



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Cdc42 dirige la actividad de RhoA en la  
polimerización de actina durante la capacitación**

**Tesis que presenta**

M. en C. Tania Reyes Miguel

**Para obtener el Grado de**

Doctor en Ciencias en la especialidad de Biología celular

**Director de Tesis:** Dr. Enrique Othón Hernández González

Ciudad de México

Julio de 2024

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 unidad Zacatenco (CINVESTAV), bajo la dirección del Dr. Enrique Othón Hernández Gonzáles del Departamento de Biología Celular CINVESTAV.

Los asesores del presente trabajo fueron la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, el Dr. José Manuel Hernández Hernández del Departamento de Biología Celular CINVESTAV, la Dra. María Isabel Hernández Ochoa del Departamento de Toxicología CINVESTAV y la Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado ENMH-IPN.

Agradezco a la Dra. Ana Lilia Roa Espitia por haberme entrenado en algunas de las técnicas implementadas en este proyecto, así como en su ayuda técnica para realizar la presente tesis.

## **Dedicatoria**

A mis padres Estilita Miguel Mora y Francisco Reyes Navarrete quienes son parte indispensable en mi formación profesional, por el apoyo incondicional, así como, su comprensión en todo lo transcurrido en mi vida, por contar con su dedicación, cariño y sobre todo los años de padres que siempre me brindaron, a mis hermanos: Erick Reyes Miguel quien aunque peleemos por momentos nunca dejo de apoyarme, Francisco Reyes Miguel quien con su paciencia y sus buenos gestos me ayudaba con mis pequeños problemas técnicos y Edgar Augusto Reyes Miguel el pequeño de la casa quien con sus ocurrencias me enseñó que la vida también tiene momentos de agradables sonrisas y múltiples tropiezos. Así como a mis amigos que hice en esta época ya que gracias a ellos salí de mis derrotas y me acompañaron en mi triunfo, apoyándome sin inmutarse en ningún momento. A todo ustedes:

Gracias

## **Agradecimientos**

Nuevamente a mi tutor Dr. Enrique Othón Hernández Gonzáles con sus enseñanzas no solo me preparaban en lo académico sino también en lo personal ya que me brindo su amistad para seguir adelante sin perder el ánimo, así como, a mis asesores la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, el Dr. José Manuel Hernández Hernández, la Dra. María Isabel Hernández Ochoa y la Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado por su apoyo y tiempo que me 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, así como, con su amitas y apoyo.

A mis papas por brindarme su apoyo en todo momento que me hacía falta para poder terminar esta etapa en mi vida y tolerar en algunas ocasiones mis cambios de humor, así como, los sacrificios que hicieron para que pudiera cumplir sin fallar.

A los amigos que en esta época conocí: Aidé Muñoz Sánchez, Christian Gonzales Reyes, Deneb Maldonado García quienes estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, brindándome su apoyo y comprensión siempre conté con ellos. A ustedes gracias.

Así como a mis amigos de laboratorio Eva Delgado, Eva Raquel que me brindaron su apoyo y sus asesorías en el laboratorio.

## Índice

Resumen .....	III
Introducción .....	1
Morfología del espermatozoide .....	1
Capacitación .....	4
Reacción acrosomal .....	6
El papel del citoesqueleto de actina en la fisiología espermática .....	7
Rho GTPasas .....	11
RhoA.....	14
Cdc42 .....	16
GAP y GEF de las RhoGTPasas .....	17
Proteínas efectoras de las proteínas Rho.....	20
Proteína Cinasa N (PKN) .....	20
Proteína de mamíferos homologa a la proteína Diáfana de Drosophila (mDia) ..	22
Rhopilin .....	23
Rho-Cinasa (ROCK).....	24
Antecedentes directos .....	26
Hipótesis .....	28
Objetivo General .....	28
Objetivos Particulares .....	28
Estrategia Experimental .....	29
Obtención y capacitación de espermatozoides .....	29
Inhibidor de las proteínas Rho durante la capacitación .....	29
Obtención de extractos proteínicos de espermatozoides .....	30
<i>Western blot</i> para la identificación de proteínas .....	30
Ensayos de viabilidad .....	31
Ensayo con clortetraciclina .....	32
Preparación de frotis espermáticos .....	32
Inmunolocalización de las proteínas ROCK .....	33
Detección de actina-F en espermatozoides.....	33

Reacción acrosomal inducida.....	34
Ensayo de actividad de la proteína RhoA.....	34
Ensayo de actividad de la proteína Cdc42. ....	34
Resultados.....	35
La viabilidad de los espermatozoides no se ve afectada por los diferentes inhibidores. ....	35
Cdc42, RhoA y ROCK participan diferencialmente en la capacitación y la reacción acrosomal espontanea. ....	36
Cdc42 inicia la polimerización de actina durante la capacitación .....	39
La activación de RhoA es dependiente de Cdc42 .....	42
ROCK 1 afecta la polimerización de actina .....	46
Discusion .....	49
Conclusiones .....	53
Perspectivas .....	54
Bibliografía.....	55
Anexos.....	63

## **Resumen**

Los espermatozoides de mamíferos adquieren su capacidad fertilizante como resultado de un proceso denominado capacitación. La polimerización de actina es importante para la capacitación, ya que la inhibición de la polimerización de actina previene la adhesión y la fusión del espermatozoide con el ovulo. La principal función de las proteínas Rho, Cdc42 y RhoA es la polimerización de actina. A pesar de que estas dos proteínas están presentes en los espermatozoides de los mamíferos, se conoce poco de su papel en la capacitación, reacción acrosomal y de su manera en la cual ellas polimerizan actina. El propósito de este estudio fue determinar la participación de Cdc42 y RhoA en la capacitación y reacción acrosomal y su relación con la polimerización de actina usando espermatozoides de cobayo. Nuestros resultados muestran que la inhibición de Cdc42 y RhoA alteran la cinética de la polimerización, capacitación y reacción acrosomal de diferentes maneras. También muestran que la iniciación de la polimerización de actina y la activación de RhoA depende de la activación de Cdc42 y que RhoA inicia esta actividad y afecta en la polimerización de actina cuando Cdc42 alcanza su máxima actividad. Las cinasas de Rho (ROCK1 y 2) son los principales efectores de RhoA. En este trabajo también se estudió su participación en la capacitación y reacción acrosomal. Primeramente, solo ROCK1 fué encontrada en los espermatozoides del cobayo y a través de su inhibición se observó que esta cinasa solo participa en la capacitación y no en la reacción acrosomal. En general, nuestros resultados indican que Cdc42 y RhoA tienen diferentes papeles en los procesos de capacitación y reacción acrosomal.

## **Abstract**

Mammalian sperm acquire their fertilizing capacity due to a process called capacitation. Actin polymerization is essential for capacitation since inhibition of actin polymerization prevents adhesion and fusion of the sperm with the egg. The primary function of the Rho proteins like Cdc42 and RhoA is actin polymerization. Although these two proteins are present in mammalian sperm, little is known about their role in capacitation, acrosomal reaction, and the way in which they polymerize actin. This study aimed to determine the participation of Cdc42 and RhoA in the capacitation and acrosomal reaction and their relationship with actin polymerization using guinea pig sperm. Our results show that inhibition of Cdc42 or RhoA alters the kinetics of polymerization, capacitation, and acrosomal reaction in different ways. They also show that the initiation of actin polymerization and activation of RhoA depends on the activation of Cdc42. The activity of RhoA initiates and affects actin polymerization when Cdc42 reaches its maximum activity. Rho kinases (ROCK1 and 2) are the main effectors of RhoA. This work also studied the ROCKs participation in capacitation and acrosomal reaction. Firstly, only ROCK1 was found in guinea pig sperm. And its inhibition shows that this kinase only participates in the capacitation but not in the acrosomal reaction. Overall, our results indicate that Cdc42 and RhoA have different roles in capacitation and acrosome reaction processes



## **Introducción**

El espermatozoide es el producto final del proceso de la espermatogénesis que procede de fases mitóticas, meióticas y postmeióticas dentro de los tubos seminales del testículo. Esta serie de eventos culmina en una célula altamente diferenciada en estructura y función, capaz de llevar el genoma haploide masculino al óvulo para que se combine con el genoma haploide femenino y así iniciar el desarrollo de un nuevo organismo. Su estructura inusual y sus características únicas están exquisitamente diseñadas para cumplir este propósito. (Eddy, 2006).

Dentro de la fase post-meiótica, se lleva a cabo el cambio de espermatidas a espermatozoides por medio de la formación del acrosoma, la condensación nuclear, el desarrollo del flagelo y la pérdida de la mayoría del citoplasma, estos cambios se llevan a cabo dentro de los tubos seminíferos, todo esto caracteriza al espermatozoide como una célula altamente diferenciada en estructura y función lo que le permitirá que pueda adherirse y fusionarse con el óvulo (Kadam et al. 2007).

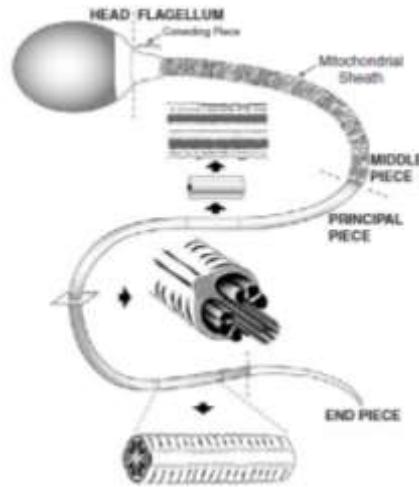
## **Morfología del espermatozoide**

El espermatozoide está compuesto de dos secciones principales, la cabeza y el flagelo, unidos por la pieza conectora (Fig. 1).

El flagelo se compone de 3 regiones (Fig. 1) (Eddy, 2006):

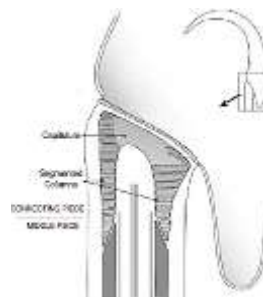
- La pieza media es el primer segmento del flagelo, contiene las mitocondrias que rodean a las nueve fibras densas exteriores y el axonema, ellas proporcionan parte de la energía que mantiene la motilidad, necesaria para que el esperma alcance al óvulo. Las fibras densas y el axonema forman parte de la maquinaria para generar y regular la motilidad.
- La pieza principal, contempla la mayor parte de la longitud del flagelo, se compone de un complejo de microtúbulos (9+2) que forman el axonema, el cual está a su vez rodeado por fibras densas externas que se extienden del cuello hasta la pieza principal. En esta sección del flagelo, las fibras densas externas se encuentran rodeadas por la capa fibrosa (Eddy, 2006).

- La pieza final, es la más corta y solo está formada por el axonema.



**Figura 1. Estructura del espermatozoide.** Dividido en cabeza y flagelo, que a su vez presenta la pieza media rodeada por las mitocondrias, la pieza principal y la pieza final que están compuestos por el complejo de microtúbulos (Eddy, 2006).

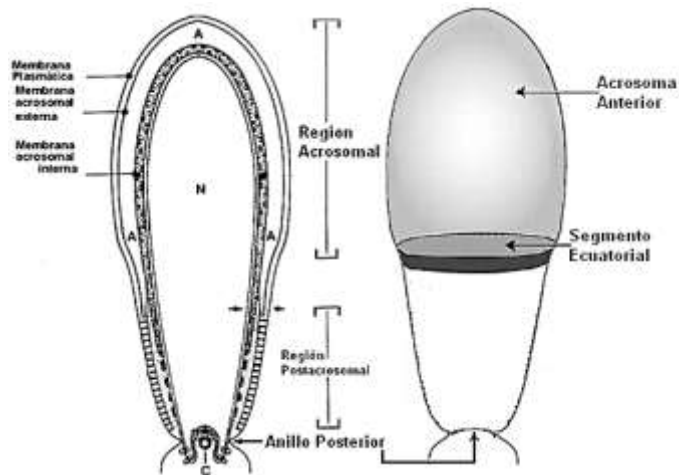
La pieza conectora es el componente espermático que une a la cabeza con el flagelo y cuenta con dos componentes; el capitulum y columnas segmentadas, los cuales permiten la unión de la cabeza y el flagelo del espermatozoide (Fig. 2, Eddy, 2006).



**Figura 2. Pieza conectora y sus componentes.** Los cuales permiten la unión entre la cabeza del espermatozoide y el flagelo (Eddy, 2006).

La cabeza cuenta con un núcleo que contiene los cromosomas altamente condensados, esto por la presencia de proteínas llamadas protaminas que se asocian fuertemente al ADN. El núcleo está rodeado por estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma denominado como teca perinuclear (TP).

En la cabeza también encontramos al acrosoma, una vesícula cuyo origen está en el complejo de Golgi y el cual contiene una matriz formada principalmente por enzimas de tipo lítico; glicohidrolasas, proteasas, fosfatasas, esterases y arilsulfatasas (Fig. 3.) (Abou-Haila and Tulsiani, 2000).



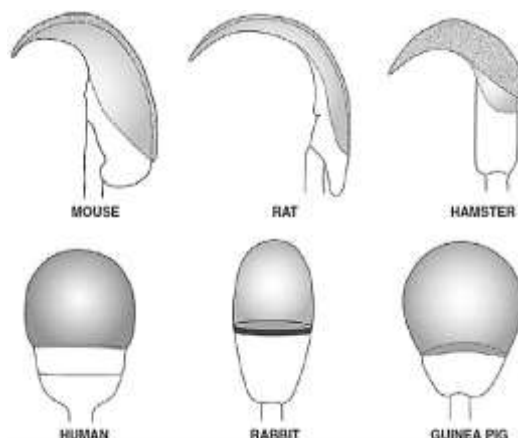
**Figura 3. Esquema de la cabeza del espermatozoide.** Internamente cuenta con un núcleo (N), un acrosoma (A). Este último está compuesto por la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa y a su vez está rodeado por la membrana plasmática. La cabeza puede dividirse en tres regiones o dominios: la región acrosomal, el segmento ecuatorial y la región postacrosomal (Eddy, 2006).

La mayoría de los espermatozoides en mamíferos tienen las características generales antes mencionadas, existiendo diferencias en la forma de la cabeza y la longitud del flagelo en las diferentes especies; los espermatozoides de invertebrados, usualmente tienen cabeza con el acrosoma y un flagelo con axonema y mitocondrias, pero carecen de estructuras como las fibras densas externas y la capa fibrosa (Eddy, 2006).

Mientras que en los espermatozoides de los mamíferos encontramos 4 tipos diferentes de cabeza de (Fig. 4) ( Yanagimachi, 1994; Dvorakova et al. 2005)

- Espátula (Jabalí, toro y conejo)
- Ovoide (Primates y Humanos)
- Forma Falciforme (mayoría de los roedores)

- Espermatozoides con regiones acrosomales grandes (Cobayo y ardilla gris)



**Figura 4. Diferentes formas de cabeza de los espermatozoides.** Ejemplo la cabeza en forma espatulada se encuentra el conejo, de forma ovoide un ejemplo es el espermatozoide de los humanos. De la forma falciforme es representante de espermatozoides de ratón, rata y hámster. Con regiones acrosomales grandes como ejemplo son los espermatozoides de cobayo (Eddy, 2006).

## Capacitación

La capacitación es un fenómeno complejo que ocurre *in vivo* en el tracto genital femenino, es una combinación de procesos que suceden en secuencia o paralelamente. La capacitación se ha descrito como una etapa de maduración, la cual le proporciona a los espermatozoides las habilidades de fecundar al óvulo, al permitirles alterar su motilidad; de una motilidad progresiva los espermatozoides pasan a una motilidad hiperactivada (hipermotilidad).

Así mismo, la capacitación permite a los espermatozoides experimentar la reacción acrosomal y los habilita para adherirse y fusionarse a la membrana plasmática del óvulo (Signorelli et al. 2012; Liu et al. 2005; Correa et al. 2007). Las secuencias de los cambios en la capacitación se han dividido en dos etapas:

- Eventos rápidos: comprenden la activación de movimientos vigorosos y asimétricos de los flagelos y que pueden ocurrir a los pocos segundos después de que el espermatozoide sea eyaculado debido a las altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , presentes en el líquido seminal y en el líquido uterino (Bernabo et al. 2011).

- Eventos lentos: comprenden cambios en el patrón de movimiento (hiperactivación o hipermotilidad) así como la habilidad de llevar a cabo la reacción acrosomal. Esta etapa es marcada por la remoción del colesterol de la membrana y por un incremento intracelular significativo de bicarbonato y  $\text{Ca}^{2+}$  (Signorelli et al. 2012).

Es importante que primero ocurran ciertos eventos, iniciando con una señalización rápida que es esencial para que posteriormente los eventos lentos se desarrollen. Al parecer estos eventos son regulados por moléculas similares:  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , adenilato ciclasa soluble (ACs), segundos mensajeros como AMPc o GMPc, proteínas cinasas A y C (PKA y PKC). Los cambios que sufren los espermatozoides durante la capacitación son a nivel metabólico, bioquímico y molecular, y ellos se llevan a cabo tanto en la cabeza como en la cola, algunos de estos son los siguientes:

- La remoción del colesterol de la membrana plasmática, teniendo como consecuencia un incremento en la fluidez de la membrana y del transporte de iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Cl}^-$  (Salicioni et al. 2007).
- El aumento del metabolismo que se observa como un decremento del contenido intracelular de ATP, lo que significa un incremento en el consumo de ATP y por tanto se requiere de un incremento en la producción de esta molécula. (Lang et al. 1996)
- El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$  intracelulares debido al cambio en la permeabilidad de la membrana, trayendo como consecuencia la activación de la ruta de señalización ACs/adenosín monofosfato cíclico/proteína cinasa A (ACs/AMPc/PKA) y de las proteínas tirosina cinasas (PTKs), lo cual conlleva a la fosforilación de proteínas en tirosina y al incremento del pH intracelular. ( Yanagimachi, 1994; Visconti and Kopf, 1998; Signorelli et al. 2012, Liu et al. 2005).

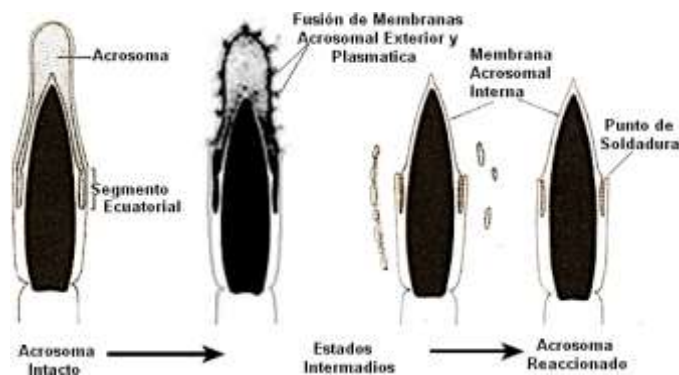
- La translocación de fosfolípidos como fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) en la membrana plasmática de la región acrosomal, realizado por una posible actividad de "escramblasa" inducida por el incremento intracelular del  $\text{HCO}_3^-$  y con la consecuente activación de la vía ACs/AMPC/PKA (Travis and Kopf 2002).
- La hiperpolarización de la membrana plasmática, requerida para la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, requeridos para la reacción acrosomal (Travis and Kopf 2002).
- El cambio de localización de proteínas de superficie, como efecto del incremento en la fluidez de la membrana y que es consecuencia de la sustracción de colesterol. (Salicioni et al. 2007).
- Incremento de la polimerización de actina con la consecuente remodelación del citoesqueleto de actina, especialmente en la región acrosomal y en el flagelo (Hall 1998; Breitbart et al. 2005).
- La direccionalidad de la motilidad en respuesta al gradiente de agentes químico y termo atrayentes (Sun et al. 2005).
- Como evento final, la adquisición de la hiperactivación de la motilidad, la cual es indispensable para que los espermatozoides atraviesen las envolturas del óvulo: *cumulus ophorus* y zona pelúcida (Breitbart et al. 2005; Chen et al. 2013; Lessey et al. 2012; Lu et al. 2015; Rattanachan et al. 2014; Salicioni et al. 2007; Sun et al. 2005).

### **Reacción acrosomal**

La reacción acrosomal (RA) en los espermatozoides de los mamíferos es la culminación de una red de señalización llevada a cabo en la capacitación, siendo este un proceso indispensable para la fertilización y que se lleva a cabo después de la unión de un espermatozoide capacitado con las envolturas del óvulo (cubierta de células de la granulosa y la zona pelúcida) presentándose como un proceso de

exocitosis regulada dependiente calcio. (Breitbart et al. 2005; Delgado-Buenrostro et al. 2005)

La RA implica la fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Fig. 5), para posteriormente liberar el contenido acrosomal, que contiene una variedad de proteínas con diferentes actividades hidrolíticas: glicohidrolasas esterases, arilsulfatasas péptido bioactivados, acrosina, tripsina, catepsina y otras proteínas con funciones inciertas. Durante la RA también se exponen dominios de membrana nuevos, los cuales son indispensables para la fertilización (Abou-Haila and Tulsiani 2000; Brener et al. 2003).



**Figura 5. Reacción Acrosomal.** Se esquematiza la secuencia que sigue un espermatozoide con acrosoma intacto a un espermatozoide reaccionado, por medio de la fusión de membrana plasmática y membrana acrosomal externa (Eddy, 2006).

### **El papel del citoesqueleto de actina en la fisiología espermática**

Diferentes proteínas conforman el citoesqueleto en los espermatozoides de los mamíferos, entre estas están incluidas actina, proteínas asociadas a actina (actin binding proteins), distrofinas, espectrina, tubulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), así como otras propias de los espermatozoides como son: calicina, proteína básica mayor y proteínas de las fibras densas (Mújica et al., 2003).

La actina es la proteína estructural más abundante del citoesqueleto espermático y ha sido localizada en las regiones acrosomales, pieza media y en la pieza principal de los espermatozoides no capacitados, en las diferentes especies de mamíferos donde se ha estudiado. (Mujica et al. 2003; Kadam et al. 2007).

En el caso de la actina-F. esta se ha reportado en varias especies de mamíferos incluyendo; hámster, cerdo, humano, toro, conejo y cobayo, (Castellani-Ceresa et al. 1993; Brener et al. 2003; Breitbart et al. 2005; Delgado-Buenrostro et al. 2005; Kubo et al. 2008; Pireddu et al. 2012). Un paso importante de la capacitación es la polimerización de actina que conlleva la remodelación del citoesqueleto (Brener et al., 2003).

En los espermatozoides de los mamíferos se ha localizado actina-F en el espacio intermembranal asociada a las MP y MAE, en las regiones ecuatoriales y postacrosomales, además del flagelo (Mujica et al. 2003). La presencia de actina juega un papel muy importante en el espermatozoide:

1. Fisiología espermática: el citoesqueleto participa en la regulación de procesos como motilidad espermática y la reacción acrosomal. Se ha reportado que la polimerización de actina es importante para la iniciación de la movilidad durante la maduración post-testicular. Por lo que el espermatozoide es muy dependiente de la organización del citoesqueleto (Breitbart et al. 2005; Kadam et al. 2007; Pireddu et al. 2012).
2. Mantenimiento de la morfología, la cual es regida por una red elaborada de elementos del citoesqueleto. También se ha sugerido que la actina-F participa en el mantenimiento o movilidad de componentes en la superficie del espermatozoide. (Sanchez-Gutierrez et al. 2002; Mujica et al. 2003; Kadam et al. 2007; Itach et al., 2012).

Se ha sugerido que la membrana plasmática de espermatozoides de mamíferos es un mosaico de distintos dominios y durante la capacitación se lleva a cabo la organización de proteínas de la membrana plasmática, a través de los elementos del citoesqueleto asociados a actina. Durante la capacitación es necesaria la polimerización de actina en las regiones: apical del acrosoma, ecuatorial y posacrosomal del espermatozoide de cobayo. Una vez sucedida la capacitación, los espermatozoides son capaces de unirse a la zona pelucida, la cual a través de su proteína ZP3 induce un incremento rápido en el calcio intracelular, que activa a la fosfolipasa D, la cual hidrolisa a fosfolípidos, como fosfatidilcolina, en diacilglicerol



(DAG) e inositol trifosfato (IP3). Este último activa el receptor de IP3 (IP3R) localizado en la membrana acrosomal externa resultando en un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). El alto incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , activa proteínas que fragmentan a los filamentos de actina, como son gelsolina y escinderina, de esta forma se desestructura la barrera de actina-F localizada entre las membranas acrosomal externa y plasmática, permitiendo que estas membranas se acerquen y fusionen, lo que permita la liberación del contenido acrosomal (Castellani-Ceresa et al. 1993; Brener et al. 2003; Breitbart et al. 2005; Delgado-Buenrostro et al. 2005; Kubo et al. 2008; Kalwat et al., 2012; Pireddu et al. 2012).

### **Mecanismo de polimerización de actina en los espermatozoides de los mamíferos**

Para elucidar la importancia de la remodelación de actina en la capacitación y RA, los espermatozoides han sido tratados con drogas inhibitoras de la polimerización de actina, como son Citocalacina D (CytD) o latrunculina A (LatA). Los principales efectos observados son un incremento en la RA y un decremento en la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Castellani-Ceresa et al. 1993; Sanchez-Gutierrez et al. 2002; Breitbart et al. 2005; Delgado-Buenrostro et al. 2005). Con respecto a este último efecto, los espermatozoides son capaces de adherirse al óvulo pero no de fusionarse a la membrana plasmática (Castellani-Ceresa et al. 1993; Sanchez-Gutierrez et al. 2002; Breitbart et al. 2005; Delgado-Buenrostro et al. 2005), efecto que podría estar relacionado tanto con CytD como LatA, y que al inhibir la polimerización de actina no permiten la migración de diferentes proteínas asociadas a la membrana plasmática, un ejemplo muy importante es el relacionado con la proteína Izumo que regula la fusión del espermatozoide con el óvulo, y cuya migración de la membrana acrosomal interna a la membrana plasmática del segmento ecuatorial, depende de una correcta polimerización de actina (Sosnik et al., 2009; Sebkova et al., 2013).

A pesar de que los mecanismos que regulan los procesos de polimerización de la actina-G y despolimerización de la actina-F son conservados en las células somáticas, poco se sabe de cómo estos procesos son regulados en los espermatozoides y de sus efectos sobre la fisiología espermática. Es importante considerar que la formación de nuevos filamentos de actina requiere de la remodelación del citoesqueleto, es decir de procesos de despolimerización y polimerización de actina, como los observados en los espermatozoides de cobayo. Se han propuesto diferentes mecanismos para la remodelación de actina, en los trabajos del grupo de Breitbart se ha sugerido que la polimerización de actina dependiente de la fosfolipasa D (PLD), que se produce a través de la vía  $\text{HCO}_3^-/\text{AMPc}/\text{PKA}$  o por la vía del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) (receptor LPA) /PKC. (Brener et al., 2003; Delgado-Buenrostro et al., 2005)

Uno de los GPCRs en el espermatozoide es el receptor LPA que puede ser activado por LPA, resultando en la activación de PKC y la polimerización de actina dependiente de PLD. MAP-cinasa (MAPK), Tirosinas cinasas (TK) y el factor de ADP-ribosilación (ARF) han sido involucrados en la activación de PLD, resaltando en la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) para la producción del ácido fosfatídico (PA), que media la polimerización de actina-G a actina-F. La unión de un espermatozoide capacitado a la zona pelucida del ovulo activa la PLC de esperma para hidrolizar el PIP2 a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). (Breitbart et al. 2005; Dicummon and Berger 2006).

Otros estudios proponen que la polimerización y remodelación del citoesqueleto de actina son regulados por proteínas GTPasas de la familia Rho, especialmente Cdc42, la cual mediante proteínas de la familia WASP y Arp2/3, o PLD1 podrían polimerizar a actina (Delgado-Buenrostro et al. 2005; Etkovitz et al. 2007; Finkelstein et al. 2013). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que Cdc42 regula la actividad de PLD1 durante la capacitación y que la baja expresión de Cdc42 o su inhibición no permiten la polimerización de actina durante la capacitación (Angeles Floriano et al., 2016).

## **Rho GTPasas**

Las Rho GTPasas son proteínas G monoméricas de aproximadamente 20 kDa pertenecen a la superfamilia de Ras. Cuentan con un dominio de unión a GTP y GDP por lo que tienen una actividad de GTPasa intrínseca. La familia está formada por 22 miembros, algunas con isoformas múltiples entre los cuales están las proteínas Rho (isoformas A, B, C), Rac (isoformas 1, 2, 3), Cdc42 (isoformas Cdc42Hs, G25K), Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rnd3/RhoE, RhoD, RhoG, Tc10 y TTF (23, 5), siendo las tres primeras las mejor caracterizadas. (Mulloy et al. 2010; Aspenstrom 1999; Ridley 2006).

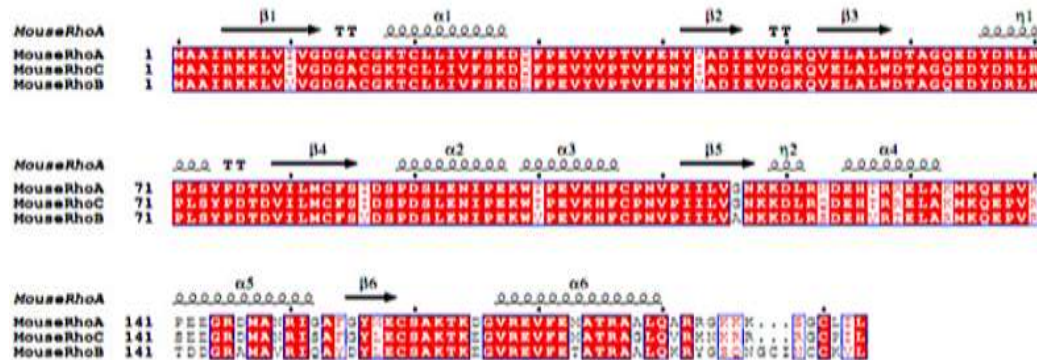
Las Rho GTPasas están involucradas en diferentes funciones celulares como es la expresión de genes, donde las Rho GTPasas regulan varias vías de transducción de señales y permite las alteraciones en la expresión de genes. También afectan la transcripción de genes a través de vías de traducción, sin involucrar al citoesqueleto de actina. Son capaces de activar a JNK y la vía de p38 MAP cinasas. También regulan la actividad enzimática, debido a que un gran número de actividades enzimáticas son influenciadas por las Rho GTPasas. Las Rho GTPasas regulan el Ciclo Celular, participan en la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas durante la fase G1 y en la organización de los microtúbulos y microfilamentos durante fase M. Así mismo las Rho GTPasa contribuyen a la morfogénesis para regular tanto, microfilamentos como microtúbulos y la maquinaria central involucrada en la estabilidad de la polaridad. Además han sido implicadas en el ensamblaje de uniones adherentes (Jaffe and Hall 2005). La mayoría de las Rho GTPasas actúan en las membranas y afectan los movimientos de éstas por cambios del citoesqueleto de actina asociado a la membrana, por lo que su mayor función es la regulación del ensamblaje y organización del citoesqueleto de actina; dichos efectos son regulados por las proteínas Rho, Rac y Cdc42 y sus efectos de estas proteínas se describieron inicialmente en fibroblastos Swiss 3T3 (Aspenstrom 1999; Ridley 2006).

La familia de GTPasa Rho son proteínas estrechamente relacionadas que comparten características particulares, como la capacidad para inducir las fibras de estrés, pero también con funciones únicas, esto sucede en la subfamilia Rho que incluye a RhoA, B, C y G; por ejemplo, debido a que RhoA es requerido para la mitosis en fibroblastos, no pueden ser sustituida por RhoB o RhoC. En algunas situaciones, los miembros pueden tener miembros con funciones opuestas, como ejemplo están los efectos de RhoA y RhoC en migración celular e invasión. De manera similar, RhoB tiene las propiedades de un supresor tumoral, pro-apoptótico, mientras que RhoA y C tienen características cercanas a ser oncogenes (Jaffe and Hall 2005).

Las GTPasas Rho son proteínas que ciclan entre una forma inactiva y una forma activa, estas son reguladas por el factor intercambiador de guanosina (GEFs) que estimulan la liberación de GDP permitiendo la unión del GTP generando un estado activo el cual es capaz de asociarse a sus moléculas efectoras para iniciar la respuesta río abajo y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) que estimula la carga y acelera la hidrólisis del GTP, respectivamente. Además, un inhibidor de la disociación de GDP (GDI) se une a la forma inactiva unida al GDP y evita la disociación de la unión de GDP (Jobichen et al. 2012; Ridley 2006).

Las diferencias para la regulación en la familia de las Rho son mediadas a través de modificaciones post-traduccionales como es la fosforilación directa, ubiquitinación, prenilación (farnesilación o geranylgeranilación) y en algunos caso palmitoilación en el C-terminal o cerca de este en el dominio polibásico, estas modificaciones son críticas para mejorar su interacción con las membranas o definen su localización a comportamientos específicos (Jaffe and Hall 2005; Ridley 2006).

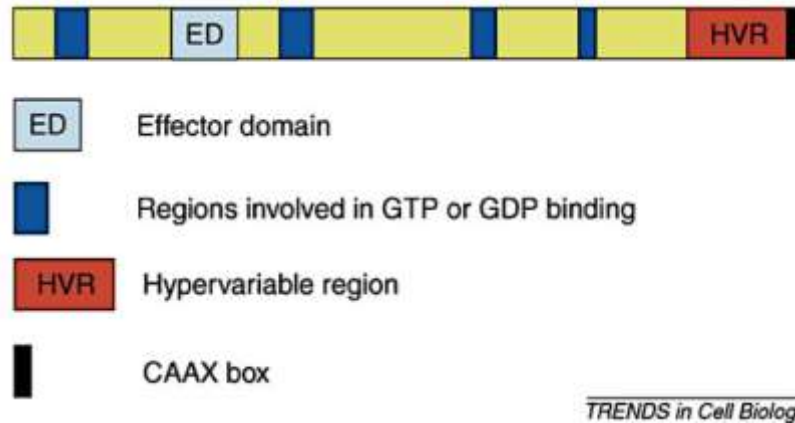
La estructura general de las proteínas Rho muestra que las tres isoformas de la subfamilia cuentan con un 83% de similitud (Fig. 6) (Jobichen et al. 2012; Ridley 2006). Ellas cuentan con cuatro dominios principales: el dominio efector, la región de unión a GTP o GDP, la región hipervariable y la caja CAAX (Fig. 7).



**Figura 6. Alineamientos de la estructura secundaria de RhoA, RhoB y RhoC en ratón.** RhoA, RhoB y RhoC muestran el 83% de similitud de esta familia, mostrando a las Hélices en forma de espirales y las  $\beta$ -plegadas en forma de flecha (Jobichen et al. 2012; Ridley 2006).

La estructura general de las Rho GTPasas muestra que algunas de ellas cuentan con una extensión N-terminal más allá de la estructura del núcleo. Mientras que cerca a la región c-terminal se encuentra la región hipervariable, la cual es diferente entre las diferentes proteínas de la familia. Las tres isoformas de Rho o Rac pueden incluir una región polibásica y/o sitios de palmitoilación. El dominio efector cambia su conformación entre las proteínas Rho unidas a GDP y/o GTP siendo usualmente requerido para la unión a sus blancos rio abajo.

La caja CAAX es crucial para modificaciones postraduccionales, debido a que contiene un residuo de cisteína con capacidad de ser prenilado (grupo geranil o farnesil) y subsecuentemente los tres aminoácidos restantes (2 aminoácidos alifáticos y un aminoácido variable en C-terminal) que son removidos y sustituido con un grupo metilo o pueden sufrir proteólisis. (Ridley 2006).



**Figura 7. Esquema general de las Rho GTPasas**, las zonas en azul marino son los sitios donde se puede dar la unión de GTP o GDP que ayudan a sus estados activos o inactivos de las Rho, El dominio Efector en Azul cielo al sufrir cambios en su conformación permite la unión con el efector. La región hipervariable marcada en rojo es única para cada Rho GTPasa y es lo que genera la diversidad en la familia de las Rho GTPasas. Al final contiene una caja CAAX. En amarillo. (Ridley 2006).

## RhoA

RhoA es un miembro de la subfamilia de las proteínas Rho, juegan un papel significativo en la señalización en la morfogénesis de la célula, desarrollo neuronal, división celular y adhesión (Jobichen et al. 2012). Los estudios realizados en fibroblastos han demostrado que RhoA regula la forma celular y adhesión por el ensamblaje de los microfilamentos de actina contráctiles en fibras de estrés (Ghiaur, Lee et al. 2006). Una célula activada puede inducir la formación de fibras de estrés y cambios en la forma de la célula, ésta puede ser regulada negativamente por PKA dependiente de AMPc (PRKA) y su interacción con miembros de las PKA (AKAP). (Mulloy et al. 1996; Fiedler et al. 2008).

En su forma activa RhoA se une a GTP y se somete a una serie de modificaciones post-traduccionales en su C-terminal que incluyen; isoprenilación, un corte proteolítico en el C-terminal y carboximetilación en el retículo endoplásmico. RhoA procesada es translocada a la membrana plasmática tras su activación, donde se une a motivos fosfatidilserina (Pastey et al. 1999). También se ha observado que puede estar anclada a colas citoplasmáticas de integrinas (Wickstrom et al. 2003), y unidas a su ligando al estar activa (Lessey et al. 2012).

Mientras que en su estado inactivo, se localiza en el citoplasma formando un complejo de RhoA–inhibidor de la disociación de GDP (GDI) (Pastey et al. 1999).

El dominio efector se hace accesible por el cambio conformacional inducido por el GTP en los dos switch (Lu et al. 2015). Estudios estructurales muestran los cambios conformacionales que ocurren en las dos regiones (switch I y switch II) tanto en los estados activos e inactivos. En el switch I abarca de los aminoácidos 28 a 38 o hasta los residuos del aminoácido 42, tienen una densidad bien definida y un movimiento significativo ( $8.9 \text{ \AA}^0$ ). El switch II abarca de los aminoácidos 61 al 78 y cuentan con un movimiento ( $2.9 \text{ \AA}^0$ ), esta región está cerca del sitio de unión a  $\text{Mg}^{2+}$  (Jobichen et al. 2012, Pastey et al. 1999).

El sitio de unión al GTP o al GDP es un “loop” de unión a fosfatos que incluye a los aminoácidos 13 al 29 y el switch I, mientras el “loop” 6 que abarca de los aminoácidos 87 al 90 se ha mostrado la unión de dos clases de cinasas efectoras, representadas por PKN o PRK2 (Proteína cinasa serina/treonina) y la Cinasa Rho (ROKA/ROCK–II/Rho–kinase y ROKb/ROCK–I/p160ROCK), que media la formación de fibras de estrés y transformación celular inducida por Rho (Pastey et al. 1999).

Muchos factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs) pueden activar a múltiples proteínas Rho, incluyendo tanto a RhoA como Rac, puede haber vías donde ambas proteínas son activadas simultáneamente, pero en muchas situaciones la activación de RhoA y Rac1 parecen estar separadas temporal y espacialmente, por lo que en la mayoría de las situaciones las dos proteínas exhiben una relación antagonista que opera en múltiples niveles, y la relación puede ser recíproca o unidireccional. (Guilluy et al. 2011).

RhoA también puede regular a LIMK2 y LIMK1 vía fosforilación dependiente de ROCK, lo cual conduce a la fosforilación e inhibición funcional de cofilina y controlan la estabilidad de los filamentos de actina y que en conjunto con ADF regulan los ciclos de polimerización y despolimerización de actina (Guilluy et al. 2011).

## **Cdc42**

Cdc42 fue originalmente identificada en *Sacharomyces cerevisiae* regulando el ciclo celular en la regulación de la proyección de gemación. En *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*, Cdc42 es requerida para el desarrollo temprano, establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular y morfogénesis en el embrión. Es el tercer miembro de la familia Rho GTPasas, y una principal reguladora del citoesqueleto de actina, controlando movilidad celular, tráfico vesicular, polaridad, transcripción y progresión de ciclo celular, regula la inducción de protuberancias superficiales ricas de actina llamadas filipodias. (Hall 1998; Arias-Romero & Chernoff 2013; Farhan H, Hsu VW 2016).

También tiene un papel central en la regulación de exocitosis a través de la activación de las proteínas SNARE y polimerización de actina. Su función normalmente se ha atribuido en la membrana plasmática. Sin embargo, Cdc42 también existe en el complejo de Golgi. (Hall 1998; Arias-Romero & Chernoff 2013; Farhan H, Hsu VW 2016)

Cdc42 es regulada positivamente por un gran número de GEF, por ejemplo, la proteína Dbl, que se descubrió por primera vez como un oncogén hace más de 20 años, es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para Cdc42 (Arias-Romero & Chernoff 2013).

Cdc42 se muestra como un regulador esencial del balance entre mielopoiesis y eritropoiesis. La desregulación de Cdc42, así como, su regulador y efectores, se han relacionado a una serie de desórdenes y enfermedades. La sobreexpresión de Cdc42 es observado en varios cánceres, y está relacionada a un diagnóstico adverso. Como un regulador de ambos arquitectura y movilidad celular. La desregulación de Cdc42 también está relacionada a la metástasis tumoral. (Mulloy et al. 2010; Arias-Romero & Chernoff 2013; Murphy, Mott, Owen 2021)



La supresión de Cdc42 en células transformadas resulta en una disminución en la progresión del ciclo celular y por lo tanto en la proliferación celular. La desregulación de Cdc42 también está relacionada a metástasis tumoral. Las mutaciones en Cdc42, en si, raramente son encontradas en cáncer, sin embargo, alteraciones a sus reguladores han sido ampliamente caracterizadas con varios GEFs identificados como oncogenes y algunos GAPs como supresores tumorales. Cdc42 y otros componentes de la vía de señalización representan objetivos potenciales de terapias contra cáncer. (Mulloy et al. 2010; Arias-Romero & Chernoff 2013 y Murphy, Mott, Owen 2021)

### **GAP y GEF de las RhoGTPasas**

Como anteriormente se mencionó la forma de regulación de las RhoGTPasas es mediante los GAP (Proteínas activadoras de GTPasas), GEF (Factor Intercambiador de guanosina) y GDI (Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanosina). Se han descrito cerca de 10 proteínas activadoras de GTPasa, tres GDI, y 15 GEFs. Los mecanismos por los cuales los GEFs se activan con receptores de membrana aún no están muy claros, aunque su actividad de intercambio esta codificado en su dominio DH (Dbl homology) y es notable que en todos los GEFs, el dominio DH puede activar potencialmente a una o varias Rho GTPasa, dependiendo de su especificidad por la GTPasa. Posteriormente está el dominio de Homología Pleckstrina (PH), que puede jugar un papel importante en la localización de membrana mediante interacciones con lípidos. El dominio PH se piensa que media la localización a través de la unión de lípidos, pero además, las pruebas estructurales y bioquímicas sugieren que también podría afectar directamente la actividad del dominio DH (Chen et al.2013; Ridley 2006, Anderson and Hamann 2012).

Se han descrito a GEFs como proteínas con multidominios que regulan de una manera compleja, que pueden incluir interacciones proteína–proteína, proteína–lípidos, unión a un mensajero secundario y modificaciones postraduccionales de los GEFs. (Guilluy et al. 2011; Aspenstrom 1999; Ridley 2006).

Estas interacciones o modificaciones pueden inducir translocaciones de los GEF a sitios de localización de proteínas G pequeñas, liberación de la auto-inhibición, o activación conformacional alostérica de la región catalítica (Lim et al. 2008).

Todos los efectores de las Rho GTPasas tienen múltiples dominios y algunos de estos pueden regular su actividad utilizando las diferencias en la conformación entre las formas unidas a GDP o GTP, y estas son principalmente restringidas a dos "loops", llamados regiones Switch I y II. Aunque también interactúan con otras regiones de la proteína Rho para realizar su función. Los RhoGEFs al unirse a ambas regiones de los switch de la GTPasas tienen solapamiento en los sitios de unión con los GAPs, GDIs y efectores. (Guilluy et al. 2011; Aspenstrom 1999; Ridley 2006).

Unos ejemplos de RhoGEFs son Leukemia-associated RhoGEF (LARG) y p190RhoGEF, los cuales activan específicamente a RhoA, RhoB y RhoC, esta especificidad es mediada a través de interacciones electrostáticas y en la determinación por residuos de carga negativa Asp45 y Glu54. Estos residuos están localizados entre las regiones del switch I y II, subrayando la noción que los residuos fuera de estas regiones también contribuyen para la señalización específica. Además, otros residuos fuera del switch II, la Asp75 en la hélix- $\alpha$ 2 de RhoA/B/C, es también crucial para la unión de LARG. (Guilluy et al. 2011; Aspenstrom 1999; Ridley 2006).

Se ha demostrado que las RhoGTPasa interactúan con RhoGAPs a través del P-loop, las regiones del switch I y switch II. Uno de los GAPs descritos es p190GAP el cual se activa mediante fosforilaciones o desfosforilación de la Tyr1105, a través de Src, cAbl o las tirosinas fosfatasa como SHP2, PTP-PEST o LMW-PTP, el cual se observó en células tratadas con endostatina (fragmento de colágeno tipo XVII). Cuando endostatina se une a la integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, es translocada a una fracción de las balsas lipídicas (lipid rafts), interactuando río abajo con caviolina-1 asociada a Src e induciendo la fosforilación de p160GAP dependiente de Src, ocasionando

una regulación negativa de RhoA y generando fibras de estrés (Wickstrom et al. 2003; Anderson and Hamann 2012; Schaefer et al. 2014).

Las proteínas Rho también son reguladas por otros miembros de GTPasas pequeñas, llamadas proteínas Rnd, las cuales tienen un estado de unión a GTP constitutivo y son conocidas que actúan como activador de p190RhoGAP a través de las uniones a esta y como antagonistas de RhoA. También pueden regular su nivel de expresión, y sus modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, localización subcelular y degradación proteosomal (Anderson and Hamann 2012; Artamonov et al. 2015).

Se ha observado que la activación de FAK por integrinas facilita el reclutamiento de las proteínas tirosinas cinasas de la familia de Src en el complejo de señalización de las adhesiones focales. La fosforilación de tirosinas mediante FAK o Src de varios RhoGEFs o GAPs es asociada con la activación RhoA (Lim et al. 2008; Anderson and Hamann 2012). Por otra parte, P190RhoGEF también depende de la unión a FAK para las fosforilaciones en tirosinas, a diferencia de otros GEFs citoplasmáticos que pueden activar a RhoA, la habilidad de p190GEF para estimular RhoA es asociado con la unión FAK–Pyk2, fosforilación de tirosinas, o localización de adhesiones focales. 190GEF contiene un tándem central de dominio de homología de pleckstrin-Dbp, una región rica de leucina en el N-terminal, un dominio de dedos de zinc ricos en cisteína, un dominio C-terminal grande con una región potencial coiled-coil de unión a microtúbulos (Lim et al. 2008). Otra forma de regulación de la familia de las Rho es mediante fosforilaciones, en RhoA-GTP en la que se ha observado que si es fosforilada cerca del C-terminal por PKA, esto inhibe su función al disminuir su asociación con la membrana plasmática, mejora su afinidad por su RhoGDI y la protege de su degradación. (Jobichen et al. 2012; Ridley 2006).

Finalmente, la mayoría de las RhoGTPasas se unen a proteínas chaperonas, llamadas inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (RhoGDI), que son proteínas citosólicas que carecen de actividad enzimática. GDIs retienen a las RhoGTPasas en su conformación inactiva, secuestrándolas de la membrana celular evitando su unión a efectores y protegiéndolas de su degradación proteolítica. Los GDIs consisten dos dominios; el dominio regulador N-terminal que interactúa con las regiones del switch I y switch II de la GTPasa. El dominio C-terminal, que es requerido para la extracción de membrana de la GTPasa, uniéndose a la región del switch II, el  $\alpha$ -3-helix, sitio de anclaje lipídico. Estudios estructurales y bioquímicos identifican a Thr37, Tyr66, Arg68, Leu69 y Leu72 en RhoA como residuos clave para la unión al GDI (Anderson and Hamann 2012; Schaefer et al. 2014; Artamonov et al. 2015).

### **Proteínas efectoras de las proteínas Rho**

Las proteínas Rho activas regulan la actividad de diferentes vías de señalización a través de la unión a sus diferentes efectores, algunos pertenecen a las proteínas cinasa como la familia de ROCK, PAK, Citron/cinasa Citron, PRK1 (PKN) y PRK2. Hay otros que no pertenecen a las cinasas como Rhophilin, Rhotekin y p140Dia. (Aspenstrom 1999)

### **Proteína Cinasa N (PKN)**

Pertenece al subgrupo de la Proteína Cinasa C (PKC) de la familia de las cinasas, esta ampliamente distribuida en organismos eucarióticos, como estrellas de mar, anfibios, insectos y mamíferos. En vertebrados se han descrito tres diferentes isoformas de PKN: PKN1 (PKN PRK1/PAK-1), PKN2 (PKN gamma/PRK2/PAK-2) y PKN3 (PKN beta/PRK3). (Ferreira et al. 2014; Thauerer et al. 2014)

Las tres isoformas comparten la misma estructura de dominio general. En la región N-terminal tiene un papel importante en la regulación de las PKN's, esta abarca un dominio repetido conservado, denominado HR1a-c (por repetición de homología, también conocido como ACC1-3), así como un dominio HR2/C2. Las PKN's interactúan con las RhoGTPasas (Rho y Rac) mediante la región HR1. Las

proteínas RhoGTPasas se unen a PKN, se induce un cambio conformacional que permite la unión a la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1), la cual fosforila a PKN en loop de activación y estimula su actividad de proteína cinasa.(Thauerer et al. 2014).

Aunque la función molecular precisa todavía es desconocida, se han asociado con la formación de fibras de estrés, la reorganización de actina cortical durante la migración celular, la reorganización de la adhesión célula–célula y la formación de uniones apicales; además al control de la entrada mitótica y la salida a la citocinesis e importantemente a la progresión e invasión tumoral, migración celular, adhesión celular, transporte vesicular, apoptosis y transporte de glucosa. La literatura nos indica que más de 20 proteínas y varios péptidos son fosforilados por PKN1 y PKN2, incluyendo proteínas del citoesqueleto como  $\alpha$ -actina y vimentina, (Thumkeo et al. 2013; Ferreira et al. 2014; Thauerer et al. 2014)

Se han descrito datos que unen a PKN1 a varias vías que inducen estrés, en la migración y división del musculo liso, sobrevivencia del miocito cardiaco, organización de neurofilamentos y del transporte axonal en neuronas y la adhesión célula–célula en queratinocitos. PKN2 está involucrada en la organización del citoesqueleto de actina, principalmente a través de la Rho GTPasas, en la formación de uniones apicales en células epiteliales bronquiales, así como entrar y salir del ciclo celular en células Hela. PKN2 también juega un papel junto a Fyn en el control de la adhesión célula–célula en queratinocitos y la maduración de uniones apicales. PKN3 está involucrada en la regulación de uniones adherentes en células endoteliales y el crecimiento de células de cáncer maligno de próstata, también ha sido identificada como un efector requerido para el crecimiento de células malignas, rio abajo de la activación de PI3K. Aunque el mecanismo molecular detallado de la mayoría de estas acciones sigue sin ser claros. (Thumkeo et al. 2013; Thauerer et al. 2014).

### **Proteína de mamíferos homologa a la proteína Diáfana de Drosophila (mDia)**

Las forminas se han convertido en los principales reguladores de actina-F y la dinámica del citoesqueleto de los de microtúbulos y son proteínas efectoras de las Rho GTPasa. La familia de las forminas incluye la isoforma de FRL, FHOD y Formina 1, también están implicadas en la regulación de la plasticidad migratoria y la interconversión entre mesénquima y la habilidad ameboide células tumorales.(Thumkeo et al. 2013; Pettee et al. 2014)

Otro miembro de la familia de las forminas son Las proteínas mDia fue originalmente identificada como un efector de Rho que induce la regulación las redes de actina-F fundamentales para el mantenimiento de integridad de estructuras epiteliales multi-celulares lejos de contactos célula-célula y trabaja cooperativamente con ROCK para regular la formación de fibras de estrés en cultivo celulares. (Lessey et al. 2012; Pettee et al. 2014).

Las forminas mammalian Diaphanous (mDia) tiene tres isoformas (mDia 1-3) los cuales tienen papeles críticos en diversas actividades celulares, incluyendo la transcripción de genes, progresión del ciclo celular y transporte de membranas (Lessey et al. 2012; Thumkeo et al. 2013; Pettee et al. 2014). mDia contiene un potente regulador dinámico, el dominio FH1 que tiene la habilidad de unirse a profilina y que es requerido por mDia para el alargamiento de los filamentos de actina. También contienen una secuencia RBD/FH en su región N-terminal, que en turno contiene un dominio de unión a Rho (RBD), 4 repetidos Arm, denominados dominios inhibitorios Dia (DID), un dominio Dimerizador (DD) y una región coil-coiled putativa. mDia-1 que solo puede ser activado por Rho (RhoA-C), mientras mDia-2 y mDia-3 puede ser activado por Rac y Cdc42. Miembros de la familia proteínas Dial son reguladores clave de fundamentales procesos celulares impulsados por actina, que son conservados desde levaduras hasta humanos.(Lu et al. 2015).

mDia1 promueve la formación de fibras de estrés de actina en cultivos celulares y es involucrada en formación de filipodios. También es involucrada en el mecanismo de traducción, polarización celular y migración de ciertas líneas celulares, angiogénesis en cultivos primarios de neuronas glanurales del cerebelo y secreción de vesículas exocrina en la membrana apical. Por otra parte, mDia2 mostro ser una isoforma de mDia que es involucrada en la formación de filipodias y citocinesis en cultivos celulares. mDia2 también está involucrada en el desarrollo de células rojas y el trafico endosomal en cultivos de fibroblastos. Finalmente, la isoforma mDia3 fue reportada que es indispensable para el alineamiento cromosomal normal en células Hela. Y las funciones celulares de mDia3 aparte del control de alineamiento del huso no están bien establecidas, pero hay reportes que sugieren el involucramiento de mDia3 en la endocitosis. (Thumkeo et al. 2013; Lu et al. 2015).

### **Rhophilin**

Rhophilina es una molécula efectora de RhoA que se clono por primera vez en 1995, a la fecha se conocen dos isoformas en células de mamíferos: Rhophilin-1 (ROPN1) y Rhophilin-2 (ROPN2). Rhophilin-1 es altamente expresado en testículos, riñón y en un nivel inferior en cerebro y estómago. En mamíferos, ROPN1 y el ortólogo ROPN2 fue localizada en esqueleto fibroso del esperma y encontramos que interactúa con AKAP3 (A-kinase anchor protein 3) a través del dominio localizado en el N-terminal. (Thumkeo et al. 2013; Rattanachan et al. 2014).

Se ha sugerido que Rhophilin-2 puede estar involucrada en el proceso secretorio de la tiroides, basada en la evidencia que la expresión de Rhophiln-2 está sobre regulada positivamente por la estimulación de TSH en tiroides en cultivo celular. Sin embargo, un análisis extensivo no encuentra una función clara de Rhophil-2 en la fisiología de la tiroides. (Thumkeo et al. 2013)

## **Rhotekin**

Rhotekin es una proteína scaffold que interactúa con RhoA y RhoC de igual manera, contiene un motivo de unión consenso para proteínas de clase PDZ, identificado inicialmente en un blanco putativo de Rho y puesto que se ha mostrado para la unión de múltiples proteínas en la polaridad celular, adhesión focal y organización de septinas. Uno de los estudios recientes muestra que Rhotekin es un sustrato de la proteína cinasa D y que la fosforilación de Rhotekin regula la actividad de Rho en fibroblasto. (Chen et al. 2013).

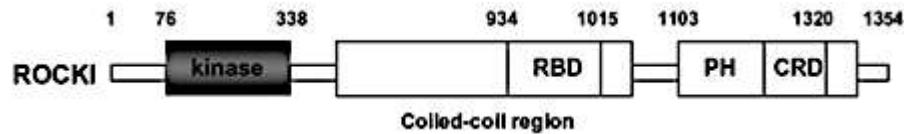
Se conocen dos isoformas de Rhotekin; Rhotekin-1 y Rhotekin-2. Rhotekin1 es involucrado en el crecimiento del axón, regulación de sinapsis neuronal, diferenciación de células troncales neurales, organización de septinas en la línea de fibroblastos y la resistencia a apoptosis en la línea celular de cáncer gástrico. Por otra parte, Rhotekin-2 fue reportado involucrado en la resistencia de apoptosis de los linfocitos.(Thumkeo et al. 2013).

## **Rho-Cinasa (ROCK)**

Es una proteína Cinasa Serina/treonina de aproximadamente 150-160kDa, en células somáticas al ser activada mediante transfosforilaciones en su amino-terminal por las proteínas de la familia Rho puede participar en diferentes funciones como: en la contratación, citocinesis, motilidad, adhesión celular, proliferación, citocinesis y angiogénesis, todo esto mediante la reorganización del citoesqueleto de actina. (Lessey et al. 2012; Kubo et al. 2008, Pireddu et al. 2012).

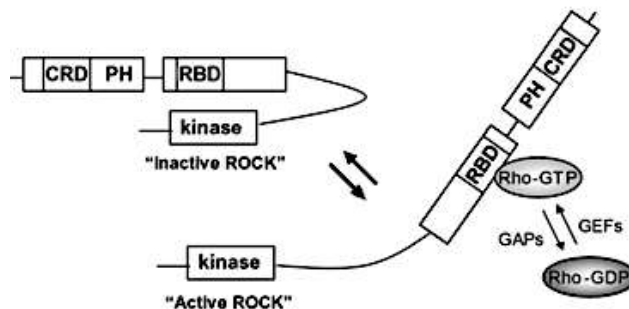
ROCK tiene dos isoformas, ROCKI (conocida como ROK $\beta$ , p160ROCK) y ROCKII (conocida ROK $\alpha$ , Rho kinase), entre ellas muestran 65% de similitud en su secuencia aminoácidos y 92% de identidad en sus dominios cinasa (Lim, Lim et al. 2008), el cual en ambos ROCK se encuentra en el amino terminal. Seguido por un dominio coiled-coil que contiene un sitio de unión a Rho (RBD) y un dominio homólogo a pleckstrin (PH) con un dominio intermedio rico en cisteína (CRD) en el carboxilo terminal (Fig. 8) (Kubo et al. 2008).





**Figura 8. Esquema de ROCK.** En el cual se muestra a su dominio cinasa seguido por la región coiled coil la cual contiene el sitio RBD, seguido por un dominio de homología a pleckstrina, con un dominio interno rico en cisteína. (Kubo et al. 2008).

El dominio carboxilo forma un bucle de auto-inhibición que se pliega de nuevo en el dominio catalítico y reduce su actividad, se sugiere que la Rho unida a GTP, activa a ROCK por su unión a su dominio RBD, contrarrestando su interacción de inhibición entre el dominio catalítico y el carboxilo terminal (Fig. 9) (Kubo et al. 2008).

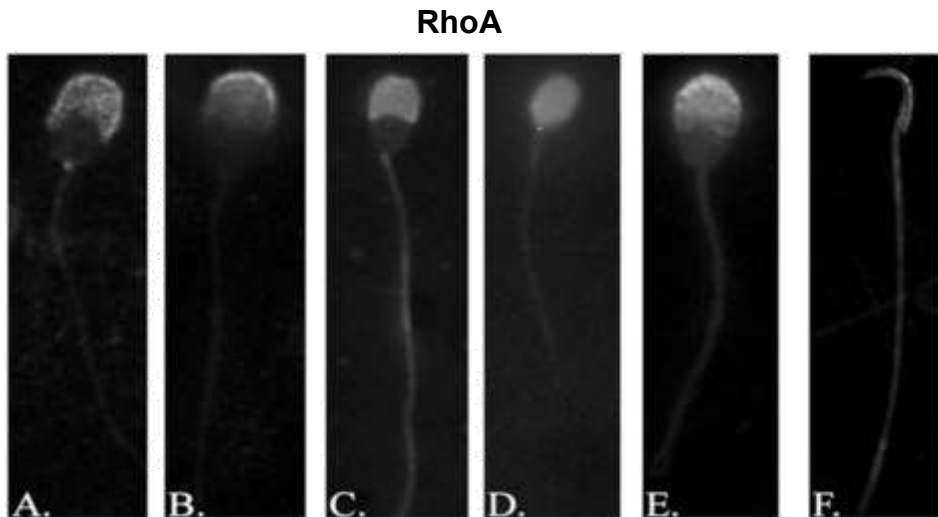


**Figura 9. Esquema de la propuesta de mecanismo de activación de ROCK.** En un estado inactivo el loop de auto inhibición generado por el dominio cinasa ubicado en el carboxilo terminal y la región RBD inhibe su actividad. Cuando una Rho unida a GTP se une a la región RBD, activa a la ROCK exponiendo su dominio catalítico y es accesible a sus sustratos, resultando en la activación de ROCK. (Kubo et al. 2008).

Las dos isoformas se localizan en distintos tejidos, ROCK1 es expresado en pulmón, hígado, estómago, bazo, riñón y testículo. Mientras que ROCK2 es altamente expresado en cerebro, corazón y tejido muscular. Y ambos transcriptos son altamente expresados en el corazón y pulmón (Kubo, Yamaguchi et al. 2008). ROCK en espermatozoides de erizo de mar se han localizado en la región acrosomal, pieza media y flagelo, en una forma aproximadamente 135 kDa, formada posiblemente por una proteólisis que puede explicar la diferencias de masa molecular (de la Sancha et al. 2007).

## Antecedentes directos

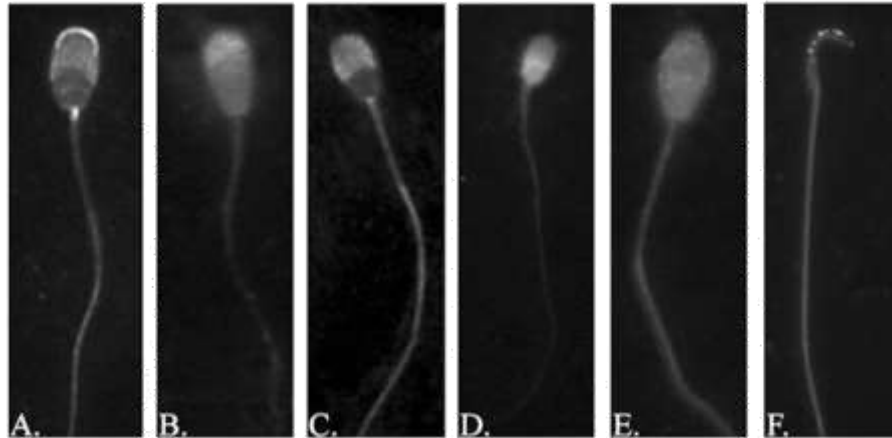
La proteína RhoA fue descrita por primera vez en los espermatozoides de los mamíferos por el grupo de Mújica (Delgado-Buenrostro *et al.*, 2005). Posteriormente en el 2006 Ducummon mediante fluorescencia, describen la distribución de las principales proteínas RhoGTPasas en espermatozoides de mamíferos (cerdo, toro, elefante, humano, rata y carnero). En el caso de la proteína RhoA (Fig. 10) se encuentra distribuida en el flagelo y en la región acrosomal. Interesantemente, las regiones donde RhoA es encontrada concuerdan con los sitios donde se localiza actina-F en los espermatozoides no capacitados, lo que sugiere la posible participación de RhoA en la polimerización de actina.



**Figura 10. Localización de RhoA.** Espermatozoides de cerdo (A), toro (B), elefante (C), humano (D) carnero (E) y rata (F).

Dos grupos de investigación han reportado los efectores de las proteínas Rho GTPasas, para el caso del grupo de Mújica, describe la distribución de los efectores WASp, Arp2 y Arp3, los cuales son efectores de las proteínas Cdc42 y Rac1 (Delgado-Buenrostro *et al.*, 2005). Mientras que el grupo de Ducummon describe la presencia de los efectores PI(4)P5K y ROCK1; a ROCK1 (Fig.11) se le localizó en la cabeza y en el flagelo de las diferentes especies (cerdo, toro, elefante, humano, rata y carnero) (Ducummon *et al.*, 2006).

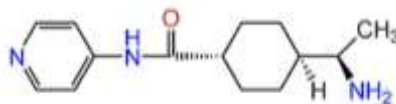
## ROCK1



**Figura 11. Localización de la cinasa de Rho (ROCK).** Espermatozoides de cerdo (A), toro (B), elefante (C), humano (D) carnero (E) y rata (F).

Mediante el uso de inhibidores un inhibidor específico de las RhoGTPasas como es la exoenzima C3 (ADP-ribosiltransferasa de *Clostridium botulinum*) la cual modifica covalentemente el residuo Asn en la posición 41 de RhoA, RhoB y RhoC inactivándolas, se ha tratado de definir el papel de las proteínas Rho en la capacitación y la reacción acrosomal. Espermatozoides de carnero tratados con la exoenzima C3 reporta la inhibición parcial de la polimerización de actina que se da durante la capacitación en espermatozoides, reflejándose esto en una inhibición parcial de la reacción acrosomal. Lo que sugieren que Rho-GTPasas podrían estar involucradas en la capacitación espermática por medio de mecanismos que involucran la polimerización de actina (Brener et al. 2003).

Por otro lado, mediante el uso del inhibidor de ROCK (Y-27632, Fig. 12) el cual compite por el sitio de unión del ATP de la cinasa, se ha tratado de definir el papel de RhoA y RhoB en la capacitación y reacción acrosomal de los espermatozoides de cobayo.



**Figura 12. Estructura del inhibidor de la cinasa de Rho (ROCK, Y-27632).**

## **Hipótesis**

Debido a que las proteínas Rho GTPasas regulan la remodelación del citoesqueleto de actina, proceso que es necesario para que los espermatozoides adquieran la habilidad fertilizante a través de la capacitación y reacción acrosomal. Por tanto, hipotetizamos que las proteínas Rho (Cdc42 y RhoA) se encuentran inactivas o en un estado de baja actividad, en los espermatozoides no capacitados, incrementando su actividad en etapas tempranas de la capacitación, por lo que su inhibición llevaría a la no polimerización de actina y por tanto a que el citoesqueleto de actina no se remodele durante la capacitación afectando procesos como la capacitación, la reacción acrosomal y la motilidad.

## **Objetivo General**

- Determinar el papel de Cdc42 y RhoA en los procesos de capacitación, reacción acrosomal y en la polimerización de actina, así como definir el mecanismo que regula la actividad de las proteínas Cdc42 y RhoA. También, determinar la presencia de las cinasas de Rho (ROCK1 y ROCK2) y su participación en la capacitación y reacción acrosomal en los espermatozoides de cobayo.

## **Objetivos Particulares**

- Determinar el papel de Cdc42 y RhoA sobre la capacitación y reacción acrosomal mediante el uso de inhibidores específicos.
- Definir la cinética de polimerización de actina cuando Cdc42 o RhoA son inhibidas.
- Analizar el curso temporal de activación de Cdc42 y RhoA durante la capacitación.
- Definir la presencia y localización de ROCK1 y ROCK2 en los espermatozoides de cobayo.
- Determinar el papel de ROCK1 y ROCK2 en la capacitación y reacción acrosomal.
- Estudiar el papel de ROCK1 y ROCK2 en la polimerización de actina

## **Estrategia Experimental**

### **Obtención y capacitación de espermatozoides**

Se utilizaron cobayos de la cepa CIEA:HART con un peso de 800g, los cuales se sacrificaron mediante cámara de CO<sub>2</sub>, de los cuales se extrajo el epidídimo y los conductos deferentes, obteniéndose a los espermatozoides del epidídimo y de los conductos deferentes, los cuales se mantuvieron en Solución isotónica (NaCl a 0.154M) (anexo A) a 37°C posteriormente con el uso de pinzas se retiró la grasa y las venas que rodeaba al epidídimo y los conductos eferentes, mediante un corte se obtuvo la cola del epidídimo junto con el conducto eferente. Mediante la perfusión del conducto deferente con Solución isotónica (NaCl a 0.154M) (anexo A) a 37°C, los espermatozoides se obtuvieron en un tubo de cultivo, el cual se colocó en baño maría a 37°C. Posteriormente las muestras espermáticas se evaluaron de manera cualitativa que no tuvieran reacción acrosomal espontánea, así como su movilidad. Las muestras espermáticas adecuadas se lavaron una vez en Solución isotónica (NaCl a 0.154M) (anexo A) a 37°C, mediante centrifugación a 2,500 rpm por 3 minutos, e inmediatamente las pastillas se suspendieron en Solución isotónica (NaCl a 0.154M) (anexo A) a 37°C.

Para capacitar las muestras espermáticas se realizó un conteo, tomando una alícuota de 25µl de la muestra espermática, los cuales se diluyeron en 500µl de PBS-Tritón X100 al 0.1% (anexo C), se tomaron 10µl, en una cámara de Neubauer, se cuantificaron y se realizaron los cálculos para ajustar la muestra espermática a una concentración final de  $35 \times 10^6$  células/ml. Las muestras espermáticas se centrifugaron a 2,500 rpm por 3 minutos, e inmediatamente se suspendieron con respecto a los cálculos obtenidos en Medio Tyrode (medio capacitante) (anexo D), e incubaron a 37°C. Los espermatozoides no capacitados se mantuvieron en solución isotónica a 37°C.

### **Inhibidor de las proteínas Rho durante la capacitación**

Se realizaron los cálculos para capacitar a los espermatozoides, se prosiguió a centrifugarlos a 3500 rpm X 3 min. Se suspendieron en medio capacitante

(Tyrode) junto al inhibidor de la Rho GTPasa que se va a inhibir: C3 (1 µg/ml) de marca Cytoskeleton para inhibir a RhoA, Secramina A (5µM) donado por Kirchhausen Lab (Harvard Medical School) y the Hammond Lab (University of Louisville), sintetizado por Bo Xu y GB Hammond de the University of Louisville.) para inhibir a Cdc42 o Y-27632 (100 nM) de marca de Millipore para inhibir a ROCK. Los espermatozoides fueron capacitados durante diferentes tiempos de capacitación (15, 30, 60 y 90 minutos).

### **Obtención de extractos proteínicos de espermatozoides**

Los espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min), se centrifugaron a 3,000 rpm por 3 minutos, el pellet se resuspendió en 700 µl de Amortiguador de lisis para proteínas fosforiladas (anexo H) por 20 minutos a 4°C. Pasado los 20 min las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y mediante el método de Bradford (1976) se cuantificó el sobrenadante para conocer el contenido de proteínas presentes.

### **Western blot para la identificación de proteínas**

Se identificaron a las proteínas Rho GTPasas mediante *Western blot* (WB), se inició elaborando los geles para la electroforesis, preparando el **Gel Separador** (anexo I) al 10% y el **Gel Concentrador** (anexo J), una vez elaborados los geles se colocaron en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con **Amortiguador de Tricina** 10X (anexo K). Los extractos proteínicos (100µg/ml) fueron tratados con **Buffer de Laemmli 3X** (anexo L) y hervidos en el termoblock a 100°C por 7 minutos, posteriormente las muestras se colocaron en los pocillos del gel. En el exterior de la cámara se colocó el **Buffer de Corrida** (anexo M). La cámara de electroforesis se conectó a la fuente de poder y se activó a 45 voltios durante 15 minutos, posteriormente el voltaje se incrementó a 100 voltios durante hora y media aproximadamente. Los geles se desmontaron del equipo de electroforesis y se prosiguió a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, el gel se montó en el equipo de transferencia se agregó el **Amortiguador de Transferencia** (anexo N) y se conectó a la fuente de poder y se activó la fuente de

poder a 75 mA por 16 horas a 4°C. Terminada la transferencia se desmonto la membrana, para corroborar la transferencia se tiño con rojo de ponceau.

Para la identificación de las proteínas se marcaron con anticuerpos de las diferentes proteínas Rho GTPasas, primero la membrana se bloqueó con **Solución de bloqueo para WB** (anexo O) por 2 horas a 37°C. Para eliminar el exceso de solución bloqueadora se realizaron 7 lavados con PBS con Tritón X100 al 1% (PBS-TX100) por 7 minutos cada uno. Posteriormente la membrana se incubó con el primer anticuerpo y dependiendo la proteína a identificar se uso Anti-RHOA (Ab6882) de la marca Abcam a una dilución 1:3000, Anti-CDC42 (sc-57) de la marca Santa Cruz a una dilución 1:3000, anti-ROCK1 (sc-5560) de la marca Santa Cruz a una dilución 1:200 y anti-ROCK2 (sc-5561) de la marca Santa Cruz a una dilución 2:200), diluido en solución de bloqueo se incubaron toda la noche a 4° C. Posteriormente se retiró el exceso de anticuerpo, se realizaron 5 lavados con PBS-TX100 durante 7 minutos cada uno, posterior la membrana se incubó con el segundo anticuerpo (anticuerpo secundario anti-rabbit marcado con HRP de la marca Jackson Immunoresearch diluido 1:10,000, anticuerpo secundario anti-goat marcado con HRP de la marca Jackson Immunoresearch diluido 1:10,000 y anticuerpo secundario anti-Mouse marcado con HRP de la marca Jackson Immunoresearch diluido 1:5,000) por 2 horas a 37°C diluido en solución de bloqueo. Pasado el tiempo de incubación se retiró el exceso del anticuerpo se realizaron 7 lavados con PBS-TX100 durante 7 minutos cada uno. Se revelo la membrana mediante el uso de luminol (Amershan), la membrana se bañó con luminol, la membrana se colocó en un protector fijándose con cinta adhesiva y revelándose en una película de rayos X (X-Omat, Kodak).

### **Ensayos de viabilidad**

Los espermatozoides se capacitaron durante 90 min, el medio capacitante (Tyrode) en ausencia y presencia de los diferentes inhibidores: C3 de Cytoskeleton (1 µg/ml)., Secramina A donado por Kirchhausen Lab (Harvard Medical School) y the Hammond Lab (University of Louisville), sintetizado por Bo Xu y GB Hammond de the University of Louisville. (5 µM) y Y-27632 de Millipore (100 nM). Mediante

la metodología descrita por Brito et al. (2023). Las muestras de espermatozoides se incorporaron a una solución de Ioduro de Propidio (1 µg/ml) en una proporción 1:1, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente los espermatozoides fueron lavados y bajo el microscopio de epifluorescencia se contaron (500 células X muestras, n=3). Como control, se usaron los espermatozoides capacitados en medio Tyrode en ausencia de inhibidores. Las muestras con una viabilidad menor al 80% fueron descartadas.

### **Ensayo con clortetraciclina**

Los espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min) en ausencia y presencia de inhibidores, se tomaron 45µl de muestra espermática capacitada y se le adicionaron 45µl de **Solución de CTC** (anexo P), homogenizándose e incubándose por 20 segundos a baño María, se detuvo la reacción con 0.76µl de **Glutaraldehído (12.5 %) –Tris 1M** (anexo Q). En un portaobjetos se colocaron 10µl de la muestra espermática la cual se cubrió con el cubreobjetos para proseguir a sellar con barniz de uñas transparente. Se cuantificaron y graficaron los diferentes patrones de espermatozoides: no capacitados (patrón F), capacitados (patrón B) y de aquellos que han sufrido la reacción acrosomal espontanea (patrón AR).

### **Preparación de frotis espermáticos**

Los espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90 minutos), Las muestras de espermatozoides se incorporaron a una **Solución fijadora: Formaldehído al 4% y Glutaraldehído al 0.2%** (anexo R) en una proporción 1:1, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm por 3 minutos, se suspendieron en una solución de **Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) a50mM diluido en PBS** (anexo S) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS y finalmente con dos lavados con agua élix. Mediante la observación al microscopio óptico se realizaron diluciones para obtener una concentración adecuada y estas puedan ser colocadas en los portaobjetos, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente durante 48 hrs.



## **Inmunolocalización de las proteínas ROCK**

Frotis con espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min), se permeabilizaron con acetona fría (-20° C) por 7 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados durante 7 min con PBS. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se les adiciono 100µL de anti-ROCK1 (sc-5560) o anti-ROCK2 (sc-5561) de la marca Santa Cruz a una dilución 2:25 en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. (anexo q)** se incubaron toda la noche a 4°C. Y se retiró el exceso de anticuerpo mediante 6 lavados con PBS durante 7 minutos. Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo-FITC de Jackson Immunoresearch diluido 2:100 en solución bloqueadora durante una hora a 37°C. Se retiró el exceso mediante 6 lavados con PBS por 7 minutos. Se prosiguió a realizar tres lavados con agua bidestilada por 15 segundos cada uno, por último, se agregó medio de montado (Gervatol) y cubriéndolos con el cubreobjetos y sellándose con barniz de uñas transparente.

## **Detección de actina-F en espermatozoides.**

Frotis con espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min) en ausencia y presencia de los inhibidores Secramina A, C3 o Y-27632, las células fueron permeabilizadas en las laminillas con una solución de PBS-TX100 (0.1%), incubándolas por 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados durante 7 min con PBS. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se adicionó 50 µl de faloidina-TRITC de la marca Cytoskeleton diluida 1:20 en PBS, por una hora a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS durante 7 minutos, se agregó medio de montaje (Gervatol) y con el cubreobjetos se cubrieron y sellaron con barniz de uñas transparente. Los patrones de tinción fueron visualizados en el microscopio de fluorescencia Olympus BX50, las imágenes fueron registradas y la fluorescencia analizada mediante el software Niss Element 3.1 (Nikon, Japón).

### **Reacción acrosomal inducida.**

Los espermatozoides fueron capacitados en medio Tyrode durante 50 min en ausencia y presencia de los diferentes inhibidores: C3 (1 µg/mL) o SecA (5 µM) o Y-27632 (100 nM), posteriormente se indujo la reacción acrosomal (iAR) añadiendo progesterona (10 µl) se incubaron durante otros 20 min. Mediante el ensayo de CTC se evaluó AR.  $iAR = \% \text{ de AR (70min)} - \% \text{ de AR (50 min)}$ .

### **Ensayo de actividad de la proteína RhoA.**

Se cuantifico la actividad de RhoA mediante RHOA Pull-down Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton). Se realizaron extractos proteicos de espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min). Las muestras de extractos proteínicos (300µg/ml) se mezclaron con a 50µg de perlas Rhotekin-RBD se incubaron mediante agitación a 4°C por 1hrs. Posteriormente se centrifugaron a 5,000g a 4°C por 1 min. Se retiró el sobrenadante, para después suspender el pellet con 500µl de Buffer de Lavado y centrifugar a 5,000g a 4°C por 3 min. Se repitió el lavado con el Buffer de Lavado. Y para analizar la muestra por SDS-Page y *Western Blot*, se suspendió con buffer de Laemmli.

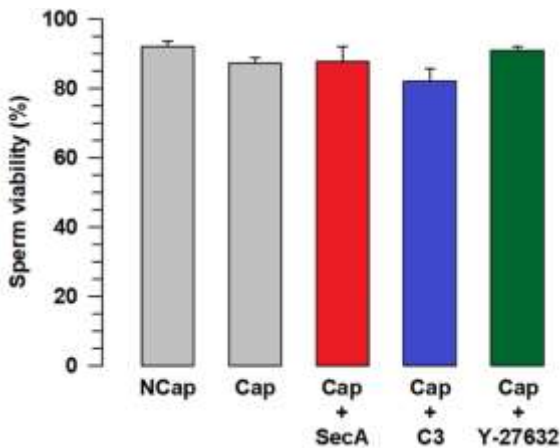
### **Ensayo de actividad de la proteína Cdc42.**

Se cuantifico la actividad de Cdc42 mediante CDC42 G-LISA Activation Assay Biochem Kit (BK127). Cytoskeleton Inc. Se realizó una curva estándar de Cdc42 constitutivamente activa con el control positivo. A una placa se agregaron 50 µl a cada pocillo de extractos proteínicos de espermatozoides capacitados a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 90 min) a una concentración de 0.3 mg/µl, a cada pocillo se le agregó el tampón de lisis simple y se realizó un lavado. Posteriormente, a cada pocillo se agregó el anticuerpo primario anti-Cdc42 se incubo por una hora, posteriormente se realizó un lavado. Por último, se agregó el anticuerpo secundario marcado con HRP incubándose por una hora, se añadió el reactivo HRP. Se leyó la placa a DO de 490 nm en un espectrofotómetro de placa de 96 pocillos.

## Resultados

### La viabilidad de los espermatozoides no se ve afectada por los diferentes inhibidores.

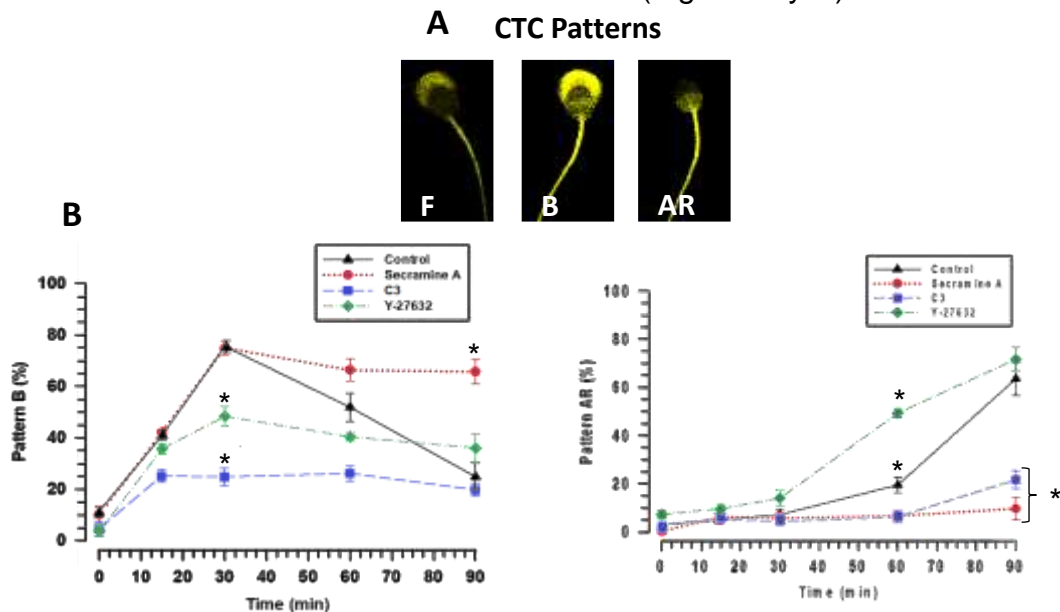
Nuestro primer objetivo fue valorar la viabilidad de los espermatozoides durante la capacitación usando los diferentes inhibidores de las proteínas Rho: C3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) para RhoA, secramina A (SecA, 5  $\mu\text{M}$ ) para Cdc42, así como Y-27632 (100 nM) para ROCK1 y ROCK2. Antes que nada, fue valorada la viabilidad de los espermatozoides tratados con los diferentes inhibidores, esto se realizó mediante la metodología descrita por Brito et al. (2023). Se contabilizaron 500 células y se graficaron los porcentajes de viabilidad (Figura 13). Observamos que las diferentes concentraciones de los inhibidores no alteraron la viabilidad de los espermatozoides con respecto a los espermatozoides no capacitados y capacitados en ausencia de los inhibidores (Figura 13). Al no tener cambios significativos en la viabilidad de los espermatozoides en los tiempos evaluados (0, 15, 30, 60, 75 y 90 min) solo mostramos los valores para espermatozoides no capacitados y capacitados a los 90 min.



**Figura 13. Evaluación de la viabilidad del espermatozoides.** Los espermatozoides capacitados en presencia de cualquiera de los siguientes inhibidores: SecA (5  $\mu\text{M}$ ), C3 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o Y-27632 (100 nM). Después de 90 minutos de incubación en medio Tyrode, la viabilidad se evaluó utilizando yoduro de propidio. Media  $\pm$  s.e.m, n = 3 experimentos independientes.

## Cdc42, RhoA y ROCK participan diferencialmente en la capacitación y la reacción acrosomal espontánea.

Para definir como los inhibidores de las proteínas Cdc42, RhoA y ROCK afectan la capacitación y reacción acrosomal espontánea (RAe). Por medio del ensayo de CTC se cuantificaron dos de los estados fisiológicos que experimentan los espermatozoides antes de la fertilización: capacitación (patrón B) y reacción acrosomal (patrón AR). Los patrones fueron cuantificados a diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, 60, 75 y 90 min) en un medio que soporta la capacitación. Los espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores muestran un incremento en el patrón B hasta los 30 min de incubación, después de este tiempo este patrón disminuye. Esta disminución coincide con el incremento en el patrón AR, que alcanza su máximo a los 90 min de incubación (Fig. 14 A y B).



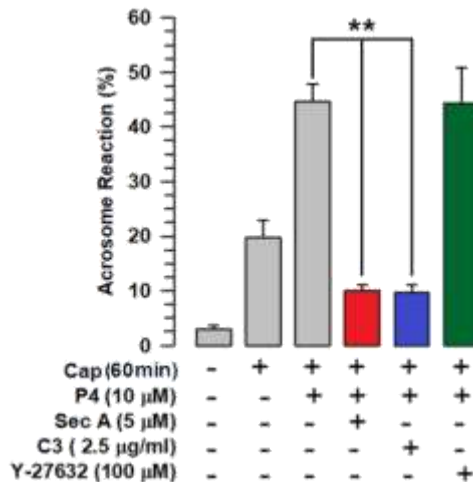
**Figura 14. La inhibición de Cdc42 y RhoA altera la capacitación y la reacción acrosomal de distintas maneras.** (A) Patrones de tinción de CTC. Patrón F: espermatozoides no capacitados; Patrón B: espermatozoides capacitados y Patrón AR, espermatozoides que han experimentado una reacción acrosómica, correspondiente a la reacción acrosómica espontánea. (B) El patrón B se evaluó en espermatozoides capacitados en ausencia o presencia de toxina C3 (1  $\mu$ M), Secramina (5  $\mu$ M) o Y-27632 (100 nM). (C) El patrón de AR se evaluó en espermatozoides capacitados en ausencia o presencia de toxina C3 (1  $\mu$ M), Secramine (5  $\mu$ M) o Y-27632 (100 nM). Patrón AR de tinción CTC. Media  $\pm$  s.e.m., N = 3 experimentos independientes. Se contaron quinientas células por experimento.

Los espermatozoides fueron capacitados en presencia de SecA (5 $\mu$ M), patrón B incrementa a los 30 min (75.00  $\pm$  2. 64s.e) de capacitación, similar a la muestra control (75.67 $\pm$ 0. 88s.e). Sin embargo, el porcentaje del patrón B se mantuvo hasta los 90 min de capacitación en la presencia de SecA, los niveles del patrón B mantienen valores que no son significativamente diferentes (65.67  $\pm$  4. 84s.e) con respecto a los valores a los 30 min de capacitación (Fig. 14b). Esos resultados explican que la RAe no incrementa en los espermatozoides incubados en presencia de SecA.

Cuando los espermatozoides son capacitados en presencia de C3 (1 $\mu$ M), el patrón B incremento, se detuvo a los 15 min y permanecio sin cambios hasta los 90 min de capacitación (Fig. 14B), ocasionando que el patrón AR también se mantenga inhibido (Fig. 14C). Los anteriores resultados indican que al inhibir a la proteína RhoA se inhibe la capacitación y por consecuencia la RAe.

Los espermatozoides capacitados en presencia de Y-27632 (100 nM) el patrón B incrementa hasta los 30 min de capacitación siendo un incremento estadísticamente menor ( $P \leq 0.05$ ) en comparación a los espermatozoides control, espermatozoides capacitados en ausencia de Y-27632 (Fig.14B). Caso contrario el patrón AR incremento a partir de los 15 min de capacitación, siendo a los 60 min de capacitación estadísticamente mayor con respecto al control (Fig. 14C). Concluimos que al inhibir a la proteína ROCK se presentó una RAe temprana.

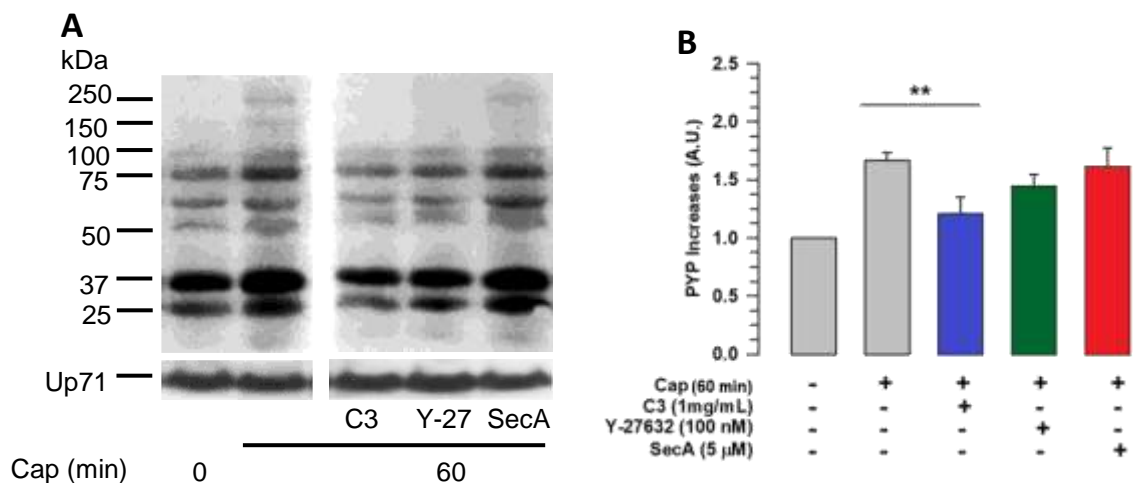
Para saber si los diferentes inhibidores utilizados en este trabajo tienen el mismo efecto sobre la RA inducida por progesterona (RAip), se capacitaron al espermatozoide en presencia de C3 (1 $\mu$ g/ml), SecA (5 $\mu$ M) y Y-27632 (100 nM) por 50 min. Enseguida la reacción acrosomal fue inducida por la adición de progesterona (10 $\mu$ M) y el espermatozoide fue incubado por otros 20 min. Estos resultados muestran que la RAip fue significativamente más alta ( $p=0.001$ ) en que la RAe (Fig. 15).



**Figura 15. Los inhibidores no afectan la Reacción Acrosomal Inducida por Progesterona.** (A) Reacción del acrosoma inducida por progesterona. En los espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de C3, SecA o Y-27632, la reacción acrosomal fue inducido por progesterona y se comparó con la reacción acrosomal espontanea. Medias  $\pm$  S.E.M., N = 3 experimentos independientes.

Mientras que los espermatozoides capacitados en presencia de C3 o SecA, la RAip fue significativamente baja comparada con los controles de espermatozoides en ausencia de los inhibidores. Los espermatozoides capacitados en presencia de Y-27632 mantiene un porcentaje similar a los espermatozoides a los que se indujo la reacción acrosomal con progesterona (Fig. 15).

Para confirmar estos resultados de capacitación obtenidos mediante la técnica de CTC, se valoraron los niveles de fosforilación en Tyr (p-Tyr) de las proteínas en los espermatozoides mediante WB (Fig. 16).



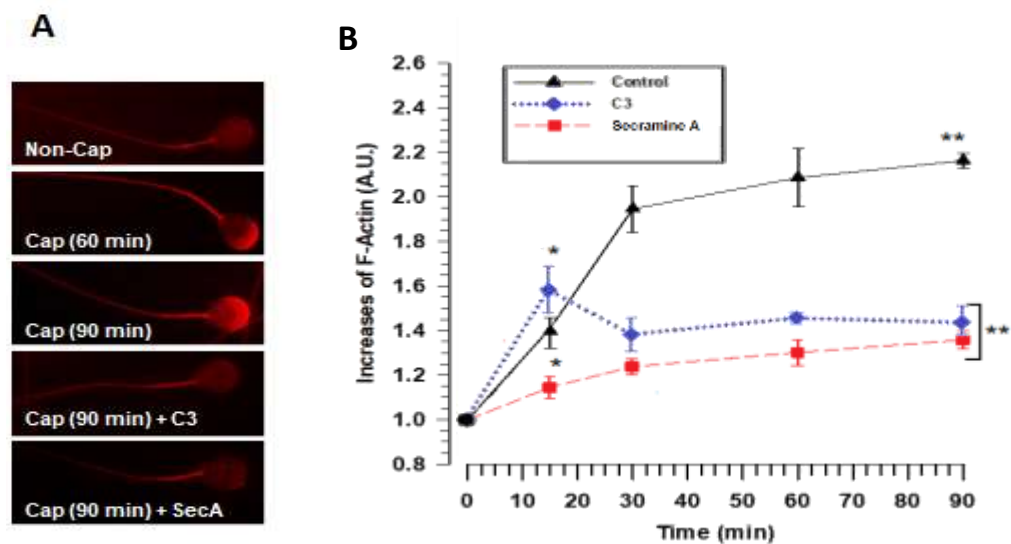
**Figura 16. Evaluación de la fosforilación de proteínas.** (A) Se utilizaron extractos proteicos completos obtenidos de espermatozoides capacitados en diferentes condiciones para determinar los niveles de p-Tyr. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se analizó la p-Tyr usando un anticuerpo anti-p-Tyr. SecA, secramina A (5  $\mu$ M); Y-27, Y-27632 (100 nM). C3 (1  $\mu$ g / mL). La imagen es representativa de tres experimentos independientes. (B) Análisis densito métrico de p-Tyr. Medias  $\pm$  S.E.M., N = 3 experimentos independientes.

Los resultados muestran un incremento significativo de p-Tyr en espermatozoides capacitados ( $P=0.001$ ) en comparación con los espermatozoides no capacitados (Fig. 16 A y B). Cuando los espermatozoides fueron capacitados en la presencia de SecA y Y-27632, la niveles de PYP fueron similares a los mostrados por el control, espermatozoides capacitados en ausencia de inhibidores. Por otra parte, los espermatozoides capacitados en presencia de C3 muestran niveles estadísticamente menores de p-Tyr en comparación con los espermatozoides control (Fig. 16 A y B).

### **Cdc42 inicia la polimerización de actina durante la capacitación**

Diferentes estudios muestran que los inhibidores de las proteínas Rho como la toxina C3 inhibidor de RhoA y SecA inhibidor de Cdc42, previene la polimerización de actina durante la capacitación. Sin embargo, se sabe poco sobre el efecto temporal de los inhibidores sobre remodelación del citosqueleto de actina. Para estudiar la temporalidad del efecto de C3 y SecA, se evaluó la cantidad de actina F presentes en los espermatozoides a diferentes momentos de la capacitación (0, 15, 30, 60 y 90 min) en ausencia y presencia de los inhibidores de las proteínas Rho. Observamos que, a los 90 min de la capacitación, tanto C3 (1 $\mu$ g/ml) y SecA (5 $\mu$ M) inhiben la polimerización de actina. Los resultados muestran que en los espermatozoides control presentaron un incremento constante en los niveles de actina F hasta los 30 min de capacitación y posteriormente un incremento no tan pronunciado hasta los 90 min de capacitación (Fig. 17 B).

Los espermatozoides tratados con SecA, presentaron un incremento de los niveles de actina F hasta los 15 min la capacitación siendo estos estadísticamente menor a los espermatozoides control y manteniéndose en los mismos niveles hasta los 90 min de capacitación (Fig. 17 B). Mientras que los espermatozoides tratados con C3, los niveles de actina F fueron similares a los espermatozoides control hasta los 15 min de capacitación; posteriormente los niveles de actina F decae, siendo los niveles de actina F estadísticamente menores a los espermatozoides control, pero mayores a los espermatozoides no capacitados, estos niveles de actina F se mantuvieron hasta los 90 min de capacitación.

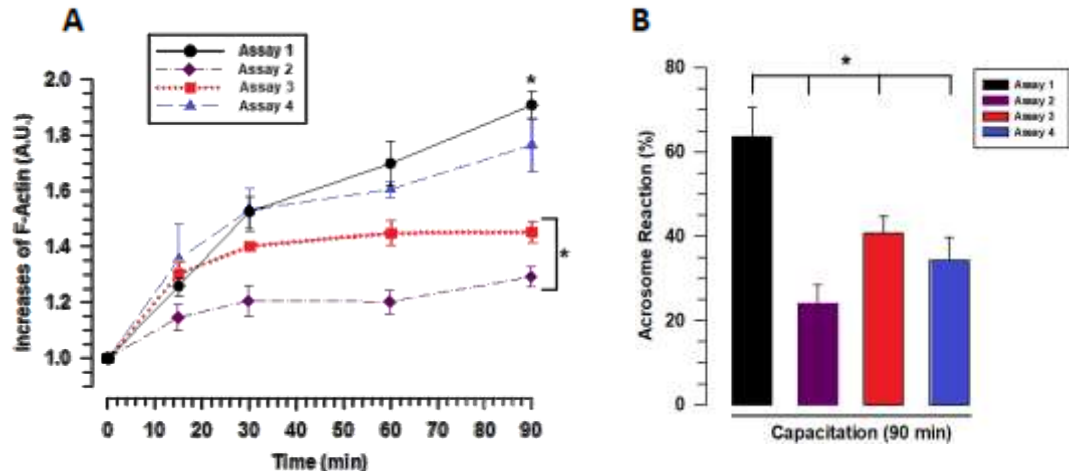


**Figura 17. Los inhibidores de las proteínas Rho alteran la polimerización de actina de manera diferente.** (A) Los patrones de fluorescencia de espermatozoides tratados con diferentes inhibidores de la proteína Rho y teñidos con faloidina-TRITC. (B) Los niveles de fluorescencia de faloidina-TRITC se cuantificaron utilizando el software NIS-Elements 3.1 para definir el curso de tiempo de actina F durante la capacitación en presencia o ausencia de toxina C3 (C3) o Secramine A (SecA) (Media  $\pm$  sem, n = 3 experimentos independientes). \* P = 0,044, \*\* P = 0,044.

Nuestros resultados sugirieron que la polimerización de actina no sucede cuando las proteínas Cdc42 y RhoA fueron inhibidas desde el inicio de la capacitación, lo que concuerda con la alteración de los estados fisiológicos de los espermatozoides por SecA y C3 (Fig. 14B). También nuestros resultados sugieren que Cdc42 pueden jugar un papel importante en la polimerización de actina durante los primeros estados de capacitación.



Por lo que se realizaron cuatro diferentes ensayos: Cdc42 fue inhibida con SecA (5 $\mu$ M) en diferentes tiempos de capacitación, aquellos en los que observamos que se veían afectadas la capacitación y la polimerización de actina: 0, 15, 30 min (Fig. 18).



**Figura 18. La inhibición de Cdc42 en diferentes momentos de la capacitación tiene diferentes efectos sobre la polimerización de actina F, pero no sobre la reacción acrosomal.** (A) Los espermatozoides se capacitaron en ausencia o presencia de Secramina A (5  $\mu$ M) siguiendo cuatro pruebas diferentes: **Ensayo 1:** Espermatozoides capacitados en ausencia de Secramina A. **Ensayo 2:** Espermatozoides capacitados en presencia de Secramina A desde el inicio de la capacitación. **Ensayo 3:** Secramina A añadida a los 15 min de iniciada la capacitación. **Ensayo 4:** Se agrega secramina a los 30 min de capacitación. Los niveles de fluorescencia de faloidina-TRITC se cuantificaron usando el software NIS-Elements 3.1 para definir el curso temporal de actina F durante la capacitación en presencia o ausencia de Sec A. \* P = 0,002. (B) La reacción acrosómica se evaluó a los 90 min de capacitación en los diferentes ensayos. \* P = 0,05 (media  $\pm$  s.e.m., N = 3 experimentos independientes).

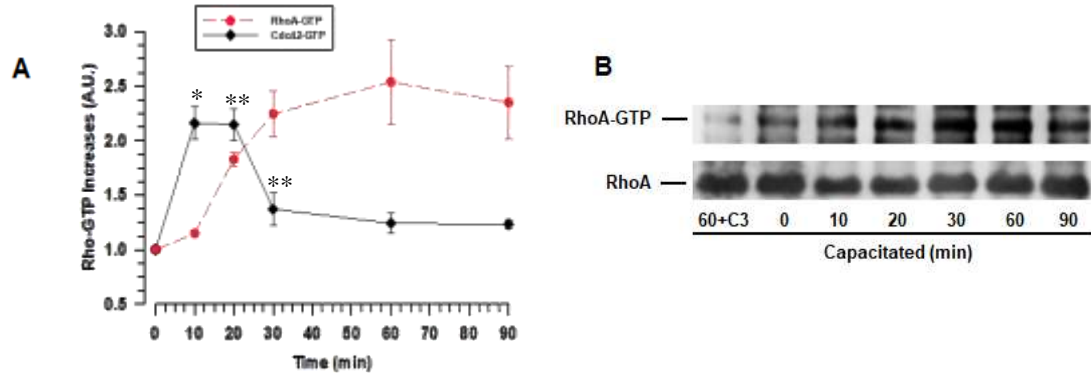
Durante estos ensayos, actina F fue evaluada a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 y 90 min) en los cuatro ensayos. En el ensayo 1: espermatozoides capacitados en ausencia de SecA. Los resultados muestran que actina F incrementan constantemente hasta los 30 min de la capacitación y posteriormente se observó un incremento menos pronunciado hasta los 90 min (Fig. 18A). Ensayo 2: La SecA se adicionó al inicio de la capacitación (0 min). Los niveles de F-actina incrementaron hasta los 15 min siendo estadísticamente menor en comparación a los espermatozoides control y manteniéndose hasta los 90 min de capacitación (Fig. 18A).

Ensayo 3: La SecA fue adicionada a los 15 min de capacitación. Se observó un incremento de F-actina hasta los 30 min siendo estadísticamente menor en comparación a los espermatozoides control, los niveles actina F se mantuvieron hasta los 90 min (Fig. 18A). Ensayo 4: La SecA adiciona los 30 min de iniciada la capacitación. En este ensayo los niveles de actina F fueron semejantes al ensayo 1 (Fig. 18A). Los anteriores resultados sugieren que Cdc42 regula la polimerización de actina al inicio de la capacitación y posiblemente este proceso sea regulado por RhoA después de los 30 min de capacitación

En los anteriores resultados se observó que al inhibir a la proteína Cdc42 al inicio de la capacitación, la reacción acrosomal también se vio inhibida (Fig. 14C). Para corroborar si la inhibición de Cdc42 a diferentes tiempos de la capacitación inhibe la RAe, mediante CTC se cuantifico la RAe a los 90 min de capacitación en los cuatro diferentes ensayos. Los resultados muestran que en los ensayos 2, 3 y 4 el porcentaje de RAe es estadísticamente menor con respecto al ensayo 1 (Fig. 18B).

### **La activación de RhoA es dependiente de Cdc42**

Nuestros resultados sugieren que Cdc42 podría tener un efecto sobre la activación de la proteína RhoA; por lo que es importante conocer el comportamiento de activación de las proteínas Rho (Cdc42 y RhoA) durante la capacitación. Por tanto, durante la capacitación, evaluamos las formas activas de Cdc42 y RhoA (Cdc42-GTP y RhoA-GTP, ver Métodos).



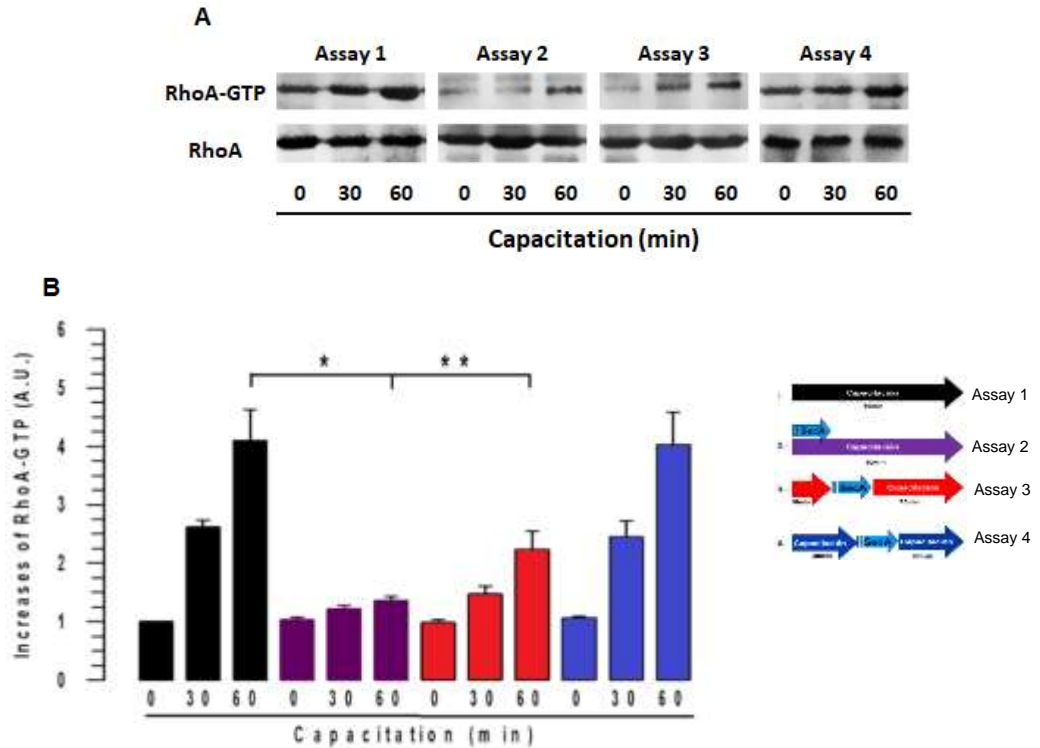
**Figura 19. Cdc42 Y RhoA se activan en diferentes momentos de la capacitación.** (A) Se utilizaron extractos completos obtenidos de espermatozoides capacitados en diferentes momentos para determinar la actividad de Cdc42 mediante la cuantificación de Cdc42-GTP. Se aisló RhoA-GTP de extractos obtenidos de espermatozoides capacitados en diferentes momentos. Como control se utilizaron espermatozoides capacitados en presencia de C3 ( $1 \mu / \text{mil}$ ). (B) El WB de RhoA se analizó por densitometría. Los resultados se expresan como la relación N/N0, donde N es la cantidad total de RhoA-GTP y N0 es la cantidad total de RhoA. Tanto Cdc42 como RhoA se normalizaron respecto a no capacitados (0 min). Medias  $\pm$  s.e.m., N = 3 experimentos independientes. Las imágenes representan tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que la cantidad de Cdc42-GTP incrementa significativamente ( $P=0.01$ ) a los 10 min de la capacitación con respecto a los espermatozoides no capacitados. La cantidad máxima de Cdc42 fue detectada entre los 10 y 20 min de capacitación, disminuyendo significativamente ( $P=0.022$ ) a los 30 min, pero mantiene significativamente los altos niveles con respecto a los espermatozoides no capacitados ( $P<0.05$ , Fig. 19A).

En el caso de RhoA, el ensayo del inmunoblot muestra un incremento con respecto a los tiempos de capacitación, este incremento fue inhibido por la toxina C3 (Fig. 19B). El análisis densitométrico del inmunoblot muestra que el nivel de Rho-GTP incrementa significativamente ( $P=0.001$ ) a partir de los 10 min de capacitación (Fig. 19A). Los niveles máximos de RhoA-GTP se alcanzaron hasta los 60 min de capacitación.

Estos datos indican que las proteínas Cdc42 y RhoA son activadas secuencialmente: Cdc42 es activada en tiempos tempranos de la capacitación y no es hasta que Cdc42 alcanza su máxima actividad (10 a 20 min) que RhoA incrementa su actividad significativamente. Para determinar si la actividad de RhoA depende de la actividad de Cdc42, se valoraron los niveles de RhoA-GTP en espermatozoides capacitados inhibiendo a Cdc42 a diferentes tiempos de capacitación (Fig. 20A y B).

- Ensayo 1: Espermatozoides capacitados en ausencia de SecA. La cantidad de RhoA-GTP incrementa significativamente ( $P=0.05$ ) a partir de los 20 minutos de la capacitación alcanzando su punto máximo de activación a los 60 min (Fig. 20B).
- Ensayo 2: Se adicionó la SecA al inicio de la capacitación (0 min). La cantidad de RhoA-GTP fue similar a la de los espermatozoides no capacitados y significativamente menor que la de los espermatozoides capacitados en ausencia de SecA (Fig. 20B).
- Ensayo 3: Se adicionó la SecA a los 15 min de capacitación. La cantidad de RhoA-GTP de los espermatozoides fue similar al de los espermatozoides no capacitados e igualmente que en el anterior ensayo significativamente menor que la RhoA-GTP de espermatozoides capacitados en ausencia de SecA (Fig. 20B).
- Ensayo 4: Se adicionó la SecA a los 30 min de capacitación. La cantidad de RhoA-GTP en espermatozoides capacitados fue similar a los espermatozoides en los que no se inhibió la proteína Cdc42 (Fig. 20B).

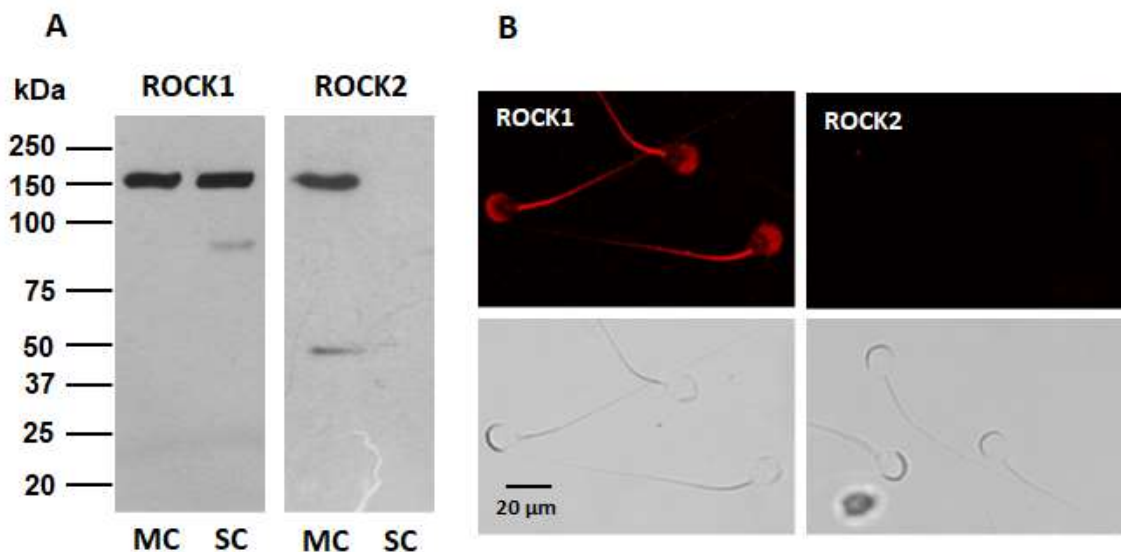


**Figura 20. RhoA no se activa cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia de Secaramina A.** (A) Extractos completos obtenidos de espermatozoides capacitados en ausencia o presencia de SecA ( $5 \mu\text{M}$ ) en cuatro pruebas diferentes: Ensayo 1: Espermatozoides capacitados en ausencia de SecA. Ensayo 2: espermatozoides capacitados en presencia de SecA. Ensayo 3: Se añade SecA a los 15 min de capacitación. Ensayo 4: Se añade SecA a los 30 min de capacitación. Estos extractos se usaron para aislar RhoA-CDC42 por extracción. Las imágenes de WB corresponden a tres experimentos independientes. (B) Las bandas de proteína RhoA y RhoA-GTP se analizaron por densitometría, y los resultados se expresan como una relación  $N/N_0$ , donde  $N$  es la cantidad total de RhoA-GTP y  $N_0$  es la cantidad total de RhoA y se normalizó con respecto a espermatozoides no capacitados (0 min). Medias  $\pm$  s.e.m.,  $N = 3$  experimentos independientes. \*  $P = 0,007$ , \*\*  $P = 0,04$

Nuestros resultados nos indican que durante la capacitación la proteína Cdc42 es activada durante los primeros 10 min de la capacitación en los que regula la polimerización de actina F y posteriormente regula la activación de la proteína Rho como RhoA, la cual continuará la regulación de la polimerización de actina F entre los 15 y 30 min de la capacitación.

## ROCK 1 afecta la polimerización de actina

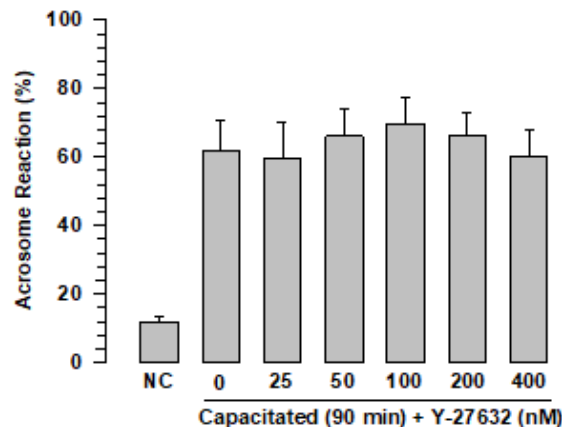
Uno de los principales efectores de la proteína RhoA es la Cinasa 1 y 2 de Rho (ROCK 1 y 2). Por tanto, se analizó el papel de las ROCK en la capacitación, RAE y la polimerización de actina. Primero se determinó cuál de las dos isoformas está presente en los espermatozoides de cobayo. Usando anticuerpos específicos, detectamos en los espermatozoides una sola banda de aproximadamente 160 kDa, que corresponde a ROCK1. Una banda similar fue detectada para células MCF7, las cuales fueron usadas como control positivo (Fig. 21 A).



**Figura 21. Solo ROCK 1 se expresa en espermatozoides de cobayo.** (A) Inmunodetección de ROCK1 y ROCK2 en espermatozoides de cobayo en extractos proteicos de espermatozoides (SC) y células MCF7 (MC). Las proteínas ROCK1 y ROCK2 se detectaron utilizando anticuerpos específicos. Las imágenes representan tres experimentos independientes. (B) Inmunolocalización de ROCK1 y ROCK2 en espermatozoides de cobayo. Paneles superiores: inmunolocalización de ROCK1 y ROCK2. Paneles inferiores campos brillantes. Las imágenes representan tres experimentos independientes.

Para confirmar nuestro resultado, mediante inmunofluorescencia, ROCK1 fue ubicada la región acrosomal y a lo largo del flagelo, mientras que ROCK2 no fue encontrada en los espermatozoides de cobayo (Fig. 21 B). Esto sugiere que al igual que en otros espermatozoides de mamíferos, ROCK 1 solo se expresa en el cobayo (Ducummon *et al.*, 2006).

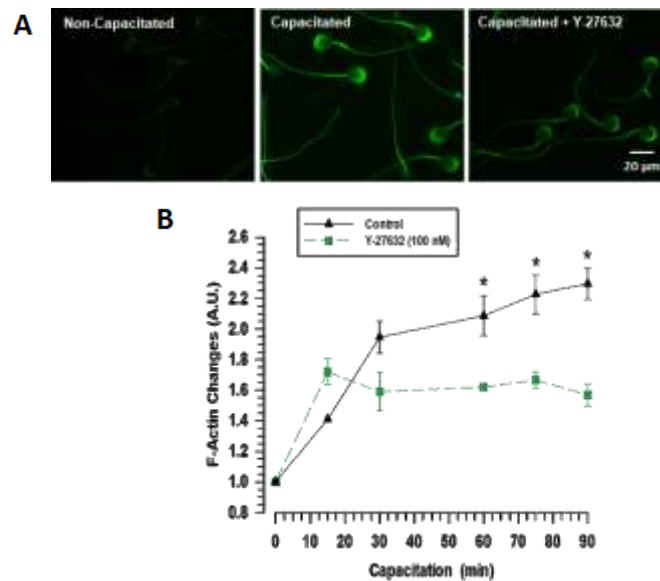
Usando el inhibidor Y-27632 específico para las proteínas ROCK, determinamos el papel de ROCK 1 en la reacción acrosomal y la polimerización de actina. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (0, 25, 50, 100, 200 y 400 nM). Pasados los 90 min de capacitación se realizó el ensayo de CTC (Fig. 22). Los resultados muestran que la RAe no se ve afectada por las diferentes concentraciones de Y-27532. Como mencionamos anteriormente en la Figura 14 al inhibir a la proteína ROCK1 mediante el uso del inhibidor Y-27632 (100nM) el patrón B incrementa hasta los 30 min de capacitación, pasados los 30 min el patrón B sufre una disminución no significativa que coincide con el incremento en la aceleración en el patrón AR, que a los 60 min de capacitación incrementa significativamente ( $P=0.001$ ) a la mostrada por los espermatozoides control. Los niveles de patrón AR en presencia de Y-27632 no presenta diferencias estadísticas con respecto a los espermatozoides control (Fig. 22).



**Figura 22. ROCK 1 no afecta la reacción acrosomal.** (A) Efectos del inhibidor de ROCK (Y-27632) en la Reacción Acrosomal. Los espermatozoides se capacitaron en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de Y-27632, y sus efectos sobre el AR se evaluaron mediante un ensayo de CTC. Medias  $\pm$  s.e.m., N = 3 experimentos independientes.

Los resultados sugieren que la capacitación de los espermatozoides se sigue desarrollado incluso cuando se inhibe ROCK1. Esto se confirmó al analizar los niveles del p-Tyr. Los niveles de p-Tyr fueron similares en los espermatozoides capacitados en presencia o ausencia del inhibidor de ROCK1 (Fig. 16A y B).

Dado que ROCKs son los principales efectores de RhoA en la polimerización de actina, valoramos la polimerización de actina durante la capacitación en presencia con el inhibidor Y-27632 mediante cinética, valorando los niveles actina F a distintos tiempos de capacitación (0, 15, 30 y 60 min). Durante los primeros 15 minutos de capacitación, la cantidad de actina F incrementó a niveles similares a los espermatozoides control. Posteriormente los niveles de actina F disminuye y manteniéndose hasta los 90 min de capacitación, siendo los niveles significativamente más bajos que determinados para los espermatozoides control. (Fig. 23B). La ubicación de actina F en espermatozoides capacitados en presencia de Y-27632 (100 nM) muestra que la mayoría de la actina polimerizada se encuentra en la región apical del acrosomal, mientras que el resto de la cabeza y el flagelo muestran una menor fluorescencia (Fig. 23 A). Estos resultados sugieren que ROCK1 participa en la polimerización de actina de los flagelos y la cabeza, pero no en la región apical del acrosomal.



**Figura 23. ROCK1 participa en la polimerización de actina.** Los espermatozoides se capacitaron (60 min) en ausencia o presencia del inhibidor de ROCK, Y-27632 (100 nM), y luego se tiñeron con faloidina-FITC para revelar actina F. Las imágenes representan tres experimentos independientes. (B) Efectos del inhibidor Y-27632 sobre la polimerización de actina. Los espermatozoides se capacitaron en presencia o ausencia de Y-27632, actina F se tiñó con faloidina-FITC y se evaluó la fluorescencia utilizando el software NIS-Elements 3.1. Medias  $\pm$  s.e.m., N = 3 experimentos independientes. \* P = 0,007.



## Discusion

Las proteínas Rho GTPasas son conocidas por su papel en la regulación del citoesqueleto de actina, aunque se conocen aproximadamente 22 proteínas Rho (Jobichen et al. 2012; Ridley 2006), siendo las más estudiadas RhoA, Cdc42 y Rac1. Varios estudios han informado la expresión de diferentes isoformas de las proteínas Rho tales como RhoA, RhoB, RhoC y Cdc42 en mamíferos espermatozoides (Delgado-Buenrostro et al. 2005, Dicummon *et al.*, 2006). A pesar de conocer que en los espermatozoides las ubicaciones subcelulares de RhoA y Cdc42 son similares, región acrosómal y flagelo (Delgado-Buenrostro et al. 2005; Dicummon and Berger 2006; Baltierrez-Hoyos et al. 2012), la participación de estas proteínas Rho es poco conocida en los procesos fisiológicos como la capacitación, reacción acrosomal y regulación del citoesqueleto de actina. Nuestro trabajo proporciona la primera evidencia de la relación entre RhoA y Cdc42 en la regulación del citoesqueleto de actina y su participación en la capacitación y la reacción acrosomal. Nuestros resultados mostraron que la SecA inhibe la polimerización actina desde los primeros minutos de capacitación (0-15 min), mientras que con el tratamiento con C3 presenta un aumento transitorio (0-15 min de capacitación) la actina F y posteriormente se presenta un descenso que se mantiene durante la capacitación (Fig. 17 B). Este incremento sucede a pesar de que los espermatozoides fueron incubados con la toxina C3 por una hora antes del inicio de la capacitación, debido a que la toxina C3 requiere 15 minutos para alcanzar una concentración intracelular que permite la inhibición de RhoA y en consecuencia de polimerización de actina. Se conoce que la toxina C3 no inhibe Cdc42 (Aktories et al. 1995; Just et al. 1995), lo que sugiere que el aumento transitorio de actina F podría deberse a la actividad de Cdc42. Sin embargo, estas posibilidades no explican por qué la polimerización de actina se agota después de 15 min de capacitación en presencia de la toxina C3 a pesar de que Cdc42 continúa activo después 15 min de capacitación (Fig. 17 B). Sugerimos que al inicio de la capacitación se requiere a la proteína Cdc42 para iniciar la polimerización de actina, mediante la formación de sitios de nucleación a través de WASP/ARP2/3 (Jaffe & Hall 2005) proteínas presentes en el espermatozoides del cobayo (Delgado-Buenrostro et al. 2005), y que forman un

andamio para que RhoA regule la formación de filamentos de actina (Jaffe & Hall 2005). Esta hipótesis se apoya en los siguientes hechos:

- (1) La inhibición de Cdc42 al inicio de la capacitación evita la polimerización de actina F.
- (2) El aumento de la polimerización de actina se evita cuando se inhibe la actividad de Cdc42 antes de 30 min de capacitación, pero no después de 30 min de capacitación.
- (3) Las pruebas de activación de las proteínas Rho indican que la actividad máxima de Cdc42 se alcanza entre los 10 y 20 minutos de capacitación, y después de este tiempo, la actividad disminuye a un nivel de línea de base, más alto que en espermatozoides no capacitados. Además, la actividad de RhoA alcanza niveles significativos a partir de los 10 min de capacitación, aumentando su actividad constantemente durante la capacitación (Fig. 19).

Los anteriores hechos indican que Cdc42 regula la polimerización de actina durante los primeros 20 minutos de capacitación. También sugieren que RhoA regula de la polimerización de actina después de 20 min de capacitación y que la actividad de Cdc42, después de los 20 min de capacitación, posiblemente Cdc42 esté involucrada en el inicio de la polimerización de actina, así como en la activación de otras vías de señalización, como las que estén regulando la reacción acrosomal (Baltierrez-Hoyos et al. 2012). Esta hipótesis está respaldada por un hallazgo importante, la inhibición de Cdc42 antes de los 30 min de capacitación, impide la activación RhoA (Fig. 20).

Estos resultados sugieren que la actividad de RhoA durante los primeros 20 minutos de capacitación depende de la actividad de Cdc42 y que dicha dependencia se pierde después de 30 min de capacitación, tiempo en el que la polimerización de actina se produjo normalmente (Fig. 18 A). Teniendo en cuenta que SecA es un inhibidor específico de Cdc42, la cual no altera la actividad de otras proteínas Rho (Pelish et al. 2006); por lo tanto, la inhibición de la actividad de RhoA causada por Cdc42 no es causada por SecA. Por otro lado, se ha reportado que una expresión escasa de Cdc42 impide que los espermatozoides presenten niveles la

polimerización de actina normales, incluso si los niveles de RhoA son normales (Angeles-Floriano et al. 2016). Lo anterior sugiere un cross-talk entre Cdc42 y RhoA, el cual juega un papel importante tanto en la polimerización de actina, como en la capacitación y la reacción acrosomal.

Estudios anteriores han demostrado que la inhibición de RhoA o Cdc42 inhiben la capacitación o reacción acrosomal (Brener et al. 2003; Baltierrez-Hoyos et al. 2012; Angeles Floriano et al. 2016). En nuestro trabajo mediante la técnica con clortetraciclina (CTC) analizamos los procesos de capacitación y reacción acrosomal, ya que esta nos permitió definir los estados fisiológicos que experimentan los espermatozoides al ser capacitados *in vitro* (Ward & Storey 1984; Shi & Roldan 1995; Mattioli et al.1996; Cordero-Martinez et al. 2018). Estudios anteriores se ha reportado que una baja expresión de Cdc42 inhibe la polimerización de actina; sin embargo, presentan el estado fisiológico de capacitación, pero no presentan reacción acrosomal (Angeles-Floriano et al. 2016). Nuestros datos concuerdan con los reportados por Angeles-Floriano (2016) mostrando que la mayoría de los espermatozoides a los que se inhibió a Cdc42 permanecen capacitados sin experimentar reacción acrosomal (Fig. 14).

Tomando en cuenta SecA inhibió tanto la reacción acrosomal espontanea como la inducida (Fig. 15), sugiriéndonos la participación de la proteína Cdc42 tanto en la reacción acrosomal, en la polimerización de actina y en la regulación de proteínas Rho. Proponemos que los espermatozoides para llevar a cabo la reacción acrosomal requieren a la proteína Cdc42 para formar y activar el complejo VAMP2-Syntaxin 1A, que se requieren en los procesos de exocitosis (Alberts et al.2006; Nevins & Thurmond 2006; Bretou et al.2014). De manera similar, se requiere a RhoA para la activación de SNAP-25, otro SNARE involucrado en el proceso de exocitosis (Horvath et al. 2017).

Se ha reportado que la inhibición de la polimerización de actina por C3, una exotoxina inhibe la actividad de las proteínas Rho (RhoA, RhoB y RhoC), da como resultado la inhibición de la reacción acrosomal (Brener et al.2003; Breitbart et al. 2005).

Nuestros resultados sugieren que la inhibición de RhoA inhibe la capacitación y como consecuencia los espermatozoides no desarrollan la reacción acrosomal (Fig. 14). Nuestros, resultados confirman que Cdc42 podría estar más involucrado en la regulación de la reacción acrosomal, mientras que RhoA, podría estar principalmente relacionado con la regulación de la capacitación.

La vía de señalización que regula la polimerización de actina involucra a las proteínas Rho y ROCK1 o ROCK2 (Fiedler et al. 2008; Amano et al. 2010; Romarowski et al. 2015); por lo que se había sugerido que la inhibición de las proteínas ROCK durante la capacitación, inhibiría la polimerización de actina y en consecuencia la capacitación y reacción acrosomal (Brener et al. 2003; Breitbart et al. 2005). Pero nuestros resultados muestran que a pesar de la inhibición de ROCK1, se observa la polimerización de actina en la región apical del acrosoma y se presenta el estado fisiológico de reacción acrosomal.

El análisis de la cinética de polimerización de actina durante la capacitación inhibiendo a ROCK1 es semejante a cuando se inhibe a RhoA, actina F aumenta hasta los 15 min de incubación, posteriormente los niveles de actina F disminuyen y conservándose hasta los 90 min de capacitación (Fig.23 B).

Observamos la presencia de actina F se presentaba en la región apical del acrosoma la cual podría ser suficiente para el desarrollo tanto de la reacción acrosomal espontanea o la reacción acrosomal inducida por progesterona.

La vía de señalización de proteína la RhoA por la que puede regular a la capacitación y reacción acrosomal podría regular un efector diferente de ROCK1, posiblemente un miembro de la familia de la formina-1 relacionada con mDIA (Sakamoto et al. 2012) podría mantener niveles adecuados de actina F para que ocurra la capacitación y reacción acrosomal. Otra posibilidad sería que otra proteína Rho, no inhibida por C3 o Y-27632, estaría relacionada con la polimerización de actina entre el citoplasma y las membranas acrosómicas, evento necesario para evitar la reacción acrosomal temprana, y que este proceso espermático se desarrolle normalmente (Spungin et al. 1995; Hernandez-Gonzalez et al. 2000;

Breitbart et al. 2005). Recientemente se ha reportado que la proteína Rac1 podría regular la formación de este citoesqueleto (Ramirez-Ramirez et al. 2020).

Es significativo señalar que la inhibición de ROCK1 durante la capacitación acelera el estado fisiológico de reacción acrosomal, posiblemente porque los espermatozoides se someten rápidamente al proceso de capacitación. Se ha reportado un efecto similar cuando se inhibe la FAK: inhibe la polimerización de actina, permitiendo una temprana fosforilación de proteínas y en consecuencia la presentación de una reacción acrosomal temprana (Roa-Espitia et al. 2016). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de una relación de FAK/RhoA/ROCK1/polimerización de actina con la regulación de p-Tyr y por tanto con la capacitación. Para corroborar esta vía de señalización se requieren más estudios.

## **Conclusiones**

1. Cdc42 y RhoA participan de manera diferencial en la fisiología espermática, RhoA interviene en el proceso de capacitación, mientras que Cdc42 participa principalmente en la regulación de la reacción acrosomal. Ambas proteínas Rho intervienen en la polimerización de actina, aunque de igual forma de manera diferencial; Cdc42 inicia la polimerización en la primera etapa de la capacitación, etapa en la que Cdc42 alcanza su máxima activación, a este tiempo de capacitación, RhoA inicia su activación, la cual es dependiente de Cdc42, y continúa con la polimerización de actina.
2. En cuanto a las cinasas de Rho (ROCK), los espermatozoides del cobayo solo presentan una de las dos isoformas: ROCK1, la cual participa en la regulación de la reacción acrosomal, evitando que esta se presente tempranamente, así como en la polimerización de actina en la región del flagelo.

## Perspectivas

1. Investigar el posible cross-talk entre las diferentes proteínas Rho presentes en los espermatozoides: Cdc42, RhoA y Rac1, y definir si Cdc42 es una pieza clave para la activación de las otras proteínas Rho.
2. Averiguar el mecanismo por el cual ROCK1 regula la polimerización de actina y su implicación en la motilidad espermática.
3. Investigar el mecanismo por el cual Cdc42 participa en la interacción de las membranas plasmática y acrosomal externa durante la reacción acrosomal.
4. Definir si RhoA está involucrado directamente con la reacción acrosomal y específicamente con la interacción de las membranas plasmática y acrosomal externa.
5. Averiguar el mecanismo que relaciona la vía de señalización FAK/RhoA/ROCK1/polimerización de actina con la regulación de la fosforilación de proteínas en Tyr y por tanto con la capacitación.

## Bibliografía

Abou-Haila, A. and D. R. Tulsiani (2000). "Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function." Arch Biochem Biophys 379(2): 173-82.

Aktories K, Jung M, Bohmer J, Fritz G, Vandekerckhove J & Just I 1995 Studies on the active-site structure of C3-like exoenzymes: involvement of glutamic acid in catalysis of ADP-ribosylation. *Biochimie* 77 326–332.

Alberts P, Rudge R, Irinopoulou T, Danglot L, Gauthier-Rouviere C & Galli T 2006 Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell* 17 1194–1203.

Amano M, Nakayama M & Kaibuchi K 2010 Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 67 545–554.

Angeles-Floriano T, Roa-Espitia AL, Baltierrez-Hoyos R, Cordero- Martinez J, Elizondo G & Hernandez-Gonzalez EO 2016 Absence of aryl hydrocarbon receptor alters CDC42 expression and prevents actin polymerization during capacitation. *Molecular Reproduction and Development* 83 1015–1026.

Anderson, E. L. and M. J. Hamann (2012) "Detection of Rho GEF and GAP activity through a sensitive split luciferase assay system." Biochem J 441(3): 869-79.

Arias-Romero LE, Chernoff J. Targeting Cdc42 in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Nov;17(11):1263-73. doi: 10.1517/14728222.2013.828037. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23957315; PMCID: PMC3937847.

Artamonov, M. V., L. Jin, et al. (2015)"Signaling pathways that control rho kinase activity maintain the embryonic epicardial progenitor state." J Biol Chem 290(16): 10353-67.

Aspenstrom, P. (1999). "Effectors for the Rho GTPases." Curr Opin Cell Biol 11(1): 95-102.

Baltierrez-Hoyos R, Roa-Espitia AL & Hernandez-Gonzalez EO 2012 The association between CDC42 and caveolin-1 is involved in the regulation of capacitation and acrosome reaction of guinea pig and mouse sperm. *Reproduction* 144 123–134.

- Bernabo, N., P. Berardinelli, et al. "The role of actin in capacitation-related signaling: an in silico and in vitro study." BMC Syst Biol 5: 47. 2011 Mar.
- Breitbart, H., G. Cohen, et al. (2005). "Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction." Reproduction 129(3): 263-8.
- Brener, E., S. Rubinstein, et al. (2003). "Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction." Biol Reprod 68(3): 837-45.
- Bretou M, Jouannot O, Fanget I, Pierobon P, Larochette N, Gestraud P, Guillon M, Emiliani V, Gasman S, Desnos C *et al.* 2014 Cdc42 controls the dilation of the exocytotic fusion pore by regulating membrane tension. *Molecular Biology of the Cell* 25 3195–3209.
- Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL & Kastelic JP 2003 Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60 1539–1551. ([https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00174-2))
- Castellani-Ceresa, L., M. Mattioli, et al. (1993). "Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D." Mol Reprod Dev 36(2): 203-11.
- Cordero-Martinez J, Reyes-Miguel T, Rodriguez-Paez L, Garduno- Siciliano L, Maldonado-Garcia D, Roa-Espitia AL & Hernandez- Gonzalez EO 2018 TMEM16A inhibition impedes capacitation and acquisition of hyperactivated motility in guinea pig sperm. *Journal of Cellular Biochemistry* 119 5944–5959.
- Correa, L. M., A. Thomas, et al. (2007). "The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility." Biol Reprod 77(6): 942-53.
- Chen, M., A. R. Bresnick, et al. "Coupling S100A4 to Rhotekin alters Rho signaling output in breast cancer cells." Oncogene 32(32): 3754-64. 2013 Aug.



de la Sancha, C. U., G. Martinez-Cadena, et al. (2007). "Rho-kinase (ROCK) in sea urchin sperm: its role in regulating the intracellular pH during the acrosome reaction." Biochem Biophys Res Commun 364(3): 470-5.

Delgado-Buenrostro, N. L., E. O. Hernandez-Gonzalez, et al. (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(2): 198-210.

Ducummon, C. C. and T. Berger (2006). "Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species." Zygote 14(3): 249-57.

Dvorakova, K., H. D. Moore, et al. (2005). "Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization." Reproduction 130(1): 61-9.

Eddy, E.M. (2006). The spermatozoon. En: Knobil, Neills's. (Eds.). *Physiology of reproduction*. Academic Press, Elsevier.

Etkovitz, N., S. Rubinstein, et al. (2007). "Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation." Biol Reprod 77(2): 263-73.

Farhan H, Hsu VW. Cdc42 and Cellular Polarity: Emerging Roles at the Golgi. *Trends Cell Biol*. 2016 Apr;26(4):241-248. doi: 10.1016/j.tcb.2015.11.003. Epub 2015 Dec 17.

Ferreira, T., P. Prudencio, et al. "Drosophila protein kinase N (Pkn) is a negative regulator of actin-myosin activity during oogenesis." Dev Biol 394(2): 277-91. 2014.

Fiedler, S. E., M. Bajpai, et al. (2008). "Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa." Biol Reprod 78(1): 184-92.

Finkelstein, M., B. Megnagi, et al. (2013). "Regulation of sperm motility by PIP and actin polymerization." Dev Biol.

Ghiaur, G., A. Lee, et al. (2006). "Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment." Blood 108(6): 2087-94.

- Guilluy, C., R. Garcia-Mata, et al. "Rho protein crosstalk: another social network?" Trends Cell Biol 21(12): 718-26. 2011 Dec
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science 279(5350): 509-14.
- Hernandez-Gonzalez EO, Lecona-Valera AN, Escobar-Herrera J & Mujica A 2000 Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 46 43–58.
- Horvath D, Tamas I, Sipos A, Darula Z, Becsi B, Nagy D, Ivan J, Erdodi F & Lontay B 2017 Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex. *PLoS ONE* 12 e0177046.
- Itach SB, Finklestein M, Etkovitz N, Breitbart H. Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Dev Biol*. 2012 Feb 15;362(2):154-61.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 247-69.
- Jobichen, C., K. Pal, et al. "Crystal structure of mouse RhoA:GTPgammaS complex in a centered lattice." J Struct Funct Genomics. 2012.
- Just I, Selzer J, Jung M, van Damme J, Vandekerckhove J & Aktories K 1995 Rho-ADP-ribosylating exoenzyme from *Bacillus cereus*. Purification, characterization, and identification of the NAD-binding site. *Biochemistry* 34 334–340
- Kadam, K., S. D'Souza, et al. (2007). "Spatial distribution of actin and tubulin in human sperm nuclear matrix-intermediate filament whole mounts-a new paradigm." MicroscRes Tech 70(7): 589-98.
- Kubo, T., A. Yamaguchi, et al. (2008). "The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders." Ther Clin Risk Manag 4(3): 605-15.

Lang, P., F. Gesbert, et al. (1996). "Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes." EMBO J 15(3): 510-9.

Lessey, E. C., C. Guilluy, et al. "From mechanical force to RhoA activation." Biochemistry 51(38): 7420-32. 2012 Sep

Lim, Y., S. T. Lim, et al. (2008). "PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility." J Cell Biol 180(1): 187-203.

Liu, D. Y., G. N. Clarke, et al. (2005). "Exposure of actin on the surface of the human sperm head during in vitro culture relates to sperm morphology, capacitation and zona binding." Hum Reprod 20(4): 999-1005.

Luis E Arias-Romero & Jonathan Chernoff (2013) Targeting Cdc42 in cancer, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17:11, 1263-1273.

Lu, Q., L. Lu, et al. "RhoA/mDia-1/profilin-1 signaling targets microvascular endothelial dysfunction in diabetic retinopathy." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 253(5): 669-80. 2015 Mar.

Mattioli M, Barboni B, Lucidi P & Seren E 1996 Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 45 373–381.

Michael A. Kalwat, Dean A. Wiseman, Wei Luo, Zhanxiang Wang, Debbie C. Thurmond, Gelsolin Associates with the N Terminus of Syntaxin 4 to Regulate Insulin Granule Exocytosis, *Molecular Endocrinology*, Volume 26, Issue 1, 1 January 2012, Pages 128–141.

Moreno-Fierros L, Hernandez EO, Salgado ZO & Mujica A 1992 F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* 33 172–181.

Mujica, A., F. Navarro-Garcia, et al. (2003). "Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization." Microsc Res Tech 61(1): 76-87.

Mulloy, J. C., J. A. Cancelas, et al. "Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies." Blood 115(5): 936-47 2010 Feb.

Murphy NP, Mott HR, Owen D. Progress in the therapeutic inhibition of Cdc42 signalling. *Biochem Soc Trans*. 2021 Jun 30;49(3):1443-1456. doi: 10.1042/BST20210112. PMID: 34100887; PMCID: PMC8286826.

Natasha P. Murphy, Helen R. Mott, Darerca Owen; Progress in the therapeutic inhibition of Cdc42 signalling. *Biochem Soc Trans* 30 June 2021; 49 (3): 1443–1456.

Nevins AK & Thurmond DC 2006 Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry* 281 18961–18972.

Pastey, M. K., J. E. Crowe, Jr., et al. (1999). "RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation." J Virol 73(9): 7262-70.

Pelish HE, Peterson JR, Salvarezza SB, Rodriguez-Boulan E, Chen JL, Stamnes M, Macia E, Feng Y, Shair MD & Kirchhausen T 2006 Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. *Nature Chemical Biology* 2 39–46.

Pettee, K. M., K. M. Dvorak, et al. "An mDia2/ROCK signaling axis regulates invasive egress from epithelial ovarian cancer spheroids." PLoS One 9(2): e90371. 2014.

Pireddu, R., K. D. Forinash, et al. (2012). "Pyridylthiazole-based ureas as inhibitors of Rho associated protein kinases (ROCK1 and 2)." Medchemcomm 3(6): 699-709.

Ramirez-Ramirez D, Salgado-Lucio ML, Roa-Espitia AL, Fierro R, Gonzalez-Marquez H, Cordero-Martinez J & Hernandez-Gonzalez EO 2020 Rac1 is necessary for capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Journal of Cellular Biochemistry* 121 2864–2876.

Rattanachan, S., R. Grams, et al. "Opisthorchis viverrini: analysis of the sperm-specific rophilin associated tail protein 1-like." Acta Trop 140: 34-40. 2014 Aug.

Ridley, A. J. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." Trends Cell Biol 16(10): 522-9.

Roa-Espitia AL, Hernandez-Rendon ER, Baltierrez-Hoyos R, Munoz-Gotera RJ, Cote-Velez A, Jimenez I, Gonzalez-Marquez H & Hernandez-Gonzalez EO 2016 Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation. *Biology Open* 5 1189–1199.

Romarowski A, Battistone MA, La Spina FA, Puga Molina Ldel C, Luque GM, Vitale AM, Cuasnicu PS, Visconti PE, Krapf D & Buffone MG 2015 PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis. *Developmental Biology* 405 237–249.

Sakamoto S, Ishizaki T, Okawa K, Watanabe S, Arakawa T, Watanabe N & Narumiya S 2012 Liprin-alpha controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization. *Journal of Cell Science* 125 108–120.

Salicioni, A. M., M. D. Platt, et al. (2007). "Signalling pathways involved in sperm capacitation." *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 245-59.

Sanchez-Gutierrez, M., R. G. Contreras, et al. (2002). "Cytochalasin-D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrane fusion with the egg plasma membrane." *Mol Reprod Dev* 63(4): 518-28.

Schaefer, A., N. R. Reinhard, et al. "Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation." *Small GTPases* 5(2): 6. 2014.

Sebkova N, Ded L, Vesela K, Dvorakova-Hortova K. Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction. *Reproduction*. 2013 Dec 28

Shi QX & Roldan ER 1995 Bicarbonate/CO<sub>2</sub> is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation. *Biology of Reproduction* 52 540–546.

Signorelli, J., E. S. Diaz, et al. "Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation." *Cell Tissue Res* 349(3): 765-82. 2012 Sep.

Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR, Visconti PE. 2009. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* 122(Pt 15):2741- 2749.

Spungin, B., I. Margalit, et al. (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): 2525-35.

Sun, F., A. Bahat, et al. (2005). "Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants." Hum Reprod 20(3): 761-7.

Thauerer, B., S. Zur Nedden, et al. "Protein Kinase C-Related Kinase (PKN/PRK). Potential Key-Role for PKN1 in Protection of Hypoxic Neurons." Curr Neuropharmacol 12(3): 213-8 2014.

Travis, A. J. and G. S. Kopf (2002). "The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa." J Clin Invest 110(6): 731-6.

Thumkeo, D., S. Watanabe, et al. "Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals." Eur J Cell Biol 92(10-11): 303-15 2013.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS 1995a Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121 1129–1137.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS 1995b Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121 1139–1150.

Ward CR & Storey BT 1984 Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Developmental Biology* 104 287–296.

Wickstrom, S. A., K. Alitalo, et al. (2003). "Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity." J Biol Chem 278(39): 37895-901.

Yanagimachi R (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2, 371-372.

## Anexos

### a) Solución isotónica (NaCl a 0.154M)

Diluir 4.5g de NaCl en 500 ml de agua destilada

### b) PBS 10X

Se prepara el PBS a 10x en pH7.4 (para un litro)

a. Se pesan los siguientes reactivos:

Cloruro de Sodio (NaCl)= 80g

Fosfato de Potasio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) = 2g

Fosfato de Sodio Dibásico 7•hidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ ) = 21.7g

Cloruro de Potasio (KCl)= 2g

b. Los reactivos se disuelven en 950mL de agua desionizada con ayuda de un agitador magnético.

c. Se ajusta el pH a 7.4

d. Se afora a 1000mL con agua desionizada. Se pasa el PBS a un recipiente para almacenarlo.

### c) PBS-Tritón X100 al 0.1%

Tomar 99ml de PBS 1x y 1ml de tritón X-100 y homogenizar.

### d) Medio Tyrode (medio capacitante)

- ✓ 116.7 mM NaCl (Cloruro de Sodio)
- ✓ 2.8 mM KCl (Cloruro de Potasio)
- ✓ 11.9 mM  $\text{NaHCO}_3$  (Bicarbonato de Sodio)
- ✓ 0.3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Bifosfato de Sodio)
- ✓ 0.49 mM  $\text{MgCl}_2$  (Cloruro de Magnesio)
- ✓ 0.25 mM Piruvato de Sodio
- ✓ 20 mM Lactato de Sodio

e) **Medio AH**

Para 100ml se ocuparán:

- ✓ 0.953g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para una concentración de 70mM
- ✓ 2.918g de Sacarosa para una concentración de 90mM
- ✓ 0.049g de  $\text{MgSO}_4$  para una concentración de 2mM
- ✓ 0.034g de EDTA para una concentración de 1mM
- ✓ 0.488g de MES para una concentración de 25mM

Se ajusta el a pH a 6.2

- ✓  $\text{HgCl}_2$  5mM

Para 10 ml de medio, se adicionarán los siguientes Inhibidores:

- ✓ PABA 4mM
- ✓ benzamidina 4mM,
- ✓ leupeptina 2 $\mu$ M
- ✓ aprotinina 2 $\mu$ M
- ✓ pepstatina 2 $\mu$ M

f) **Medio B**

Para 100ml se ocuparán:

- ✓  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  70Mm
- ✓ Sacarosa 100mM
- ✓  $\text{MgSO}_4$  2mM
- ✓ EDTA 1mM
- ✓ MES 25mM

Se ajusta el a pH a 6.2



Para 10 ml de medio, se adicionarán los siguientes Inhibidores:

- ✓ PABA 4mM
- ✓ benzamidina 4mM,
- ✓ leupeptina 2 $\mu$ M
- ✓ aprotinina 2 $\mu$ M
- ✓ pepstatina 2 $\mu$ M

**g) Ripa**

Para 25 ml

En Tris-HCL 25nM pH 7.6 se diluirán:

- ✓ 0.219g de NaCl para tenerlo a una concentración de 150 mM
- ✓ 0.250g de Deoxicolato de Sodio para tenerlo a una concentración del 1%
- ✓ 0.0329g de SDS para tenerlo a una concentración del 0.1%
- ✓ 250  $\mu$ l de NP40 para tenerlo a una concentración del 1%

**h) Amortiguador de lisis para proteínas fosforiladas**

Para preparar 2ml,

A 527  $\mu$ l de los componentes del amortiguador de lisis, poner lo que lo que resta de PBS (1473 $\mu$ l)

Componentes	Cantidad	Stocks	[ ] deseada
NP 40	20 $\mu$ l		
Iodeacetamida	20 $\mu$ l	1mg/ml	10mg/ml
Inhibidor de Tripsina	2 $\mu$ l	1mg/ml	1 $\mu$ g/ml
Benzamidina	100 $\mu$ l	1mg/ml	50 $\mu$ g/ml
Peptatina	5 $\mu$ l	2mg/ml	2 $\mu$ g/ml
Leupeptina	5 $\mu$ l	2mg/ml	2 $\mu$ g/ml
Aprotinina	5 $\mu$ l	2mg/ml	4 $\mu$ g/ml
PMSF 10X	50 $\mu$ l	10X (DMSO)	1mM
Complete	50 $\mu$ l	1 tableta /1ml de H <sub>2</sub> O	
Ortovanadato de Na <sup>+</sup>	40 $\mu$ l	1mM	1mM
NaF <sup>+</sup>	20 $\mu$ l	10mM	10mM
Glicerol	200 $\mu$ l	Directo	10%
Suma	527 $\mu$ l		

i) **Gel separador**

En un tubo limpio se adicionan los siguientes reactivos para él un gel separador al 10% para 10mL:

- ✓ 4mL de Agua
- ✓ 3.3mL de 30%de Acrilamida mix
- ✓ 2.5mL de 1.5M tris (pH 8.8)
- ✓ 0.1mL de 10% SDS
- ✓ 0.1mL de 10% APS
- ✓ 0.004mL de TEMED

j) **Gel Concentrador**

En un tubo limpio se adicionan los siguientes reactivos para un gel concentrador para 4mL:

- ✓ 2.7mL de agua
- ✓ 0.67mL de 30% de acrilamida mix
- ✓ 0.5mL de 1M tris (pH 6.8)
- ✓ 0.04mL de 10% SDS
- ✓ 0.04mL de 10% APS
- ✓ 0.004mL de TEMED

• **Solución de monómeros o 30% de Acrilamida mix**

1. En un recipiente se adiciona:
  - ✓ 30g de Acrilamida
  - ✓ 0.8g de Bis acrilamida
  - ✓ Agua des ionizada cbp 100 mL
2. Se filtra y se guarda en la oscuridad

- **Lauril sulfato de sodio (SDS) Al 10%**

1. Se pesa 10g de lauril sulfato de sodio en un recipiente
2. Se afora a 100mL con agua des ionizada

- **Persulfato de amonio (APS) Al 10%**

1. Se pesó 0.1g de Persulfato de Amonio en un tubo eppendorf
2. Adicionar 1mL de agua desionizada.

- **Tris 1.5M pH 8.8**

1. Se pesó 91g de Tris y se diluyen en 300 ml de agua des ionizada
2. Se ajusta el pH a 8.8
3. Se afora a 500mly se filtra.

- **Tris 1M pH 6.8**

4. Se pesó 24.22g de Tris y se diluyen en 100 ml de agua des ionizada
5. Se ajusta el pH a 6.8
6. Se afora a 200mly se filtra

k) **Amortiguador de Tricina 10X**

En un recipiente se diluyen con agua destilada:

- ✓ 121.1g de Trizma base al 0.1M
- ✓ 179.2g de Tricina 0.1M
- ✓ 10g de SDS al 1%

Se afora a 1L de agua des ionizada. Para 1X se toman 100ml de 10X y aforar 1L con agua destilada

**l) Buffer de Laemli 3X**

Para 10 ml de buffer se disuelven:

- ✓ 1.5 ml Tris 0.125M pH=6.8
- ✓ 3ml de glicerol al 50%
- ✓ 5ml de SDS al 10%
- ✓ 0.5ml de 2 – mercaptoetanol al 10%
- ✓ 1mg de azul de bromofenol al 0.005%

**m) Buffer de Corrida: (tris 0.025M – Glicina 0.192 M – SDS 0.1%) 10X**

1. En un recipiente se diluyeron con agua des ionizada:

- ✓ 30g de Trizma base
  - ✓ 144g de Glicina
  - ✓ 10g de SDS
- Se afora a 1L de agua des ionizada

**n) Amortiguador de Transferencia**

Se diluyen en 200 ml de agua hélix

- ✓ 200ml de Metanol
- ✓ 100ml de Glicina 10X mas Tris

Se afora a 1L

**o) Solución de bloqueo para WB**

Para 100ml de solución se pesan 5g de leche

Se diluyen en 100ml de PBS–Tritón

**p) Solución de CTC**

Para la solución de dilución, se pesan:

- ✓ 0.189g de NaCl
- ✓ 0.02195g de Cysteina
- ✓ 0.060g de Trizma Base
- Se diluyen en agua destilada y se ajusta el pH a 7.8
- Se afora a 25ml con agua destilada.

Se pesa 0.004g de CTC–HCL de Sigma, la cual se diluirá en 1ml de la solución anteriormente preparada.

**q) Glutaraldehído (12.5 %) –Tris 1M**

En tubo eppendorf se diluyen 100µl de glutaraldehído al 25% y 100µl de TRIS–HCL 1M pH 7.4

**r) Solución fijadora: Formaldehído al 4% y Glutaraldehído al 0.2%**

- Del Glutaraldehído al 25% se tomarán 800µl para obtener una concentración de 0.2%
- Del Formaldehído al 36% se tomarán 8.3ml para obtener una concentración al 4%
- Se afora a 100ml con PBS 1X

**s) Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) a50mM**

- Se pesan 0.1337g de NH<sub>4</sub>Cl
- Se diluirán en 50ml de PBS 1X