

Bioensayo de fusión de membranas gaméticas: Pasado, presente y futuro

Gamete membrane fusion test: Past, present and future

CLAUDIO BARROS

Laboratorio de Embriología,
Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 114-D, Santiago, Chile

The gamete membrane fusion test, that uses zona-free hamster oocytes to evaluate the fertilizing ability of human spermatozoa, is being widely used in andrologic laboratories throughout the world. This test evaluates several steps of the reproductive process such as: a) sperm capacitation; b) acrosome reaction; c) gamete membrane fusion; d) sperm chromatin decondensation; e) chromosome condensation; f) egg activation as measured by the cortical granule breakdown and completion of meiosis. This test does not evaluate the sperm transit from the vagina to the site of fertilization nor the sperm passage through the human egg vestments. However, the sperm transit has been partly solved by the use of naturally occurring human cervical mucus to obtain seminal plasma free spermatozoa. This latter technique has greatly increased the diagnostic value of the gamete membrane fusion test. Notwithstanding, the results obtained with this test can vary considerably among the different laboratories, because of variations in the experimental design of the test. These differences can have an important effect upon the attitude the scientist and/or the physician might take in a given case of infertility.

The parameters that vary most among the different laboratories are: a) obtention of seminal plasma-free spermatozoa; b) sperm concentrations; c) sperm preincubation time; d) type and concentration of serum albumin used.

The original objective of this test was to evaluate the fertilizing ability of spermatozoa of men with problems of infertility. Nowadays is being also used for the assesment of male infertility agents and drugs that might affect the human reproductive function. The correlation found between the results of the gamete membrane fusion test with fertility has resulted in its use in testing the fertilizing ability of bovine and equine spermatozoa.

El descubrimiento de la capacitación espermática en mamíferos (4; 29) fue el comienzo de una cantidad de estudios tendientes a desarrollar técnicas apropiadas para capacitar *in vitro* espermatozoides de diferentes especies de mamíferos. Esto, a su vez, llevó al desarrollo de técnicas confiables para obtener fecundación *in vitro* de ovocitos de otras tantas especies de mamíferos. Muchas investigaciones estuvieron orientadas a definir las condiciones por las cuales se podía obtener la capacitación de espermatozoides de una determinada especie de mamífero. A pesar de esto, aún hasta esta fecha no ha sido posible identificar un determinado fenómeno biológico que se pueda asociar inequívocamente con la capacitación espermática. Muchos cambios se han podido identificar en el espermatozoide antes de su entrada al ovocito, sin embargo sólo uno de ellos, la re-

acción del acrosoma, se ha demostrado que es un prerequisite para la fecundación. Generalmente se acepta que la capacitación espermática ya ha ocurrido cuando se manifiesta la hiperactivación y el espermatozoide está en condiciones de sufrir la reacción acrosomal. Cualquier consideración relacionada con la capacitación espermática antes de la entrada del espermatozoide al ovocito es sólo algo conjetural. El único criterio válido para juzgar a un espermatozoide como capacitado es después que éste ha entrado al ovocito (9; 19). En las investigaciones sobre capacitación espermática realizadas con espermatozoides de cobayo, se puso en evidencia la capacitación espermática por la observación de la reacción acrosomal en espermatozoides vivos y observados con el microscopio de contraste de fases (12; 35; 54). Sin embargo fue necesario usar ovocitos de

hamster dorado sin zona pelúcida a fin de comprobar que efectivamente los espermatozoides con reacción del acrosoma eran realmente capaces de fecundar. La comprobación de que ovocitos de hamster sin zona pelúcida eran capaces de fusionarse con espermatozoides de otras especies fue el comienzo de estudios tendientes a estudiar *in vitro* la capacidad fértil de espermatozoides de especies en las cuales es difícil la obtención de ovocitos, incluyendo la especie humana (58).

Estudios posteriores (16; 17) demostraron que la fusión de espermatozoides humanos con ovocitos de hamster sin zona pelúcida podía discriminar mejor que el espermiograma entre individuos supuestamente fértiles e infértiles. Este trabajo fue confirmado y validado con estudios de microscopía electrónica de transmisión que demostraron que los eventos que preceden a la fusión de las membranas gaméticas, como es la reacción del acrosoma, son iguales a aquellos que se observan en la fecundación homóloga. De la misma manera los eventos postfusión tales como la decondensación de la cromatina espermática, formación de los pronúcleos macho y hembra, ruptura de los gránulos corticales y eliminación del segundo polocito no son diferentes de los observados en la fecundación homóloga (17). El uso de este bioensayo para evaluar la capacidad fértil de los espermatozoides humanos ha sido confirmado por muchos otros investigadores (ver 9; 45; 56 para referencias). Este bioensayo ha recibido diferentes nombres, sin embargo en este trabajo lo denominaremos como el bioensayo de fusión de membranas gaméticas.

Breve descripción del bioensayo

La técnica (Fig. 1) consiste en superovular una hembra hamster (11) a fin de obtener, por una parte, un número mayor de ovocitos que el que se obtiene en una ovulación normal y por otra, que es la más importante, poder conocer en forma precisa el momento de la ovulación para poder recuperar ovocitos recién ovulados. Los ovocitos son tratados primero con hialuronidasa para eliminar las células del cúmulo

oóforo y luego con tripsina para eliminar la zona pelúcida (13). Estos ovocitos se hacen interactuar posteriormente con espermatozoides humanos, cuya preparación así como las condiciones para capacitarlos varían en los diferentes laboratorios (Tabla I). Las diferencias fundamentales están asociadas a: a) procedimientos para obtener espermatozoides libres de plasma seminal; b) concentración espermática; c) tiempo de capacitación; d) tipo y concentración de albúmina sérica. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto un protocolo estándar para la realización del bioensayo (1).

Preparación de espermatozoides libres de plasma seminal

Un aspecto muy importante en el bioensayo de fusión de membranas gaméticas es la preparación de espermatozoides libres de plasma seminal. A este respecto hay varias técnicas que se han propuesto. Cuando se describió por primera vez este bioensayo los espermatozoides se obtenían por filtración del semen y posterior centrifugación (58). En trabajos posteriores se utilizó la técnica descrita por Lopata *et al.* (40) para fecundación *in vitro* de ovocitos humanos (16; 17). Esta técnica consiste en colocar la muestra seminal en tubo de ensayo; en este tubo se coloca una pipeta Pasteur llena de medio de cultivo, el extremo abierto del tubo de ensayo se cierra con parafilm para evitar evaporación. Esta preparación se incuba por 30 minutos a 37°C, con lo cual se obtiene en el medio de cultivo espermatozoides con buena motilidad. La OMS recomienda colocar 0,5 a 1,0 ml de semen en un tubo de fondo redondeado y cubrirlo con 1,0 o 2,0 ml de medio de cultivo e incubar el tubo o los tubos por una hora a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ o en una atmósfera de aire en tubos bien cerrados (1). Muchas otras técnicas (Tabla I) de preparación de los espermatozoides son en general variaciones de las descritas, es decir los espermatozoides se lavan por centrifugación en medio de cultivo y luego se les deja nadar al medio de donde se colectan para su uso posterior o viceversa. Una técnica más apro-

COLECCION DE ESPERMATOZOIDES DESPUES DE MIGRAR POR MOCO CERVICAL

HEMBA HAMSTER SUPEROVULADA

COLECCION DE ESPERMATOZOIDES QUE NADAN AL MEDIO DE CULTIVO

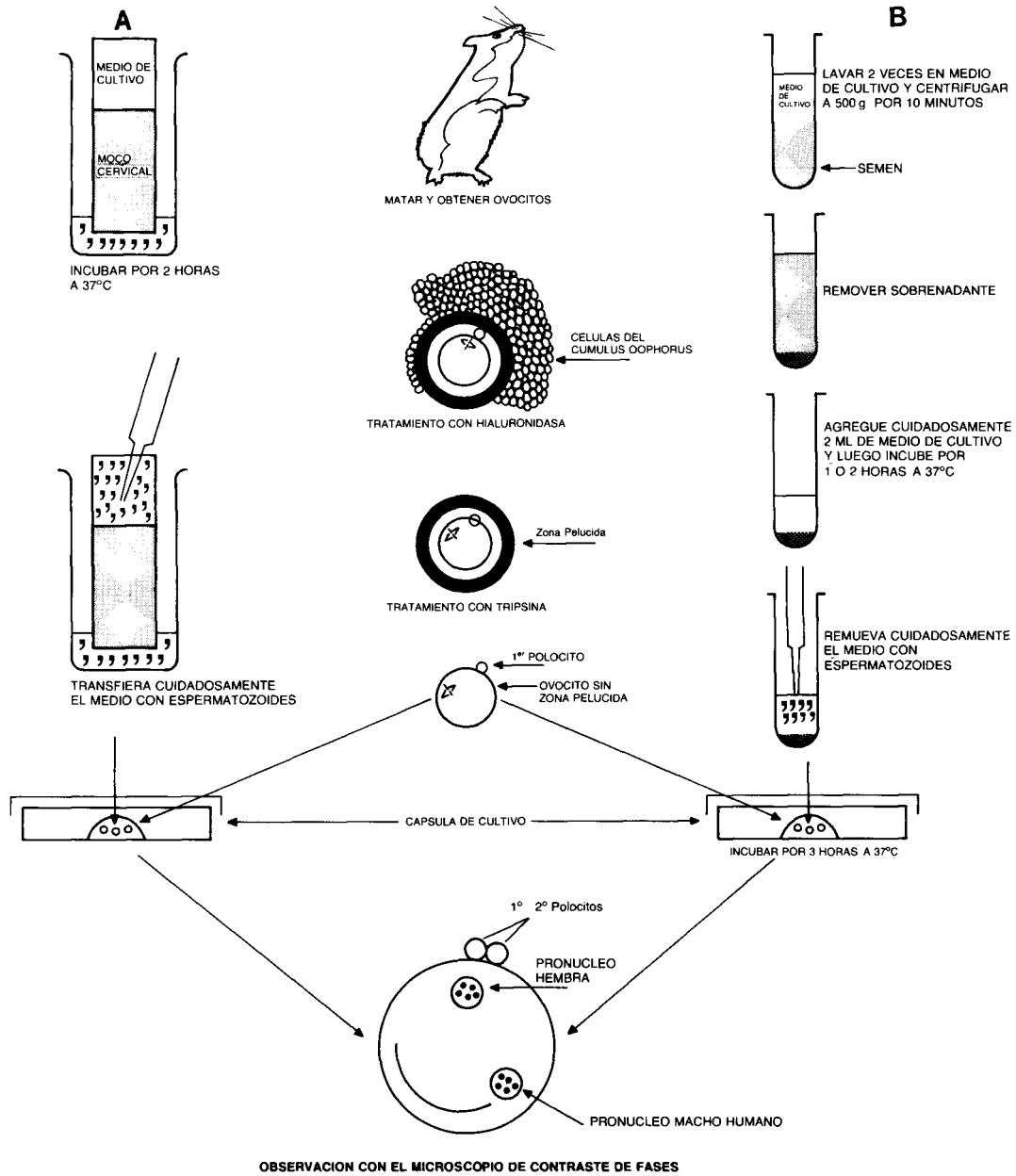


Fig. 1: Representación esquemática de las etapas para realizar el bioensayo de fusión de membranas gaméticas. En el lado derecho de la figura está el procedimiento para lavar los espermatozoides y en el lado izquierdo está el procedimiento para hacerlos migrar a través de moco cervical.

piada para la obtención de espermatozoides libres de plasma seminal fue propuesta por Overstreet *et al.*, (43) y consiste en hacer migrar los espermatozoides a través de una columna de moco cervical humano estrogénico. Esta técnica ha sido utilizada en la preparación de espermato-

zoides para evaluar su capacidad fecundante (21; 22). Una de las ventajas de esta técnica es que los espermatozoides se liberan del plasma seminal de una forma similar a la que ocurre *in vivo*. Por otra parte, espermatozoides obtenidos con esta técnica tienen una motilidad muy buena y

Parámetros relevantes a considerar en el test de fusión de membranas gaméticas*

Preparación de espermatozoides libres de plasma seminal	Concentración espermática (células/ml)	Tiempo de preincubación espermatozoides (horas)	Tiempo de coincubación de gametos (horas)	Tipo y concentración de albúmina
Dilución y centrifugación	10 ⁵	0	0,5 - 2	BSA 3 - 4 mg/ml
Nadar a medio de cultivo y centrifugación	10 ⁶	1 - 5,5	3 - 4	BSA 10 mg/ml
Dilución, filtración y centrifugación	10 ⁷	6 - 10	5 - 6	BSA 30 mg/ml
Paso por columna de moco cervical humano	10 ⁸	10		HSA 3 - 5 mg/ml
Nadar a medio de cultivo				HSA 30 - 35 mg/ml
Separación de gradiente de Percoll				

Modificada de Barros y Jedlicki (1985).

* Cada columna es independiente de las otras.

el porcentaje de formas morfológicamente normales es significativamente mayor que el que se encuentra en la muestra de semen (20). Más aún, este procedimiento se puede hacer con el moco cervical de la pareja, antes de realizar el bioensayo de fusión de membranas gaméticas, lo que proporciona más información en relación a la condición de fertilidad de la pareja en estudio.

Concentración espermática

La concentración espermática utilizada por los diferentes laboratorios no muestra grandes variaciones y no parece ser la fuente de desacuerdos importantes. En general hay un consenso que es necesario utilizar concentraciones de espermatozoides en un rango de 10⁶ y 10⁷. Sin embargo es importante enfatizar que lo que es importante es la concentración de espermatozoides con motilidad progresiva. En efecto, se ha podido demostrar que al usar concentraciones espermáticas menores que 0,4 x 10⁶, la penetración de ovocitos de hamster se ve seriamente reducida (2). La necesidad de encontrar un límite inferior de concentración espermática es de gran importancia cuando se evalúan individuos con oligospermia severa. Sin embargo hemos podido detectar un caso de un individuo con una concentración espermática de 0,465 x 10⁶ que resultó en un 4,5% de fusión de membranas gaméticas (18).

Tiempo de capacitación

Este parámetro parece ser de gran importancia en el bioensayo de fusión de membranas gaméticas, y es probablemente la fuente más común de discrepancias entre los diferentes laboratorios. Se ha publicado que es posible la fusión de membranas gaméticas sin una preincubación previa de los espermatozoides y con una coincubación de dos horas. Sin embargo también se ha demostrado que espermatozoides de diferentes individuos pueden requerir de tiempos distintos para capacitarse (44). Otros autores han demostrado que preincubaciones de 2 a 3 horas producen porcentajes mayores de penetración que preincubaciones de 18 a 24 horas (59). Por otra parte se ha sugerido que con preincubaciones largas hay menos riesgos de obtener resultados falsos negativos (37), recomendando la OMS preincubaciones de 18 a 24 horas en una atmósfera del 5% de CO₂ o en una atmósfera de aire, pero en tubos cerrados (1). Sin embargo, también se ha demostrado que espermatozoides preincubados por 18 a 24 horas son capaces de fusionarse con los ovocitos de hamster sin zona pelúcida, pero pueden ser incapaces de penetrar la zona pelúcida humana (34).

De la discusión anterior se puede inferir cuán difícil es estandarizar el tiempo de preincubación a utilizar en este bioensayo,

especialmente cuando de sus resultados se espera tener información útil para determinar el tiempo de preincubación en la práctica de la inseminación instrumental y/o de la fecundación *in vitro*.

Intimamente asociado al tiempo de preincubación está el tiempo de coincubación de los gametos. Se ha sugerido que lo más importante es en realidad el tiempo total que han permanecido los espermatozoides *in vitro*, es decir, la suma del tiempo de preincubación más el tiempo de coincubación (24), sin embargo se ha comunicado recientemente que los ovocitos de hamster sin zona pelúcida pierden rápidamente su capacidad de fusión —juzgada por la decondensación de la cromatina espermática— con los espermatozoides humanos cuando se les mantiene a 25°C con una vida media de alrededor de 50 minutos (52). Por otra parte se ha podido demostrar que ovocitos envejecidos *in vivo*, que se encontraban activados partenogénicamente, pueden fusionarse con el espermatozoide, pero la capacidad de decondensar la cromatina espermática se encuentra inhibida (36). Este hecho es importante por cuanto un mal manejo de los gametos *in vitro* podría arrojar resultados que se consideren negativos pero solamente por el envejecimiento de los ovocitos y no por una pérdida de la capacidad fecundante del espermatozoide. El problema del envejecimiento ovocitario se puede evitar almacenando los ovocitos en medio de cultivo a 4°C por hasta 24 o 48 horas sin que se observe una diferencia en los valores de fusión gamética al compararse con los valores obtenidos al usar ovocitos recién ovulados (18). Es la opinión de este autor que un tiempo de coincubación de los gametos de alrededor de dos horas sería suficiente para tener evidencia de fusión gamética. Esto es válido sólo y cuando los espermatozoides estén capacitados. Existe evidencia experimental que demuestra que después de una y media hora de interacción entre espermatozoides humanos y ovocitos de hamster sin zona pelúcida, se puede observar decondensación de la cromatina espermática humana (17). Esta idea se ve apoyada por otro tipo de evidencia que ha demostrado que la fusión gamética ocurre

dentro de un período de tiempo de 2,5 minutos después de mezclar espermatozoides de hamster capacitados con ovocitos de hamster sin zona pelúcida. También se ha establecido que pronúcleos bien desarrollados con nucléolos se pueden observar después de dos horas de iniciada la coincubación (11).

Tipo y concentración de albúmina a utilizar

Los espermatozoides de la mayor parte de las especies de mamíferos requieren de la presencia de macromoléculas en el medio de cultivo para capacitarse. Una excepción la constituyen los espermatozoides de cobayo, los que se pueden capacitar en medio MCM (5), que es una solución salina sin componentes macromoleculares. Se ha podido comprobar que la albúmina sérica es la macromolécula más eficiente para la capacitación espermática, aunque su papel en ese fenómeno no se conoce. La presencia de la albúmina se ha asociado a la mantención de la motilidad espermática (46) y/o a la remoción o modificación de materiales presentes en la superficie del espermatozoide y cuya remoción o modificación sería necesaria para la capacitación (38; 55). En la ejecución del bioensayo de fusión de membranas gaméticas se han utilizado albúmina sérica humana y de bovino y en concentraciones que van desde 0,3 a 3,5% (ver 9; 56). Sin embargo la OMS (1) recomienda el uso de 3,5 mg/ml albúmina sérica de bovino (Fracción V).

No se ha estudiado el efecto de macromoléculas inertes en la capacitación de espermatozoides humanos, y que podrían tener ventajas tanto para el estudio del fenómeno como en el tratamiento de los espermatozoides previo a la inseminación instrumental en casos de infertilidad conyugal de causa masculina. Otros compuestos con los cuales se puede obtener un aumento en la tasa de fusión gamética son la yema de huevo (25, 33) y suero sanguíneo (30, 53).

En algunos casos en que el bioensayo realizado en condiciones estándar es negativo, se le puede positivar después de incubar los espermatozoides en medios con-

teniendo yema o suero sanguíneo. El bioensayo de fusión de membranas gaméticas realizado en las condiciones descritas anteriormente aumenta su valor diagnóstico debido a que descarta a aquellos individuos cuyos espermatozoides son intrínsecamente incapaces de fusionarse con el ovocito.

Funciones del espermatozoide que son medidas por el bioensayo de fusión de membranas gaméticas

En todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha se ha demostrado más allá de cualquier duda que la reacción del acrosoma es un prerequisite esencial para la fusión gamética (6; 23). Por lo tanto el primer evento que mide este bioensayo es precisamente la posibilidad que tiene un espermatozoide de experimentar la reacción acrosomal. La reacción del acrosoma (Figs. 2, 3) se describió originalmente como un proceso de doble ruptura y doble fusión entre la membrana plasmática y acrosómica externa subyacente (15, 32). Observaciones ultraestructurales de huevos humanos fecundados *in vitro* muestran que la reacción acrosomal de los espermatozoides antes de fecundar al huevo humano (51) es similar a la descrita originalmente en este bioensayo (17). Sin embargo, estudios recientes han propuesto que el espermatozoide humano seguiría un modelo distinto para la reacción acrosómica (42). Sólo los espermatozoides que han sufrido la reacción del acrosoma podrán fusionarse con el ovocito y en este proceso las microvellosidades que cubren la superficie ovocitaria (31) se fusionan con la membrana plasmática del espermatozoide (8; 57). De la misma forma los espermatozoides humanos que han experimentado la reacción del acrosoma se fusionan por medio de las microvellosidades (Figs. 4, 5). Por otra parte se acepta que al momento de ocurrir la reacción del acrosoma ya ha ocurrido la capacitación espermática, entonces este bioensayo también mide la ocurrencia de la capacitación.

Los espermatozoides que se han fusionado con el ovocito maduro pierden rápidamente la envoltura nuclear (23) seguido inmediatamente por la decondensación de la cromatina espermática (7). Este fenó-

meno tiene gran importancia debido a que es la base de la formación del pronúcleo macho sin el cual el desarrollo no es posible. Espermatozoides humanos que se han fusionado con ovocitos de hamster son capaces de decondensar su cromatina (Fig. 6, 7) y formar un pronúcleo macho bien desarrollado (17) y eventualmente llevar a la primera división de segmentación en donde se pueden poner en evidencia los cromosomas humanos (50; 26). Por otra parte se puede medir la activación ovocitaria expresada por la ruptura de los gránulos corticales y por la eliminación del segundo polocito (17). El bioensayo de fusión de membranas gaméticas no mide sin embargo ni la migración espermática desde la vagina hasta el sitio de la fecundación como tampoco el paso del espermatozoide a través de la zona pelúcida. No obstante un aspecto de gran relevancia como es el paso del espermatozoide a través del moco cervical se ha incorporado como un elemento adicional del bioensayo (14; 21) de fusión de membranas gaméticas, lo que aumenta considerablemente el valor diagnóstico y pronóstico del bioensayo. En este sentido se ha podido establecer que los espermatozoides humanos se modifican de alguna manera durante su paso a través del moco cervical. Esta modificación se ha podido constatar debido a que los porcentajes de fecundación, número de espermatozoides por ovocito y número de espermatozoides adheridos por ovocito, es menor cuando se utilizan espermatozoides que han migrado a través de moco cervical que cuando se utilizan espermatozoides que no lo han hecho (22). Esta evidencia sugiere que el moco cervical, además de modificar al espermatozoide en su interacción con la membrana plasmática del ovocito, podría actuar previniendo la capacitación espermática y de esta forma prolongar la vida fértil del espermatozoide.

Objetivo del bioensayo

El bioensayo de fusión de membranas gaméticas fue propuesto originalmente como un bioensayo adicional al espermiograma para evaluar la capacidad fértil de los espermatozoides de individuos con problemas

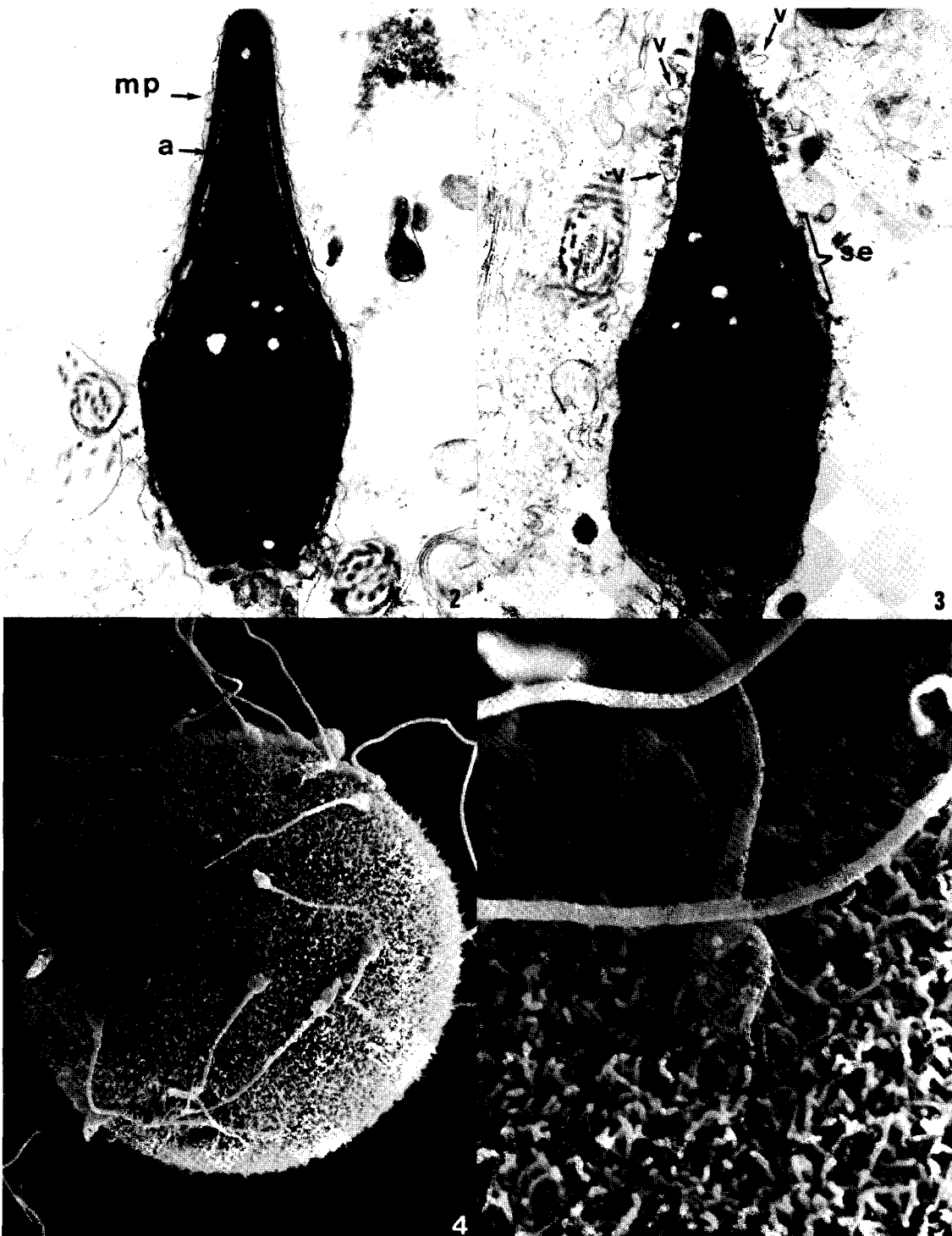


Fig. 2: Espermatozoide humano recién eyaculado y observado con microscopía electrónica de transmisión. Observe el acrosoma (a) no reaccionado y recubierto por la membrana plasmática (mp). X26.000.

Fig. 3: Espermatozoide humano preincubado *in vitro* en medio de cultivo para efectuar el bioensayo de fusión de membranas gaméticas. Observe las vesícula (v) resultantes de la reacción de la porción principal del acrosoma. El segmento ecuatorial (se) se encuentra aún intacto. X26.000.

Fig. 4: Ovocito de hamster sin zona pelúcida observado con el microscopio electrónico de barrido. Observe los espermatozoides humanos en estrecha asociación con las microvellosidades. X1.400.

Fig. 5: Espermatozoide humano en el proceso de fusión con las microvellosidades del ovocito de hamster. X7.100.

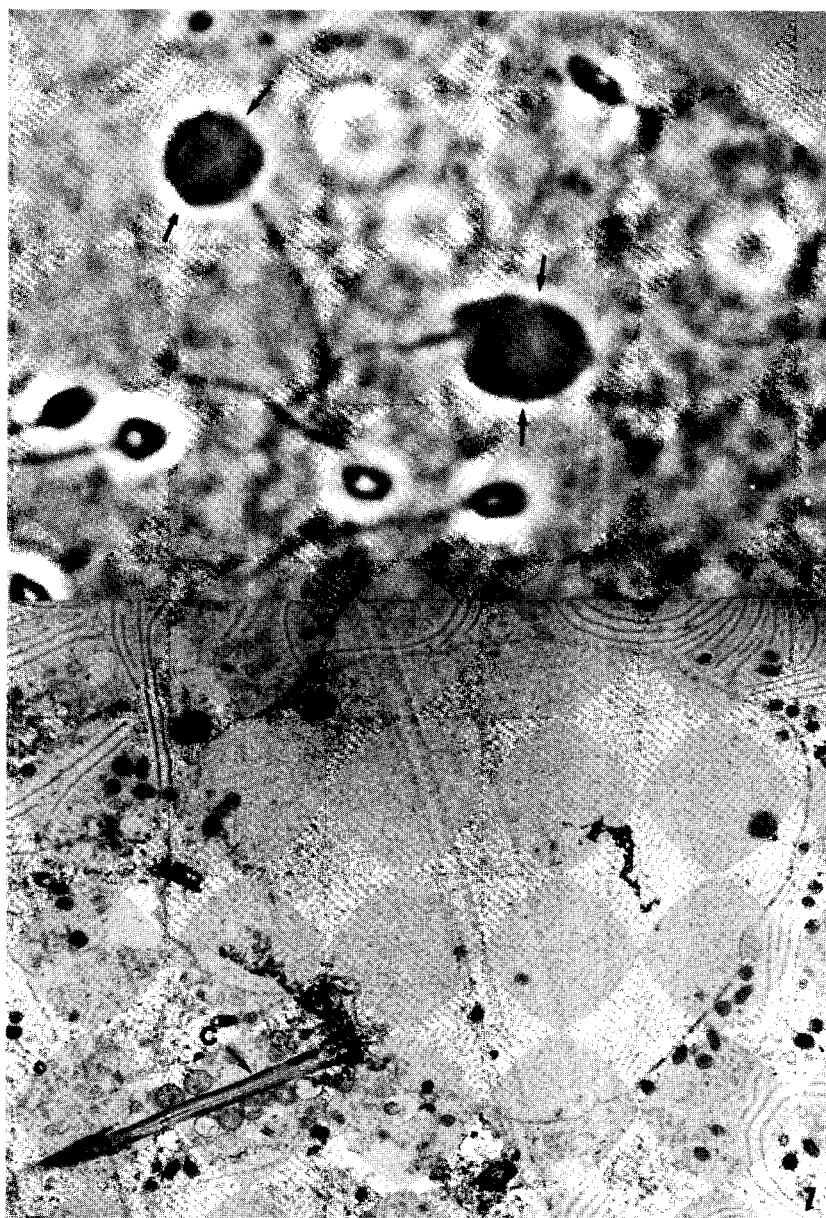


Fig. 6: Ovocito de hamster sin zona pelúcida en el que se puede observar, con el microscopio de contraste de fases, la decondensación de la cromatina de dos espermatozoides humanos (flechas). X2.500.

Fig. 7: Ovocito de hamster en el que se observa la cromatina decondensada de un espermatozoide humano. Observe que la cola (c) aún está en estrecha asociación con el pronúcleo macho en desarrollo. X8.580.

de infertilidad (16; 17). Estudios posteriores han intentado utilizar el bioensayo para propósitos diferentes de los originalmente sugeridos. Al hacer esto muchos investigadores han ido más allá de lo que el bioensayo puede ofrecer. Por ejemplo se ha comunicado que ciertos serotipos de micoplasma muestran gran interferencia con la capacidad de fusión de los espermato-

zoides con los ovocitos de hamster (27), sin embargo en otro estudio se ha comunicado que no hay un efecto directo entre la presencia de micoplasma y el éxito de la fecundación *in vitro* de ovocitos humanos (47). Más aún, los mismos autores encontraron que las tasas de segmentación fueron mejores en el grupo contaminado que en el grupo no contaminado. No obstante, la

presencia de *Ureaplasma urealyticum* o *Escherichia coli* en los cultivos tenían un efecto negativo en el desarrollo embrionario y en el establecimiento de embarazos (48). Estos hechos indican que el bioensayo debe ser usado con mucho criterio cuando se está tratando de probar o negar el efecto de agentes que puedan estar asociados con la reproducción. En esta misma argumentación me parece importante destacar que experimentos en los que se ensaya *in vitro* drogas que normalmente actúan sistémicamente tales como el citrato de clomifeno (28) carecerían de valor al ser ensayadas *in vitro* en el bioensayo de fusión de membranas gaméticas. Algo completamente diferente es el uso del bioensayo en la evaluación de un tratamiento terapéutico especial. Un objetivo, quizás no tan explícito pero que ha estado siempre entre los objetivos del bioensayo, es su uso potencial en la evaluación de contraceptivos masculinos, esto es, disponer de un medio eficiente de evaluar la capacidad fecundante de individuos sometidos a tratamientos contraceptivos. En este sentido las técnicas del TEST-yema (26) y del ionoforo de calcio A 23187 (3) podrían optimizar en forma considerable el bioensayo de fusión de membranas gaméticas para evaluar la capacidad fecundante de individuos con bajo recuento espermático.

Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados ha sido objeto de discrepancias. Así varios autores han propuesto que se considere como infértiles a individuos que den valores de penetración iguales o inferiores al 15% (41; 49). Por otra parte se ha indicado que no importa el porcentaje de penetración sino la ocurrencia del fenómeno para considerarlo como un resultado positivo (10; 17). Parecería entonces muy arbitrario establecer límites de fertilidad con este bioensayo. Es la opinión de este autor que provisto que un solo espermatozoide se fusione con un ovocito, los espermatozoides de ese individuo deben considerarse como potencialmente fértiles. Este hecho se ve apoyado por el hallazgo de que en 16 parejas estudiadas por problemas de infertilidad y

en las cuales el bioensayo de fusión de membranas gaméticas fue menor que 6%, nueve fueron capaces de concebir después de ser inseminadas instrumentalmente (39). Es importante destacar que en otros pacientes y con el mismo protocolo experimental, se obtuvieron resultados de un 100% de fusión gamética con un alto grado de poliespermia. Por las razones discutidas arriba no es recomendable recurrir a la inseminación instrumental heteróloga en los casos de un bioensayo con porcentajes bajos de penetración.

El potencial de este bioensayo es enorme particularmente para el estudio y ensayo de las condiciones que permitan optimizar la capacidad fecundante del espermatozoide humano y su posible aplicación a problemas de infertilidad por causa masculina.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Jorge Garrido las facilidades para el uso de los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido. Los trabajos originales han sido financiados con Grants DIUC y CONICYT y Fundación Rockefeller.

REFERENCIAS

1. AITKEN, J.R. (1986) *Int. J. Androl. suppl.* 6: 197-199.
2. AITKEN, J.R.; BEST, F.S.M.; RICHARDSON, D.W.; DJAHANBAKHCH, O. y LEES, M.M. (1982) *Fertil. Steril.* 38: 68-76.
3. AITKEN, J.R.; ROSS, A.; HARGREAVE, T.; RICHARDSON, D. y BEST, F. (1984) *J. Androl.* 5: 321-329.
4. AUSTIN, C.R. (1951) *Aust. J. Sci. Res. Ser. B* 4: 581-596.
5. BARROS, C. (1974) En: E.M. Coutinho y F. Fuchs (eds.) *Physiology and Genetics of Reproduction, Part B*, Plenum Press, N.Y. pp. 3-24.
6. BARROS, C.; BERRIOS, M. (1977) *J. Exp. Zool.* 201: 65-72.
7. BARROS, C.; FRANKLIN, L.E. (1968) *J. Cell. Biol.* 37: C13-C18.
8. BARROS, C.; HERRERA, E. (1977) *J. Reprod. Fertil.* 49: 47-50.
9. BARROS, C.; JEDLICKI, A. (1985) En: J. Testart y R. Frydman (eds.) *Human In vitro Fertilization. Actual Problems and Prospects*. Elsevier, Amsterdam, pp. 79-91.
10. BARROS, C. & LEAL, J. (1982) En: E.S.E. Hafez y K. Semm (eds.) *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. MTP press Ltd. Lancaster pp. 37-49.
11. BARROS, C.; YANAGIMACHI, R. (1972) *J. Exp. Zool.* 180: 251-266.
12. BARROS, C.; BERRIOS, M., HERRERA, E. (1973) *J. Reprod. Fertil.* 34: 547-549.
13. BARROS, C.; FUJIMOTO, M.; YANAGIMACHI, R. (1973) *J. Reprod. Fertil.* 35: 89-95.

14. BARROS, C.; JEDLICKI, A.; VIGIL, P. (1988) *Human Reprod.* 3: 637-644.
15. BARROS, C.; BEDFORD, J.M.; FRANKLIN, L.E.; AUSTIN, C.R. (1967) *J. Cell. Biol.* 34: C1-C5.
16. BARROS, C.; GONZALEZ, J.; HERRERA, E.; BUSTOS-OBREGON, E. (1978) *Contraception* 17: 87-92.
17. BARROS, C.; GONZALEZ, J.; HERRERA, E. y BUSTOS-OBREGON, E. (1979) *Andrologia* 11: 197-210.
18. BARROS, C.; HERRERA, E.; FUENZALIDA, I. y ARGUELLO, B. (1986) *Gamete Res.* 14: 149-157.
19. BARROS, C.; JEDLICKI, A.; BIZE, I.; AGUIRRE, E. (1984) *Gamete Res.* 9: 31-43.
20. BARROS, C.; VIGIL, P.; HERRERA, E.; ARGUELLO, B.; WALKER, R. (1984) *Arch. Androl.* 12 (suppl.): 95-107.
21. BARROS, C.; VIGIL, P.; HERRERA, E.; PEREZ, A.; GUADARRAMA, A.; BUSTOS-OBREGON, E. (1983) *Micr. Electr. Biol. Cel.* 7: 13-19.
22. BARROS, C.; JEDLICKI, A.; FUENZALIDA, I.; HERRERA, E.; ARGUELLO, B.; VIGIL, P.; VILLASECA, P.; LEONTIC, E. (1988) *J. Reprod. Fert.* 82: 477-484.
23. BEDFORD, J.M.; COOPER, G.W. (1978) En: G. Poste y G.L. Nicolson (eds.) *Membrane Fusion*, Elsevier North-Holland Biomedical Press. pp. 65-125.
24. BINOR, Z.; SOKOLOSKI, J.E.; WOLF, D.T. (1980) *Fertil. Steril.* 33: 321-327.
25. BOLANOS, J.R.; OVERSTREET, J.W.; KATZ, D.F. (1983) *Fertil. Steril.* 39: 536-541.
26. BRANDRIFF, B.; GORDON, L.; WATCHMAKER, G. (1985) *Gamete Res.* 11: 253-259.
27. BUSOLO, F.; ZANCHETTA, R. (1985) *Fertil. Steril.* 43: 110-114.
28. CHAN, S.Y.W.; WANG, C.C.L.; TANG, L.C.H. (1985) *Fertil. Steril.* 43: 773-776.
29. CHANG, M.C. (1951) *Nature* 168: 697-698.
30. COHEN, J.; FEHILLY, C.B. & WALTERS, D.E. (1985) *Fertil. Steril.* 44: 254-262.
31. EBENSPERGER, C.; BARROS, C. (1984) *Gamete Res.* 9: 387-397.
32. FLECHON, J.E.; HARRISON, R.A.P.; FLECHON, B. & ESCAIG, V. (1986). *J. Cell. Sci.* 81: 43-63.
33. GONZALEZ, A.M.; HERRERA, E.; FUENZALIDA, I. & BARROS, C. (1986) Proc. VI Reunión Sec. Biol. Reprod. Desarrollo, R-18.
34. GOULD, J.E.; OVERSTREET, J.W.; YANAGIMACHI, H.; YANAGIMACHI, R.; KATZ, D.F.; HANSON, F.W. (1983) *Fertil. Steril.* 40: 344-352.
35. HANADA, A.; CHANG, M.C. (1972) *Biol. Reprod.* 6: 300-309.
36. JEDLICKI, C.; BARROS, C.; SALGADO, A.M.; HERRERA, E. (1986) *Gamete Res.* 14: 347-354.
37. JOHNSON, J.P.; ALEXANDER, N.J. (1984) *Fertil. Steril.* 41: 599-602.
38. LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. (1985) *Gamete Res.* 12: 183-224.
39. LEONTIC, E.; HERRERA, E.; ARGUELLO, B.; VIGIL, P.; BARROS, C. (1986) Proc. ALIRH, R-075.
40. LOPATA, A.; PATULLO, M.J.; CHANG, A.; JAMES, B.; (1976) *Fertil. Steril.* 27: 677-684.
41. MARGALIOH, E.J.; LAUFER, N.; NABOT, D.; VOSS, R. & SCHENKER, J.S. (1983) *Arch. Androl.* 10: 67-71.
42. NAGAE, T. YANAGIMACHI, R.; SRIVASTAVA, P.N.; YANAGIMACHI, H. (1986) *Fertil. Steril.* 45: 701-707.
43. OVERSTREET, J.W.; GOULD, J.E.; KATZ, D.F.; HANSON, F.W. (1980) *Fertil. Steril.* 34: 604-606.
44. PERREAULT, S.D.; ROGERS, B.J. (1982) *Fertil. Steril.* 38: 258-260.
45. PRASAD, M.R.N. (1984) *Int. J. Androl.* 7: 5-22.
46. QUINN, P.; WHITTINGHAM, D.G. (1982) En: E.S.E. Hafez y K. Semm (eds.). *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, MTP Press Ltd. pp. 31-36.
47. RIEDEL, H.H.; LANGENBUCHER, H.; METTLER, L. (1985) *J. Androl. (suppl. March/April)* 6: 42-P.
48. RIEDEL, H.H.; LANGENBUCHER, H.; METTLER, L. (1986) Proc. V World Congress on Human Reproduction, Athens, Greece 275-279.
49. ROGERS, B.J.; VAN CAMPEN, H.; UENO, M.; LAMBERT, H.; BRONSON, R.; HALE, R. (1979) *Fertil. Steril.* 32: 664-670.
50. RUDAK, E.; JACOBS, P.A.; YANAGIMACHI, R. (1978) *Nature* 274: 911-912.
51. SOUPART, P.; STRONG, P.A. (1974) *Fertil. Steril.* 25: 11-44.
52. SYMS, A.J.; JOHNSON, A.R.; LIPSHULTZ, L.I.; SMITH, R.G. (1985) *Fertil. Steril.* 43: 766-772.
53. VIGIL, P.; LUNA, L.; VALDEZ, E.; HERRERA, E.; BUSTOS-OBREGON, E.; BARROS, C.; LEONTIC, E. (1987). *Proc. VI Reunión Sec. Biol. Reprod. Desarrollo.*
54. YANAGIMACHI, R. (1972) *J. Reprod. Fert.* 28: 477-480.
55. YANAGIMACHI, R. (1981) En: L. Mastroianni, Jr. y J.D. Biggers (eds.) *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, Plenum Publishing Co. N.Y. pp. 81-182.
56. YANAGIMACHI, R. (1984) *Gamete Res.* 10: 187-232.
57. YANAGIMACHI, R.; NODA, Y.D. (1970) *J. Ultrastruct. Res.* 31: 486-493.
58. YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H.; ROGERS, B.J. (1976) *Biol. Reprod.* 15: 471-476.
59. ZAUSNER-GUELMAN, B.; BLASCO, L.; WOLF, D.P. (1981) *Fertil. Steril.* 36: 771-777.