr) del GEF-H1. Los extractos de espermatozoides no capacitados (NC), capacitados 60 min (Cap) y capacitados 60 min en presencia del inhibidor de FAK PF573228 (PF) o del inhibidor de ERK1/2 FR180204 (FR) fueron inmunoprecipitados utilizando el anticuerpo anti-GEF-H1. Las proteínas precipitadas se analizaron mediante WB. Panel superior: p-Thr detectado con el anticuerpo anti-p-Thr. Panel inferior: GEF-H1 detectado con el anticuerpo anti-GEF-H1. **B)** Densitometría de la relación de inmunoprecipitación p-Thr/GEF-H1 normalizada con respecto a los no capacitados. Los datos se expresan como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$. **C)** La interacción de GEF-H1 con RhoA se detectó mediante un ensayo de coimmunoprecipitación, extractos de los espermatozoides no capacitados (NC), capacitados 60 min (Cap), capacitados 60 min en presencia del inhibidor de FAK (PF [5 μ M]) o de ERK1/2 (FR [10 μ M]) se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo anti-GEF-H1. Las proteínas precipitadas se analizaron mediante WB. Panel superior: RhoA detectado con el anticuerpo anti-RhoA. Panel inferior: GEF-H1 detectado con el anticuerpo anti-GEF H1. **D)** Densitometría de la relación de inmunoprecipitación RhoA/GEF-H1 normalizada con respecto a los no capacitados. Los datos se expresan como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

FAK y ERK2 participan en la activación de RhoA durante la capacitación

Para confirmar la participación de FAK y ERK2 en la activación de RhoA, se aisló la forma activa de RhoA (RhoA-GTP) mediante un ensayo de *pull-down*. Los resultados obtenidos mostraron una cantidad significativamente mayor de RhoA-GTP en los espermatozoides capacitados en comparación con los no capacitados (Fig. 16A, C). Durante el transcurso del tiempo de la capacitación, el nivel de RhoA-GTP aumentó desde los primeros minutos (5 min) y alcanzó su punto máximo a los 90 min de capacitación (Fig. 16A). Además, se recuperó una cantidad significativamente baja de RhoA-GTP en los espermatozoides capacitados durante 60 min en presencia de PF573228, PD98059 o FR180204, en comparación con la cantidad recuperada en los espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores (Fig. 16C, D). Como control, los espermatozoides se capacitaron en presencia de la toxina C3, un inhibidor de RhoA (Evans et al., 2004), en donde la cantidad de RhoA-GTP recuperado fue significativamente menor que la recuperada en los espermatozoides capacitados en ausencia de C3 (Fig. 16C, D).

Anteriormente se ha demostrado que RhoA participa en la polimerización de la actina durante la capacitación (Brener et al., 2003; Fiedler et al., 2008; Reyes-Miguel, 2013; Romarowski et al., 2015). Por lo que, adicionalmente se evaluó la cantidad de F-actina basada en los niveles de fluorescencia emitidos por faloidina-FITC. Cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia del inhibidor de RhoA (C3), se observó que la cantidad de F-actina fue menor que cuando los espermatozoides se capacitaron en ausencia del inhibidor de RhoA (Fig. 17).

Todos estos resultados confirman que FAK y ERK2 participan en una de las vías de señalización involucradas en la activación de RhoA, lo que finalmente conduce a la polimerización de actina conformando el citoesqueleto en el acrosoma durante la capacitación.

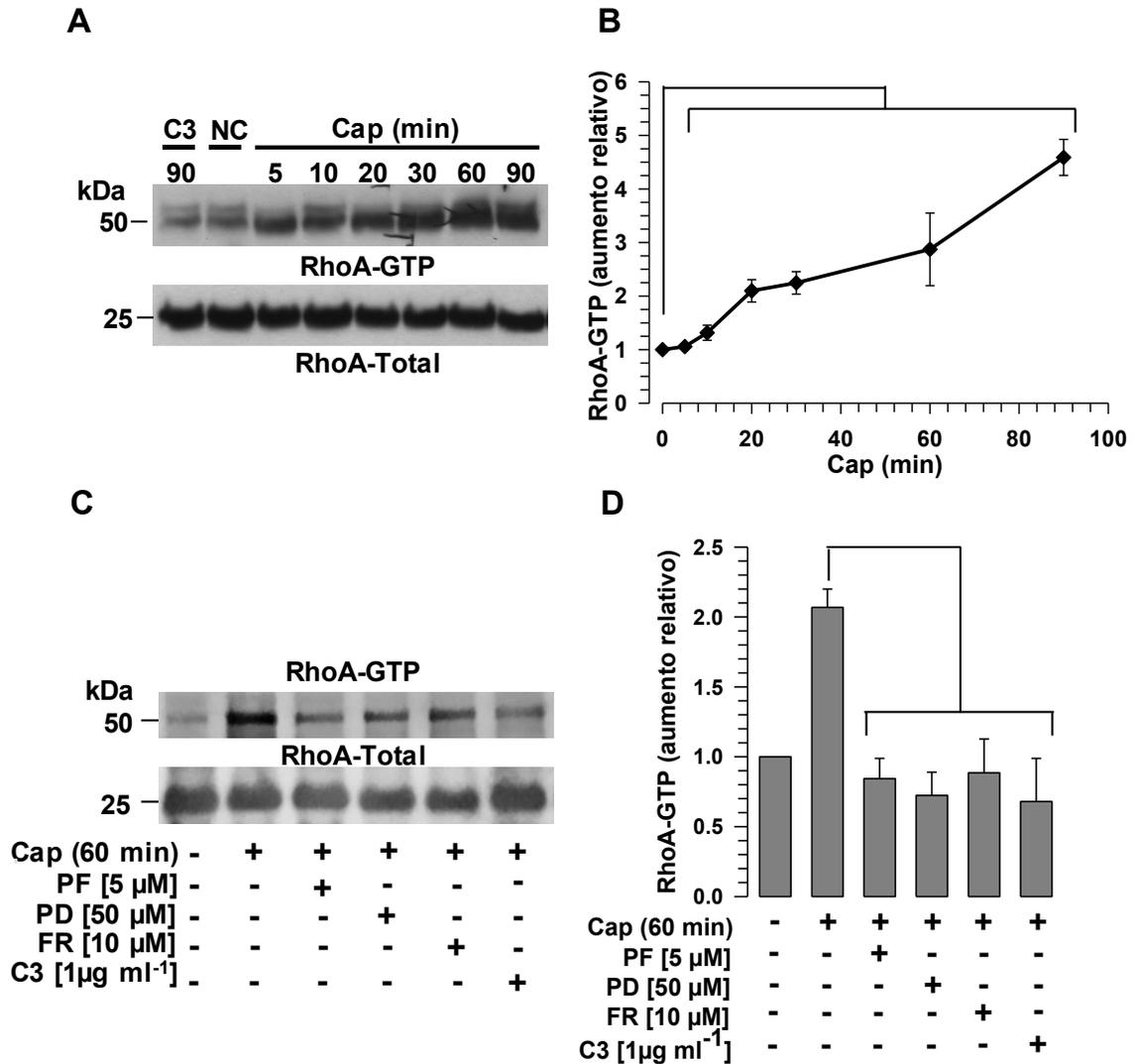


Figura 16. Activación de RhoA a través de FAK y ERK1/2 durante la capacitación. **A)** Se obtuvieron los extractos de los espermatozoides no capacitados, capacitados en diferentes tiempos (5-90 min) y capacitados durante 90 min en presencia del inhibidor de RhoA (C3). RhoA-GTP se aisló de estos extractos mediante un ensayo de *pull-down* utilizando una columna de Rhotekin. Las proteínas aisladas se analizaron por WB. Panel superior: RhoA-GTP aislado y detectado con un anticuerpo anti-RhoA. Panel inferior: RhoA total detectado con un anticuerpo anti-RhoA. **B)** Densitometría del aumento relativo de RhoA-GTP / RhoA-Total normalizado con respecto a los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$. **C)** Se obtuvieron los extractos de los espermatozoides no capacitados, capacitados durante 60 min (Cap) y capacitados en presencia del inhibidor de FAK PF573228 (PF), el inhibidor de MEK1/2 PD98059 (PD), el inhibidor de ERK1/2 FR180204 (FR), o el inhibidor de RhoA (C3). RhoA-GTP se aisló de estos extractos mediante un ensayo de *pull-down* utilizando una columna de Rhotekin. Las proteínas aisladas se analizaron por WB. Panel superior: RhoA-GTP aislado y detectado con un anticuerpo anti-RhoA. Panel inferior: RhoA total detectado con un anticuerpo anti-RhoA. **D)** La densitometría del aumento relativo de RhoA-GTP / RhoA-Total normalizado con respecto a los espermatozoides no capacitados. Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$, $n=3$.

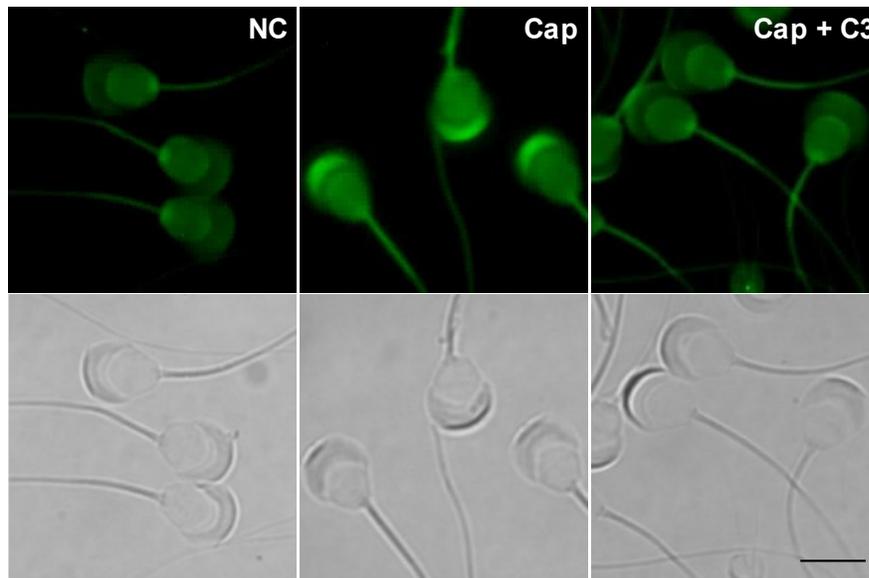


Figura 17. RhoA regula la polimerización del citoesqueleto de actina durante la capacitación. Los espermatozoides no capacitados (NC), capacitados durante 60 min (Cap) y capacitados durante 60 min en presencia del inhibidor de RhoA C3 (Cap + C3) se analizaron por microscopía de epifluorescencia para detectar F-actina usando faloidina-FITC. Los paneles de arriba corresponden a las imágenes que muestran F-actina. Las imágenes de abajo muestran el respectivo campo claro. Las imágenes representan tres experimentos independientes. Barra 10 μm .

DISCUSIÓN

La polimerización de actina es un proceso importante que tiene lugar durante la capacitación espermática, ya que su inhibición tiene significativas consecuencias sobre la fertilización (Rogers et al., 1989; Castellani-Ceresa et al., 1993; Brener et al., 2003); sin embargo, se sabe poco acerca de cómo se regula este proceso. El presente estudio describe una nueva vía de señalización que regula la polimerización de actina que se da durante la capacitación de los espermatozoides de cobayo donde FAK y ERK2 juegan papeles preponderantes. Hasta donde hemos investigado, ningún otro estudio ha descrito esta vía para ningún tipo de célula.

Anteriormente demostramos que, como en otros espermatozoides de mamíferos, los espermatozoides de cobayo expresan ERK1 y 2, predominando ERK2 (Salgado-Lucio, 2014). Curiosamente, cuando se analizó la activación de ERK1/2 en función de su fosforilación en Tyr204/Thr202 y Tyr185/Thr187, respectivamente, solo se pudo observar la activación de ERK2 (Salgado-Lucio, 2014). Se han reportado resultados similares para espermatozoides de seres humanos y de ratón (Luconi et al., 1998a; Jaldety and Breitbart, 2015). Lo anterior sugiere que ERK2 es la principal isoforma que participa en los diferentes procesos espermáticos. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que los *knockouts* de ERK1 son viables y fértiles (Pages et al., 1999), mientras que la desactivación genética de ERK2 resulta en la letalidad embrionaria (Yao et al., 2003).

Investigaciones anteriores sugieren que ERK1/2 tienen un papel importante en los procesos de capacitación, RA y motilidad, sugerencia que se basa en el uso de inhibidores de la cascada de MAPK, como el inhibidor específico de MEK1/2, las cuales son las MAP2K que activan directamente a ERK1/2 (Luconi et al., 1998a; Luconi et al., 1998b; du Plessis et al., 2001; de Lamirande and Gagnon, 2002; Almog et al., 2008; Awda and Buhr, 2010; Chiu et al., 2010; Luna et al., 2012; Jaldety and Breitbart, 2015; Kim et al., 2015; Luo et al., 2015; Rahamim Ben-Navi et al., 2016). El presente estudio utilizó un nuevo inhibidor que actúa directamente sobre la actividad de las cinasas ERK1/2 (Ohuri et al., 2005), y a diferencia de estudios anteriores, los resultados del presente estudio sobre los ensayo de CTC, redistribución de microdominios de membrana y análisis de p-

Tyr indican que la inhibición de ERK1/2 impiden que los espermatozoides del cobayo experimenten la RA tanto espontanea (Salgado-Lucio, 2014) como la inducida por progesterona (Fig. 3), pero no la capacitación (Fig. 3, 4, 5). Se han informado resultados similares en espermatozoides de ratón, en los cuales al inhibir la activación directa de ERK1/2 con el alcaloide Matrinal se impide la RA inducida por A23187, pero no la capacitación (Luo et al., 2015). Aun cuando, la activación más alta de ERK1/2 es temprana, después de 1.5-20 min de capacitación (Salgado-Lucio, 2014), después de 20 min su activación sigue siendo mayor que la actividad basal que tienen los espermatozoides no capacitados, lo que sugiere que ésta, es suficiente para activar a proteínas diana de ERK1/2, como la fosfolipasa A2 (Chen et al., 2005) o los canales de Ca^{2+} (Jaldety and Breitbart, 2015), cuya participación es esencial en la RA. Por todo lo anterior, sugerimos que ERK1/2 podría tener un papel preponderante en la RA más que en la capacitación.

Como ya se mencionó, otros estudios han demostrado que las proteínas ERK1/2 están involucradas en el aumento de p-Tyr que ocurre durante la capacitación (de Lamirande and Gagnon, 2002; Awda and Buhr, 2010), ya que observaron que p-Tyr disminuye en presencia de inhibidores de la vía canónica de ERK (CGP78850 inhibidor de la interacción de SH2 con Grb2, FTI-277 inhibidor de Ras, ZM336372 inhibidor de Raf y U126 inhibidor de MEK) (O'Flaherty et al., 2006b; a; Luo et al., 2015). Sin embargo, en el presente estudio no se observó que la inhibición de ERK1/2 por un inhibidor específico (FR180204) afectara los niveles de p-Tyr (Fig. 5A). Una explicación a este hecho es que el uso de inhibidores río arriba de ERK1/2 podría estar afectando a otras vías de señalización involucradas en la activación de las proteínas tirosina cinasa (O'Flaherty et al., 2006b). Adicionalmente, en el presente estudio se observó que la inhibición MEK1/2 por el inhibidor PD98059 durante la capacitación no produjo cambios significativos en p-Tyr (Fig. 5B). Sugerimos que la ruta de señalización MEK/ERK no participa en la generación de p-Tyr que ocurre durante la capacitación en los espermatozoides de cobayo, a diferencia de otras especies.

Divido a que ERK2 se activa cuando los espermatozoides están en un medio capacitante, la activación parece depender de factores intrínsecos al medio de

capacitación o a las células de espermáticas. En este trabajo se observó que la inhibición de FAK evita su interacción con Grb2 y la activación de ERK2 (Fig. 10, 12), como ya se mencionó, Grb2 es una proteína de andamio que desencadena la vía de activación canónica ERK1/2 (Renshaw et al., 1999; Lu and Rounds, 2012). Por esto, se hipotetizó que FAK es responsable de regular la activación de ERK2, probablemente a través de la vía fibronectina/integrina/FAK, que ocurre durante la formación de las rosetas (los espermatozoides se unen entre sí por sus cabezas, Fig. 7C), ya que este mecanismo es característico de la capacitación en los espermatozoides de cobayos y otras especies (Moore et al., 2002; Fisher and Hoekstra, 2010; Monclus and Fornes, 2016). Esta hipótesis se basa en: 1) El péptido RGD y el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ evitan la formación de las rosetas que se producen durante la capacitación (Fig. 7) (Diaz et al., 2007); 2) La expresión de la FNT en la superficie de los espermatozoides de cobayo es similar a otros espermatozoides de mamíferos (Fig. 7A, B) (Koehler et al., 1980; Vuento et al., 1984; Glander et al., 1987; Fusi and Bronson, 1992; Miranda and Tezon, 1992; Ekhlas-Hundrieser et al., 2005b; Thys et al., 2009); 3) La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ en espermatozoides humanos, de ratón y bovinos (Barraud-Lange et al., 2007; Thys et al., 2009; Boissonnas et al., 2010). Integrinas que reconocen a la FNT como ligando (Barczyk et al., 2010), y que a través de sus cadenas $\beta 1$ o $\beta 3$ pueden interactuar con FAK y desencadenar su auto-activación (Schaller et al., 1994; Cooper et al., 2003; Switala-Jelen et al., 2004); 4) La asociación de la integrina $\beta 1$ y FAK en espermatozoides de cobayo, ratón y seres humanos (Roa-Espitia et al., 2016); y 5) El tripéptido RGD que estimula la activación de las integrinas como $\beta 1$ o $\beta 3$ aumenta la actividad de ERK2 (Fig. 9), aumento que podría estar relacionado con el incremento en la RA que se da por la presencia de la FNT o del tripéptido RGD durante la capacitación (Fig. 7, 8) (Diaz et al., 2007).

La interacción de los espermatozoides que forman rosetas durante la capacitación podría ser una forma de cooperación entre ellos, donde la FNT asociada a la superficie del espermatozoide y las integrinas juegan un papel importante. En aquellas especies en las que los espermatozoides no forman rosetas, también se ha reportado que contienen FNT asociada a su superficie (Fusi and Bronson, 1992; Ekhlas-Hundrieser et al., 2005b; Thys et al., 2009; Leahy et al., 2011; Vilagran et al., 2015) y que se libera durante el

proceso de capacitación (Hernandez-Silva et al., 2020). La FNT liberada puede tener un papel autocrino o paracrino, ya sea *in vivo* o *in vitro*, cuando se asocia con las integrinas de otro espermatozoide. Curiosamente, la cantidad de FNT contenida en el líquido oviductal aumenta durante la etapa fértil del ciclo estral (Osycka-Salut et al., 2017), y lo que tendría un impacto en la fisiología del espermatozoide. Por lo tanto, aunque los espermatozoides no formen rosetas, la FNT puede tener un papel esencial en la activación de varias vías de señalización (Martinez-Leon et al., 2015). La importancia de la FNT durante la capacitación no se limita a la activación de ERK1/2, también se ha demostrado que está involucrada en la activación de la vía cAMP/PKA y la fosforilación de proteínas en Tyr (Diaz et al., 2007; Martinez-Leon et al., 2015). Por lo tanto, el sistema fibronectina/integrina es crucial para la capacitación espermática.

Por otro lado, la vía FAK/ERK1/2 se ha asociado con la remodelación del citoesqueleto de actina en células somáticas, en procesos como migración y diferenciación celular (Zhang et al., 2014; Hyvari et al., 2018). Como ya se discutió, FAK está relacionada con la activación de ERK2 (Fig. 10) y la inhibición de estas cinasas previene la polimerización de la actina que se da durante la capacitación (Fig. 6) (Roa-Espitia et al., 2016), Fujishiro y col. (2008) propusieron que ERK1/2 son capaces de activar el GEF-H1, el cual regula a RhoA. El presente trabajo es el primer estudio que reporta la expresión de GEF-H1 en células espermáticas (Fig. 14), factor que podría activarse durante la capacitación, como lo demuestra el aumento en la fosforilación en Thr, fosforilación que es inhibida al inhibir a FAK o a ERK1/2 (Fig. 15A). Además, en este trabajo se observó la interacción entre el GEF-H1 y RhoA en espermatozoides capacitados, la cual también se evita inhibiendo a FAK o a ERK1/2 (Fig. 15C). Cabe señalar que la activación de ERK2 (Salgado-Lucio, 2014) coincide con el aumento en la activación de RhoA (Fig. 16A, B). Interesantemente también observamos que la inhibición de RhoA inhibe la polimerización de actina (Fig. 17). Juntos, estos datos sugieren que FAK y ERK1/2 podrían estar regulando a RhoA a través del GEF-H1, lo que conduciría a la polimerización de actina. La vía FAK/ERK, y la vía ERK/GEF-H1/RhoA son vías de señalización relacionadas con la remodelación del citoesqueleto que se han estudiado por separado (Fujishiro et al., 2008; Zhang et al., 2014; Hyvari et al., 2018). En este

estudio, reportamos por primera vez que estas dos vías están asociadas y que podrían tener un papel relevante en la fisiología del espermatozoide.

Como ya se mencionó, la polimerización de la actina durante la capacitación es importante para que los espermatozoides de mamíferos adquieran la capacidad de fertilizar, específicamente para que los espermatozoides se sometan a una RA normal y puedan fusionarse con el óvulo (Rogers et al., 1989; Castellani-Ceresa et al., 1993; Spungin et al., 1995; Brener et al., 2003; Cabello-Agueros et al., 2003). La inhibición de las cinasas ERK1/2 o MEK1/2 permite aproximadamente el 50% de la polimerización de la actina, en relación con el control (Fig. 6B). Posiblemente, esta cantidad de F-actina es suficiente para que tenga lugar la capacitación, pero no lo suficiente para que se produzca la RA, lo que sugiere que una polimerización de la actina completa es necesaria para que ambos procesos tengan éxito. Estos datos también sugieren que la vía de señalización que proponemos: fibronectina/integridad/FAK/MEK1y2/ERK2/GEF-H1/RhoA es solo una de las vías involucradas en la polimerización de la actina durante la capacitación. Los espermatozoides de los mamíferos expresan al menos tres proteínas Rho diferentes: Cdc42, RhoA y Rac1 (Delgado-Buenrostro et al., 2005; Ducummon and Berger, 2006), las cuales se sabe que ensamblan y organizan el citoesqueleto en diferentes estructuras (Hall et al., 2011). Posiblemente, cada una de las proteínas Rho polimeriza actina en regiones específicas de los espermatozoides; tal es el caso de Rac1 que solo polimeriza actina en la región apical del acrosoma (Ramirez-Ramirez et al., 2020).

Finalmente, proponemos que la vía fibronectina/integrina/FAK/MEK/ERK2/GEF-H1/RhoA es una de las vías de señalización que regulan la polimerización del citoesqueleto de actina durante la capacitación en los espermatozoides de cobayo (Fig. 18). Esta es una vía que no ha sido descrita en ningún otro estudio en espermatozoides o cualquier otro tipo de célula. Curiosamente, al menos *in vitro*, esta vía de señalización parece depender de la interacción espermatozoide-espermatozoide.

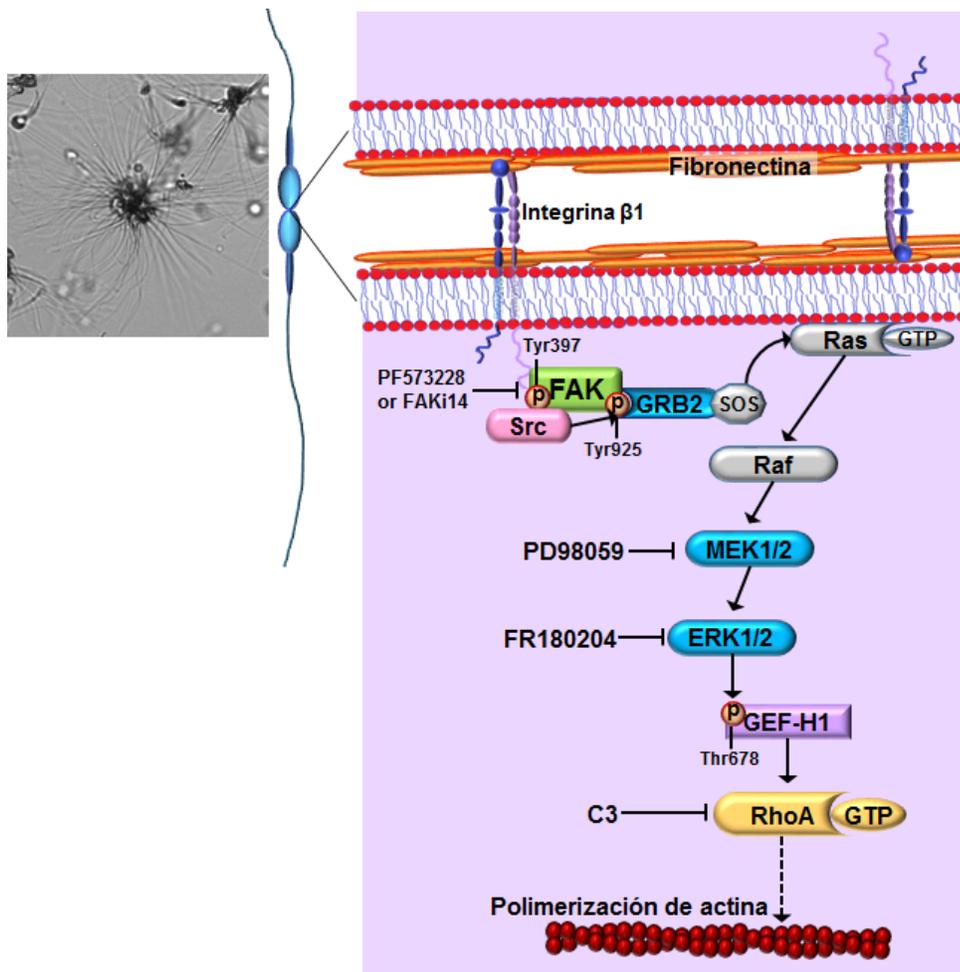


Figura 18. Diagrama esquemático de la vía de señalización implicada en la polimerización del citoesqueleto de actina durante la capacitación en espermatozoides de cobayo. Durante la capacitación, los espermatozoides de cobayo forman rosetas al unirse cabeza con cabeza; Esta unión está mediada por la interacción de las integrinas de un espermatozoide y la FNT presente en la superficie de otros espermatozoides. La interacción de la integrina con su ligando (FNT) desencadena un cambio conformacional que permite la interacción de FAK con el dominio citoplasmático de la β -integrina, desencadenando la activación de FAK por su auto-fosforilación en Tyr397; esta fosforilación sirve como andamio para la cinasa Src. Una vez que Src se une a FAK, fosforila a FAK en Tyr925, lo cual induce el reclutamiento de Grb2-SOS, lo que lleva a la activación de Ras GTPasa y la activación posterior de la vía Raf1/MEK1y2/ERK1y2. ERK2 regula la actividad del GEF-H1 a través de su fosforilación en Thr678. El GEF-H1 media el cambio en el GDP a GTP de RhoA. Una vez activo, RhoA regula la polimerización de actina. Las flechas con líneas continuas esquematizan la interacción directa de las proteínas. Las flechas con líneas punteadas esquematizan que hay otras proteínas intermedias. PF573228 y el inhibidor de FAK 14 (FAKi14) son inhibidores de FAK, PD98059 es un inhibidor de MEK1/2, FR180204 es un inhibidor de ERK1/2 y C3 es un inhibidor de RhoA.

CONCLUSIONES

1. ERK1/2 participan en la RA inducida, pero al parecer no en la capacitación de los espermatozoides del cobayo.
2. La interacción fibronectina-integrinas media la formación de las rosetas en los espermatozoides del cobayo.
3. La interacción fibronectina-integrinas, a través de FAK/Grb2/MEK1 y 2 regula la activación de ERK2.
4. ERK2 regula la polimerización de actina que sucede durante la capacitación a través de la activación del GEF-H1, que a su vez activa a RhoA.
5. Proponemos que fibronectina/integrina/FAK/Grb2/MEK1y2/ERK2/GEF-H1/RhoA es una de las vías de señalización que regula la polimerización de actina durante la capacitación en los espermatozoides de cobayo y es la primera vez que esta vía es descrita para cualquier tipo celular.

PERSPECTIVAS

- Determinar si la inhibición de FAK inhibe la activación de MEK1/2.
- Determinar cuál integrina, $\beta 1$ o $\beta 3$, está relacionada en la activación de FAK y ERK2.
- Determinar si existe otra integrina que reconoce a fibronectina que esté relacionada con la activación de la vía FAK/ERK/GEF-H1/RhoA.
- Determinar si inhibir la interacción espermatozoide-espermatozoide durante la capacitación con el tripéptido RGD o el anticuerpo anti-integrina $\beta 1$, tiene algún efecto sobre la polimerización de actina.

REFERENCIAS

- Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R., 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379, 173-182.
- Abou-Haila, A., Tulsiani, D.R., 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 485, 72-81.
- Almog, T., Lazar, S., Reiss, N., Etkovitz, N., Milch, E., Rahamim, N., Dobkin-Bekman, M., Rotem, R., Kalina, M., Ramon, J., Raziel, A., Breitbart, H., Seger, R., Naor, Z., 2008. Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality. *J Biol Chem* 283, 14479-14489.
- Aquila, S., Rago, V., Guido, C., Casaburi, I., Zupo, S., Carpino, A., 2008. Leptin and leptin receptor in pig spermatozoa: evidence of their involvement in sperm capacitation and survival. *Reproduction* 136, 23-32.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Carpino, A., Middea, E., Catalano, S., Rago, V., Ando, S., 2003. Towards a physiological role for cytochrome P450 aromatase in ejaculated human sperm. *Hum Reprod* 18, 1650-1659.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., Rago, V., Ando, S., 2004. Estrogen receptor (ER)alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1443-1451.
- Arnoult, C., Kazam, I.G., Visconti, P.E., Kopf, G.S., Villaz, M., Florman, H.M., 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6757-6762.
- Austin, C.R., 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.
- Awda, B.J., Buhr, M.M., 2010. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *Biol Reprod* 83, 750-758.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D., 2010. Integrins. *Cell Tissue Res* 339, 269-280.
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Saffar, L., Gattegno, L., Ducot, B., Drillet, A.S., Bomsel, M., Wolf, J.P., Ziyat, A., 2007. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC Dev Biol* 7, 102.
- Battistone, M.A., Alvau, A., Salicioni, A.M., Visconti, P.E., Da Ros, V.G., Cuasnicu, P.S., 2014. Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 20, 1054-1066.
- Boissonnas, C.C., Montjean, D., Lesaffre, C., Auer, J., Vaiman, D., Wolf, J.P., Ziyat, A., 2010. Role of sperm alpha6beta3 integrin in mouse fertilization. *Dev Dyn* 239, 773-783.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breitbart, H., Cohen, G., Rubinstein, S., 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 129, 263-268.
- Breitbart, H., Etkovitz, N., 2011. Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Asian J Androl* 13, 106-110.
- Breitbart, H., Finkelstein, M., 2018. Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochem Biophys Res Commun* 506, 372-377.
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., Breitbart, H., 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod* 68, 837-845.

- Cabello-Agueros, J.F., Hernandez-Gonzalez, E.O., Mujica, A., 2003. The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. *Cell Motil Cytoskeleton* 56, 94-108.
- Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Castellani-Ceresa, L., Mattioli, M., Radaelli, G., Barboni, B., Brivio, M.F., 1993. Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Mol Reprod Dev* 36, 203-211.
- Chang, M.C., 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168, 697-698.
- Chavez, J.C., Hernandez-Gonzalez, E.O., Wertheimer, E., Visconti, P.E., Darszon, A., Trevino, C.L., 2012. Participation of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl⁻ channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 86, 1-14.
- Chen, W.Y., Ni, Y., Pan, Y.M., Shi, Q.X., Yuan, Y.Y., Chen, A.J., Mao, L.Z., Yu, S.Q., Roldan, E.R., 2005. GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Lett* 579, 4692-4700.
- Chiu, P.C., Wong, B.S., Lee, C.L., Lam, K.K., Chung, M.K., Lee, K.F., Koistinen, R., Koistinen, H., Gupta, S.K., Seppala, M., Yeung, W.S., 2010. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human spermatozoa is potentiated by glycodelin-A via down-regulation of extracellular signal-regulated kinases and up-regulation of zona pellucida-induced calcium influx. *Hum Reprod* 25, 2721-2733.
- Cooper, L.A., Shen, T.L., Guan, J.L., 2003. Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 23, 8030-8041.
- Cotton, L., Gibbs, G.M., Sanchez-Partida, L.G., Morrison, J.R., de Kretser, D.M., O'Bryan, M.K., 2006. FGFR-1 [corrected] signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation. *J Cell Sci* 119, 75-84.
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 2002. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Hum Reprod* 8, 124-135.
- Delgado-Buenrostro, N.L., Hernandez-Gonzalez, E.O., Segura-Nieto, M., Mujica, A., 2005. Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev* 70, 198-210.
- Demarco, I.A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J.L., Hockensmith, J.W., Kopf, G.S., Darszon, A., Visconti, P.E., 2003. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 278, 7001-7009.
- Diaz, E.S., Kong, M., Morales, P., 2007. Effect of fibronectin on proteasome activity, acrosome reaction, tyrosine phosphorylation and intracellular calcium concentrations of human sperm. *Hum Reprod* 22, 1420-1430.
- Dobkin-Bekman, M., Naidich, M., Rahamim, L., Przeddecki, F., Almog, T., Lim, S., Melamed, P., Liu, P., Wohland, T., Yao, Z., Seger, R., Naor, Z., 2009. A preformed signaling complex mediates GnRH-activated ERK phosphorylation of paxillin and FAK at focal adhesions in L beta T2 gonadotrope cells. *Mol Endocrinol* 23, 1850-1864.
- du Plessis, S.S., McAllister, D.A., Luu, A., Savia, J., Agarwal, A., Lampiao, F., 2010. Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia* 42, 206-210.
- du Plessis, S.S., Page, C., Franken, D.R., 2001. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation. *Andrologia* 33, 337-342.
- Ducummon, C.C., Berger, T., 2006. Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species. *Zygote* 14, 249-257.
- Eisenbach, M., 2004. Towards understanding the molecular mechanism of sperm chemotaxis. *J Gen Physiol* 124, 105-108.

- Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., Topfer-Petersen, E., 2005a. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod* 73, 536-545.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Schafer, B., Kirchhoff, C., Hess, O., Bellair, S., Muller, P., Topfer-Petersen, E., 2005b. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 70, 45-57.
- Engel, J.C., Bernard, E.A., Wassermann, G.F., 1973. Protein synthesis by isolated spermatozoa from cauda and caput epididymis of rat. *Acta Physiol Lat Am* 23, 358-362.
- Espino, J., Ortiz, A., Bejarano, I., Lozano, G.M., Monllor, F., Garcia, J.F., Rodriguez, A.B., Pariente, J.A., 2011. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertil Steril* 95, 2290-2296.
- Evans, H.R., Holloway, D.E., Sutton, J.M., Ayriss, J., Shone, C.C., Acharya, K.R., 2004. C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*: structure of a tetragonal crystal form and a reassessment of NAD-induced flexure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 1502-1505.
- Fiedler, S.E., Bajpai, M., Carr, D.W., 2008. Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 78, 184-192.
- Fisher, H.S., Hoekstra, H.E., 2010. Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice. *Nature* 463, 801-803.
- Florman, H.M., Fissore, R.A., 2015. Fertilization in Mammals, in: Zeleznik, T.M.P.a.A.J. (Ed.), *Knoblich and Neill's Physiology of Reproduction*, Academic Press, USA, pp. 149-196.
- Franchini, K.G., 2012. Focal adhesion kinase -- the basis of local hypertrophic signaling domains. *J Mol Cell Cardiol* 52, 485-492.
- Fujishiro, S.H., Tanimura, S., Mure, S., Kashimoto, Y., Watanabe, K., Kohno, M., 2008. ERK1/2 phosphorylate GEF-H1 to enhance its guanine nucleotide exchange activity toward RhoA. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 162-167.
- Fusi, F.M., Bronson, R.A., 1992. Sperm surface fibronectin. Expression following capacitation. *J Androl* 13, 28-35.
- Gadella, B.M., Boerke, A., 2016. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. *Theriogenology* 85, 113-124.
- Gadella, B.M., Harrison, R.A., 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407-2420.
- Glander, H.J., Herrmann, K., Hausteil, U.F., 1987. The equatorial fibronectin band (EFB) on human spermatozoa--a diagnostic help for male fertility? *Andrologia* 19, 456-459.
- Gonzalez-Fernandez, L., Macias-Garcia, B., Loux, S.C., Varner, D.D., Hinrichs, K., 2013. Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm. *Biol Reprod* 88, 138.
- Hall, J.E., Fu, W., Schaller, M.D., 2011. Focal adhesion kinase: exploring Fak structure to gain insight into function. *Int Rev Cell Mol Biol* 288, 185-225.
- Hernandez-Gonzalez, E.O., Lecona-Valera, A.N., Escobar-Herrera, J., Mujica, A., 2000. Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton* 46, 43-58.
- Hernandez-Silva, G., Fabian Lopez-Araiza, J.E., Lopez-Torres, A.S., Larrea, F., Torres-Flores, V., Chirinos, M., 2020. Proteomic characterization of human sperm plasma membrane-associated proteins and their role in capacitation. *Andrology* 8, 171-180.
- Huang, C., Jacobson, K., Schaller, M.D., 2004. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117, 4619-4628.
- Hunger-Glaser, I., Salazar, E.P., Sinnott-Smith, J., Rozengurt, E., 2003. Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* 278, 22631-22643.

- Hyvari, L., Ojansivu, M., Juntunen, M., Kartasalo, K., Miettinen, S., Vanhatupa, S., 2018. Focal Adhesion Kinase and ROCK Signaling Are Switch-Like Regulators of Human Adipose Stem Cell Differentiation towards Osteogenic and Adipogenic Lineages. *Stem Cells Int* 2018, 2190657.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H., 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 14, 816-821.
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M., Yanagimachi, R., 2011. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20008-20011.
- Jaldety, Y., Breitbart, H., 2015. ERK1/2 mediates sperm acrosome reaction through elevation of intracellular calcium concentration. *Zygote* 23, 652-661.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K., Hirohashi, N., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4892-4896.
- Kelley, L.C., Hayes, K.E., Ammer, A.G., Martin, K.H., Weed, S.A., 2010. Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence. *PLoS One* 5, e13847.
- Kim, B.J., Park, D.R., Nam, T.S., Lee, S.H., Kim, U.H., 2015. Seminal CD38 Enhances Human Sperm Capacitation through Its Interaction with CD31. *PLoS One* 10, e0139110.
- Koehler, J.K., Nudelman, E.D., Hakomori, S., 1980. A collagen-binding protein on the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. *J Cell Biol* 86, 529-536.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lax, Y., Rubinstein, S., Breitbart, H., 1994. Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett* 339, 234-238.
- Leahy, T., Marti, J.I., Crossett, B., Evan, G., Maxwell, W.M., 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from flow cytometrically sorted ram sperm. *Theriogenology* 75, 962-971.
- Liguori, L., de Lamirande, E., Minelli, A., Gagnon, C., 2005. Various protein kinases regulate human sperm acrosome reaction and the associated phosphorylation of Tyr residues and of the Thr-Glu-Tyr motif. *Mol Hum Reprod* 11, 211-221.
- Lin, C.C., Melo, F.A., Ghosh, R., Suen, K.M., Stagg, L.J., Kirkpatrick, J., Arold, S.T., Ahmed, Z., Ladbury, J.E., 2012. Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2. *Cell* 149, 1514-1524.
- Llanos, M.N., Morales, P., Riffo, M.S., 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool* 267, 209-216.
- Lu, Q., Rounds, S., 2012. Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis. *Microvasc Res* 83, 56-63.
- Luconi, M., Barni, T., Vannelli, G.B., Krausz, C., Marra, F., Benedetti, P.A., Evangelista, V., Francavilla, S., Properzi, G., Forti, G., Baldi, E., 1998a. Extracellular signal-regulated kinases modulate capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 58, 1476-1489.
- Luconi, M., Krausz, C., Barni, T., Vannelli, G.B., Forti, G., Baldi, E., 1998b. Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4, 251-258.
- Luna, C., Colas, C., Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T., 2012. A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep. *Biol Reprod* 87, 93.
- Luo, T., Zou, Q.X., He, Y.Q., Wang, H.F., Li, N., Zeng, X.H., 2015. Matrine inhibits mouse sperm function by reducing sperm $[Ca^{2+}]_i$ and phospho-ERK1/2. *Cell Physiol Biochem* 35, 374-385.
- Maignan, S., Guilloteau, J.P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J., Ducruix, A., 1995. Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* 268, 291-293.

- Maldonado-Garcia, D., Salgado-Lucio, M.L., Roa-Espitia, A.L., Reyes-Miguel, T., Hernandez-Gonzalez, E.O., 2017. Calpain inhibition prevents flotillin re-ordering and Src family activation during capacitation. *Cell Tissue Res* 369, 395-412.
- Martinez-Leon, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Kong, M., Morales, P., Perez-Martinez, S., Diaz, E.S., 2019. Fibronectin modulates the endocannabinoid system through the cAMP/PKA pathway during human sperm capacitation. *Mol Reprod Dev* 86, 224-238.
- Martinez-Leon, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Pozo, P., Perez, B., Kong, M., Morales, P., Perez-Martinez, S., Diaz, E.S., 2015. Fibronectin stimulates human sperm capacitation through the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Hum Reprod* 30, 2138-2151.
- Minelli, A., Bellezza, I., Collodel, G., Fredholm, B.B., 2008. Promiscuous coupling and involvement of protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the adenosine A1 receptor signalling in mammalian spermatozoa. *Biochem Pharmacol* 75, 931-941.
- Miranda, P.V., Tezon, J.G., 1992. Characterization of fibronectin as a marker for human epididymal sperm maturation. *Mol Reprod Dev* 33, 443-450.
- Monclus, M.A., Fornes, M.W., 2016. Sperm conjugation in mammal reproductive function: Different names for the same phenomenon? *Mol Rep rod Dev* 83, 884-896.
- Moore, H., Dvorakova, K., Jenkins, N., Breed, W., 2002. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature* 418, 174-177.
- Munoz-Garay, C., De la Vega-Beltran, J.L., Delgado, R., Labarca, P., Felix, R., Darszon, A., 2001. Inwardly rectifying K(+) channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Dev Biol* 234, 261-274.
- Naz, R.K., Padman, P., 1999. Identification of insulin-like growth factor (IGF)-1 receptor in human sperm cell. *Arch Androl* 43, 153-159.
- Nishigaki, T., Jose, O., Gonzalez-Cota, A.L., Romero, F., Trevino, C.L., Darszon, A., 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 1149-1158.
- Nixon, B., Bielaniowicz, A., Anderson, A.L., Walsh, A., Hall, T., McCloghry, A., Aitken, R.J., 2010. Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol* 224, 71-83.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., Gagnon, C., 2005. Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation. *Biol Reprod* 73, 94-105.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., Gagnon, C., 2006a. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* 41, 528-540.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., Gagnon, C., 2006b. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 40, 1045-1055.
- Ohuri, M., Kinoshita, T., Okubo, M., Sato, K., Yamazaki, A., Arakawa, H., Nishimura, S., Inamura, N., Nakajima, H., Neya, M., Miyake, H., Fujii, T., 2005. Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 357-363.
- Osycka-Salut, C.E., Castellano, L., Fornes, D., Beltrame, J.S., Alonso, C.A.I., Jawerbaum, A., Franchi, A., Diaz, E.S., Perez Martinez, S., 2017. Fibronectin From Oviductal Cells Fluctuates During the Estrous Cycle and Contributes to Sperm-Oviduct Interaction in Cattle. *J Cell Biochem* 118, 4095-4108.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auburger, P., Pouyssegur, J., 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.
- Rahamim Ben-Navi, L., Almog, T., Yao, Z., Seger, R., Naor, Z., 2016. A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Sci Rep* 6, 37922.

- Ralt, D., Goldenberg, M., Fetterolf, P., Thompson, D., Dor, J., Mashiach, S., Garbers, D.L., Eisenbach, M., 1991. Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2840-2844.
- Ramirez-Ramirez, D., Salgado-Lucio, M.L., Roa-Espitia, A.L., Fierro, R., Gonzalez-Marquez, H., Cordero-Martinez, J., Hernandez-Gonzalez, E.O., 2020. Rac1 is necessary for capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *J Cell Biochem* 121, 2864-2876.
- Renshaw, M.W., Price, L.S., Schwartz, M.A., 1999. Focal adhesion kinase mediates the integrin signaling requirement for growth factor activation of MAP kinase. *J Cell Biol* 147, 611-618.
- Reyes-Miguel, T., 2013. Intervención de proteínas Rho en la capacitación y reacción acrosomal, *Biología Celular*, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, p. 40.
- Rivera-Gaona, M.G., 2012. Manual de reproducción bovina, In: Rivera-Gaona, M.G. (Ed.), *Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Universidad del Tolima, Colombia.
- Roa-Espitia, A.L., Hernandez-Rendon, E.R., Baltierrez-Hoyos, R., Munoz-Gotera, R.J., Cote-Velez, A., Jimenez, I., Gonzalez-Marquez, H., Hernandez-Gonzalez, E.O., 2016. Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation. *Biol Open* 5, 1189-1199.
- Rogers, B.J., Bastias, C., Coulson, R.L., Russell, L.D., 1989. Cytochalasin D inhibits penetration of hamster eggs by guinea pig and human spermatozoa. *J Androl* 10, 275-282.
- Rogers, B.J., Yanagimachi, R., 1975. Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and the acrosome reaction. *Biol Reprod* 13, 568-575.
- Romarowski, A., Battistone, M.A., La Spina, F.A., Puga Molina Ldel, C., Luque, G.M., Vitale, A.M., Cuasnicu, P.S., Visconti, P.E., Krapf, D., Buffone, M.G., 2015. PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 405, 237-249.
- Roskoski, R., Jr., 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Rotfeld, H., Hillman, P., Ickowicz, D., Breitbart, H., 2014. PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade. *Reproduction* 147, 347-356.
- Salgado-Lucio, M.L., 2014. ERK1/2 participan en la reacción acrosomal a través de su activación por FAK, *Biología Celular*, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, p. 55.
- Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., Visconti, P.E., 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65, 245-259.
- Sanchez-Gutierrez, M., Contreras, R.G., Mujica, A., 2002. Cytochalasin-D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrane fusion with the egg plasma membrane. *Mol Reprod Dev* 63, 518-528.
- Santi, C.M., Orta, G., Salkoff, L., Visconti, P.E., Darszon, A., Trevino, C.L., 2013. K⁺ and Cl⁻ channels and transporters in sperm function. *Curr Top Dev Biol* 102, 385-421.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., Parsons, J.T., 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 14, 1680-1688.
- Shabtay, O., Breitbart, H., 2016. CaMKII prevents spontaneous acrosomal exocytosis in sperm through induction of actin polymerization. *Dev Biol* 415, 64-74.
- Signorelli, J., Diaz, E.S., Morales, P., 2012. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res* 349, 765-782.
- Sosnik, J., Miranda, P.V., Spiridonov, N.A., Yoon, S.Y., Fissore, R.A., Johnson, G.R., Visconti, P.E., 2009. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* 122, 2741-2749.

- Spungin, B., Margalit, I., Breitbart, H., 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2525-2535.
- Sun, F., Bahat, A., Gakamsky, A., Girsh, E., Katz, N., Giojalas, L.C., Tur-Kaspa, I., Eisenbach, M., 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod* 20, 761-767.
- Sutovsky, P., 2009. Sperm-egg adhesion and fusion in mammals. *Expert Rev Mol Med* 11, e11.
- Switala-Jelen, K., Dabrowska, K., Opolski, A., Lipinska, L., Nowaczyk, M., Gorski, A., 2004. The biological functions of beta3 integrins. *Folia Biol (Praha)* 50, 143-152.
- Tanimura, S., Takeda, K., 2017. ERK signalling as a regulator of cell motility. *J Biochem* 162, 145-154.
- Thys, M., Nauwynck, H., Maes, D., Hoogewijs, M., Vercauteren, D., Rijsselaere, T., Favoreel, H., Van Soom, A., 2009. Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin alpha(5)beta(1)) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. *Reproduction* 138, 471-482.
- Toshimori, K., Eddy, E.M., 2015. The Spermatozoon, in: Plant, T.M., Zeleznik, A.J. (Eds.), *Knobli and Neill's Physiology of Reproduction*, Academic Press, USA, pp. 99-148.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Tulsiani, D.R., Abou-Haila, A., 2012. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica (Cairo)* 2012, 607427.
- Tulsiani, D.R., Abou-Haila, A., Loeser, C.R., Pereira, B.M., 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240, 151-164.
- van Gestel, R.A., Brewis, I.A., Ashton, P.R., Helms, J.B., Brouwers, J.F., Gadella, B.M., 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod* 11, 583-590.
- Vilagran, I., Yeste, M., Sancho, S., Castillo, J., Oliva, R., Bonet, S., 2015. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology* 3, 345-356.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., Bailey, J.L., Leclerc, P., Connors, S.A., Pan, D., Olds-Clarke, P., Kopf, G.S., 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121, 1139-1150.
- Vuento, M., Kuusela, P., Virkki, M., Koskimies, A., 1984. Characterization of fibronectin on human spermatozoa. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365, 757-762.
- Waheed, F., Dan, Q., Amoozadeh, Y., Zhang, Y., Tanimura, S., Speight, P., Kapus, A., Szaszi, K., 2013. Central role of the exchange factor GEF-H1 in TNF-alpha-induced sequential activation of Rac, ADAM17/TACE, and RhoA in tubular epithelial cells. *Mol Biol Cell* 24, 1068-1082.
- Ward, C.R., Storey, B.T., 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol* 104, 287-296.
- Wortzel, I., Seger, R., 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2, 195-209.
- Xiao, G., Wang, X., Wang, J., Zu, L., Cheng, G., Hao, M., Sun, X., Xue, Y., Lu, J., Wang, J., 2015. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms. *Oncotarget* 6, 14165-14178.
- Yanagimachi, R., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371-372.

- Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U.A., Su, M.S., Kuida, K., Boucher, D.M., 2003. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12759-12764.
- Yoon, S., Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Zhang, B., Luo, Q., Mao, X., Xu, B., Yang, L., Ju, Y., Song, G., 2014. A synthetic mechano-growth factor E peptide promotes rat tenocyte migration by lessening cell stiffness and increasing F-actin formation via the FAK-ERK1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res* 322, 208-216.
- Zheng, Y., Xia, Y., Hawke, D., Halle, M., Tremblay, M.L., Gao, X., Zhou, X.Z., Aldape, K., Cobb, M.H., Xie, K., He, J., Lu, Z., 2009. FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Mol Cell* 35, 11-25.