

La reacción acrosómica en espermatozoide de mamífero. Aspectos bioquímicos

The mammalian sperm acrosome reaction.
A biochemical view

MIGUEL N. LLANOS

Departamento de Ciencias Médico-Biológicas y Básicas.
Facultad de Medicina-División Sur y División de Ciencias Básicas. INTA.
Universidad de Chile. Casilla N° 15138. Santiago 11. Chile

Mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction (AR) are essential prerequisites for fertilization.

This report examines part of the molecular events developed during capacitation and the AR of mammalian spermatozoa; especially those events related to sperm head membrane bound enzymes and phospholipids. For this purpose, it has been analysed results obtained from an *in vitro* capacitation/acrosome reaction inducing system for golden hamster spermatozoa. First of all, the analysis is focused in the phospholipid transmethylation reactions possibly occurring at plasma membrane level during capacitation and the AR; it is suggested too, that this pathway could provide the substrate for a sperm head membrane bound phospholipase A₂ which is able to produce a lysophospholipid (a fusogen) and fatty acids; both of them, very likely involved in the late steps of the AR. These assumptions are confirmed by experiments demonstrating that exogenous lysophospholipids and/or cis-unsaturated fatty acids are able to accelerate AR in previously capacitated spermatozoa. It is also suggested future research in this field, which could involve a sperm phospholipase C specific for phosphatidylinositol, 4.5 biphosphate; its products, Inositol trisphosphate and diacylglycerol could act as second messengers with a probable physiological function during capacitation. Finally, an integrative mechanism for the AR-involving phospholipid methylation, acrosin activation, phospholipase A₂ activation and endogenous lysophospholipids and fatty acids production is proposed as a model for discussion.

Para que ocurra fertilización en mamíferos tanto *in vivo* como *in vitro*, es esencial que el gameto masculino cumpla ciertas condiciones indispensables como: motilidad, capacitación y reacción acrosómica. El significado de la capacitación no es sabido con certeza; en una primera instancia, los trabajos de Austin (1951, 1952), Chang (1951) y más tarde otros investigadores determinaron que el espermatozoide de mamífero requiere de un cierto período de incubación en el útero y el oviducto, o bajo ciertas condiciones *in vitro*, de modo que pueda desarrollar ciertos cambios celulares y moleculares que le dan la capacidad de fertilizar (Bedford, 1970; Barros, 1974; Meizel, 1978; Yanagimachi, 1981). Una definición operacional útil de capacitación se refiere a que aquellos eventos desarrollados durante dicho proceso preparan al espermatozoide para que pueda efectuar la reacción acrosómica (Bedford, 1970, 1983). El proceso de capacitación puede

incluir pérdida de proteínas de superficie, cambios en la permeabilidad a ciertos iones, reacciones bioquímicas a nivel de la membrana plasmática (fundamentalmente aquella que implican fosfolípidos), activación de enzimas hidrolíticas, etc. (Barros, 1974; Meizel, 1984; Llanos y Meizel, 1983). Sin embargo, hasta el momento no hay un conocimiento detallado y secuencial de los posibles eventos de este proceso en mamíferos; además, dado que no hay diferencias morfológicas entre un espermatozoide recién eyaculado y uno "capacitado", los procesos involucrados en la capacitación debiesen ser esencialmente de carácter bioquímico-molecular (McRorie y Williams, 1974; Meizel, 1984). Experimentalmente se ha considerado que el espermatozoide capacitado es capaz de moverse en forma muy vigorosa, hecho que se ha definido como hiperactivación de la motilidad (Yanagimachi, 1981), cuya característica principal se refiere a un mo-

vimiento del flagelo tipo “fusta de látigo” y la cabeza del espermatozoide trazando figuras de 8s erráticas. Actualmente la hiperactivación está reconocida en la mayoría de las especies de mamíferos (Yanagimachi, 1981), sugiriéndose que su significado fisiológico —desde un punto de vista hidrodinámico— estaría relacionado con la facilitación de la penetración a través del cúmulo y la zona pelúcida durante el proceso de fertilización (Katz y Overstreet, 1980). En relación a este punto, es importante hacer notar que Katz y Yanagimachi (1980) han observado espermatozoides de hamster hiperactivados localizados en la pared de la ampulla del oviducto en el momento de la fertilización.

Acrosoma y reacción acrosómica (RA)

El acrosoma del espermatozoide de mamífero es un organelo que cubre los dos tercios anteriores de la cabeza de esta célula y que ha sido definido como un lisosoma modificado y altamente especializado (Hartree, 1975) o bien como un gránulo secretorio (Friend, 1977). La matriz acrosomal está delimitada por una membrana acrosomal externa cercana a la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y una membrana acrosomal interna sobre la membrana nuclear (Fig. 1). La reacción acrosómica (RA) es un proceso excitotico organizado y progresivo que consta de una

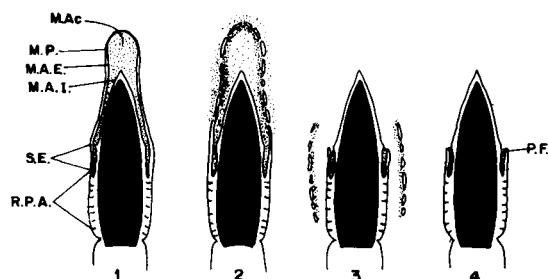


Fig. 1: Diagrama que muestra progreso de la RA. 1. acrosoma intacto antes de la RA. 2. Fusión y vesiculación de la M.P. y la M.A.E. en múltiples sitios. 3. El espermatozoide reaccionado se aleja de las vesículas ya formadas. 4. La reacción se ha completado.

Abreviaturas: M.P., membrana plasmática; M.A.E., membrana acrosomal externa; M.A.I., membrana acrosomal interna; S.E., segmento ecuatorial; R.P.A., región post acrosomal; P.F., punto de fusión de M.P. y M.A.E. a nivel del S.E. (criterio morfológico a nivel de microscopía electrónica para definir una RA fisiológica); M. Ac., matriz acrosomal.

fusión y posteriormente vesiculación (fenestración) de la membrana acrosomal externa y la plasmática que la recubre (Barros *et al.*, 1967; Bedford, 1970, 1983; Rusell *et al.* 1979; y Fig. 1). Se ha planteado que este evento es esencial para el paso del espermatozoide a través de la matriz del cúmulo oóforo, como también para el paso a través de la zona pelúcida y para la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del oocito. También se ha planteado que las enzimas hidrolíticas liberadas del acrosoma como resultado de la RA o asociadas a la membrana acrosomal interna estarían jugando una función putativa en los eventos antes citados (McRorie y Williams, 1974). El tiempo que demora el espermatozoide en experimentar la RA varía de acuerdo a la especie y las condiciones de incubación; Yanagimachi y Usui (1974) demostraron que el espermatozoide “capacitado” de cobayo experimentaba la RA luego de 1 minuto de exposición a iones Ca^{++} ; Talbot y Franklin (1976) estimaron en aproximadamente 20 min el tiempo requerido por el espermatozoide de hamster para completar la RA. Posteriormente Ohzu y Yanagimachi (1982) y Riffo y Llanos (1985) demostraron que la RA puede ser inducida en un alto porcentaje en espermatozoides de hamster, luego de 0,5-1 min de la adición del fusógeno lisofosfatidilcolina. El tiempo requerido por el espermatozoide fertilizante para experimentar la RA *in vivo* no es sabido con certeza.

Además de lo ya planteado, Yanagimachi (1977, 1978) ha postulado otra función biológica para la RA; de acuerdo a su posición, este evento gatillaría a través de un mecanismo no conocido aún, un cambio fisiológico en la membrana plasmática que cubre el segmento ecuatorial, y/o la región postacrosomal, lo que traería como consecuencia que dicha membrana fuese capaz de fusionarse con la membrana plasmática del oocito.

Siendo entonces capacitación y RA eventos importantes para el proceso de fertilización, y que además involucran principalmente estructuras de membrana del espermatozoide, en este artículo trataremos de dar una visión acerca de las reacciones

bioquímicas a nivel de membranas que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación y/o la RA, y que llevarían principalmente a: estimulación de reacciones de transmetilación de fosfolípidos, activación de enzimas relacionadas como Fosfolipasas de tipo A₂, y la posible función de los productos de la acción de dicha enzima (lisofosfolípidos y ácidos grasos); trabajos en los cuales hemos estado involucrados en los últimos 5 años. Finalmente, se tratará de resumir e integrar la función de otras enzimas hidrolíticas contenidas en la estructura acrosomal y que podrían estar participando en alguno de los eventos asociados a la RA en espermatozoide de mamíferos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Nuestros estudios han sido llevados a cabo fundamentalmente en un sistema químicamente definido de inducción de capacitación y RA en espermatozoide de hamster dorado, que entraremos a detallar brevemente.

Preparación de los espermatozoides para la incubación

Espermatozoides extraídos de la región caudal del epidídimo de hamsters, mantenidos al menos durante 1 mes con un ciclo 14 h luz: 10 h oscuridad, fueron lavados en buffer fosfato salino-sacarosa (PBS-sacarosa) pH 7,3 y enseguida pasados a través de una columna de perlas de vidrio con el objeto de obtener una fracción enriquecida de espermatozoides viables (80-90% de motilidad); todos los procedimientos se llevaron a cabo exactamente tal como se ha descrito previamente (Meizel *et al.*, 1980; Llanos y Meizel, 1983).

Incubación de los espermatozoides (Condiciones generales básicas)

Los espermatozoides obtenidos de la columna de perlas de vidrio fueron incubados en volúmenes de 0,1 ó 2 ml (en tubo eppendorf cónico de 1,5 ml, o en tubo de polipropileno de fondo redondo de 38 ml

de capacidad, respectivamente). La incubación se llevó a cabo a 37°C en atmósfera húmeda de 5% CO₂/95% aire. Cada suspensión de espermatozoides de 100 µl contenía: 20 µl de albúmina de bovino purificada por precipitación con ácido tricloroacético y resolubilización con etanol (TCA-BSA, 60 mg/ml en PBS pH 7,3), 5 µl de hipotaurina o taurina (10 mM en PBS), 5 µl de (-) epinefrina (1,4 mM en PBS), 70-X µl de buffer Tyrode pH 7,3 adicionado de TCA-BSA, lactato, piruvato y glucosa, y X µl de suspensión de espermatozoides para proporcionar una concentración final de 2,25-2,50 x 10⁶ células/ml (Llanos *et al.*, 1982).

Procedimientos experimentales específicos

Para todos los procedimientos utilizados en experimentos específicos tendientes a demostrar participación y activación de fosfolipasa A₂ durante la RA, activación de la trayectoria de metilación de fosfolípidos durante el proceso de capacitación *in vitro* y la función de los lisofosfolípidos agregados exógenamente como inductores rápidos de la RA, el autor se referirá a las siguientes publicaciones: Llanos *et al.*, 1982; Llanos y Meizel, 1983; Dravland *et al.*, 1984; Riffo y Llanos, 1985.

Evaluación de motilidad, hiperactivación y reacciones acrosómicas de los espermatozoides

El porcentaje de espermatozoides reaccionados fue determinado al contar al menos 100 de dichos espermatozoides con motilidad vigorosa, utilizando microscopía de fase contrastada a una magnificación de 400x. El porcentaje de espermatozoides con motilidad fue en algunos casos determinado de la misma forma y en otros casos fue determinado en forma subjetiva bajo campo oscuro a una magnificación de 125x. La hiperactivación fue siempre determinada en forma subjetiva.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inhibidores de reacciones de transmetilación. Efecto sobre capacitación y/o RA "in vitro"

La vía de metilación de fosfolípidos consiste en la formación de fosfatidilcolina (FC) a partir de fosfatidiletanolamina (FE) a través de sucesivas reacciones de metilación que utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como el agente donante de grupos metilo; los intermediarios de esta trayectoria bioquímica son la fosfatidil-N-monometil-etanolamina (FNE) y la fosfatidil-N-N-dimetiletanolamina (FNNE) y las enzimas que catalizan estas reacciones son las Fosfolípido metiltransferasas I y II (FMT I y II; Fig. 2). Se ha considerado que estas reacciones a nivel de la membrana plasmática de una gran variedad de células podrían estar jugando un papel fisiológico en eventos mediados por receptores de membrana, específicamente en la transducción de señales externas en la forma de hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, anticuerpos, drogas, etc. (Hirata y Axelrod, 1980; Mato y Alemany, 1983). Aun cuando la relación exacta entre activación celular y metilación de fosfolípidos no está resuelta aún, se ha postulado que este proceso podría estar activando el sistema de la adenilciclasa (Hirata y Axelrod, 1980; Llanos *et al.*, 1985), y

también a eventos celulares que incluyen fusión de membranas como es el caso de la secreción de histamina por parte del mastocito (Hirata y Axelrod, 1980).

Teniendo en cuenta entonces que tanto la capacitación como la RA parecen ser eventos mediados por receptores de membrana relacionados a aminas biógenas (Cornett y Meizel, 1978; Leibfried y Bavister, 1982) y conociendo la existencia de las enzimas específicas para la transmetilación de proteínas y fosfolípidos en la célula espermática (Bouchard *et al.*, 1980; Janson y Sastry, 1981), nuestra primera aproximación experimental fue el adicionar al medio inductor de capacitación y RA, drogas inhibitoras de las reacciones de transmetilación dependientes de SAM, tales como la 3-Deazaadenosina (3-DZA) y Homocisteína tiolactona (Hci) (Chiang *et al.*, 1980). Al hacer un estudio en el tiempo de las RA bajo dichas condiciones, se observó un efecto inhibitorio de 3-DZA y Hci (o una combinación de ambas) de aproximadamente un 50% sobre las RA sin modificar la viabilidad celular. Dichos resultados fueron los primeros en demostrar que inhibidores de transmetilaciones inhibían la

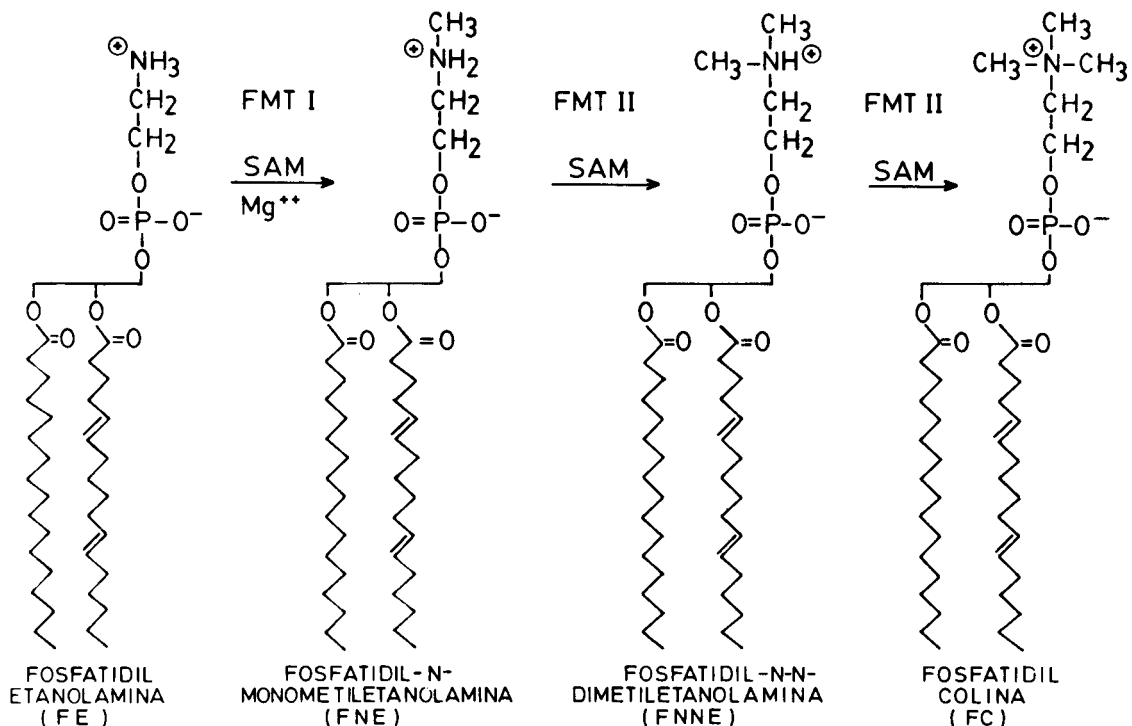


Fig. 2: Conversión enzimática de fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina. Abreviaturas: FMT I, fosfolípido metiltransferasa I; FMT II, fosfolípido metiltransferasa II; SAM, S-adenosilmetionina.

RA y por consiguiente se requería de estudios bioquímicos más detallados, no sólo para clarificar qué tipo de transmetilación está involucrado, sino también determinar su implicancia en los eventos de membrana de la RA misma, en los eventos anteriores relacionados con la capacitación del espermatozoide o ambos (Meizel, 1981).

Reacciones de transmetilación de fosfolípidos durante la capacitación "in vitro"

Bajo el contexto citado anteriormente nuestros esfuerzos estuvieron dirigidos a tratar de establecer una relación entre las reacciones de transmetilación de fosfolípidos a nivel de espermatozoide y los procesos de capacitación y/o RA *in vitro* (Llanos y Meizel, 1983). Con este propósito los espermatozoides de hamster, obtenidos como ya se ha descrito, fueron incubados en un medio inductor de capacitación y RA al que le fue adicionado ^3H -metil-metionina para obtener su metabolización intracelular a ^3H -SAM (el dador de grupos metilo). Luego de 0,5, 1,5, 2,5 y 3,5 h de incubación, los espermatozoides fueron separados y tratados con una mezcla de cloroformo-metanol-HCl 2 N para la extracción de fosfolípidos totales. Los resultados revelaron que el grupo ^3H -metilo fue incorporado a la fracción lipídica obtenida, con una máxima incorporación a las 3,5 h de incubación, y un marcado incremento (más del 50% del total) entre las 2,5 y 3,5 h de incubación. La captación de metionina radioactiva por parte de los espermatozoides alcanzó su punto máximo a las 1,5 h de incubación, sin variar a tiempos más prolongados. A las 3,5 h de incubación, aproximadamente el 10% de los espermatozoides presentaba RA, las cuales eran aumentadas a un 56% luego de 10 min de la adición del fusógeno lisofosfatidilcolina (LFC), hecho por el cual consideramos ese porcentaje de espermatozoides totalmente capacitados de acuerdo a la definición operacional ya antes citada; es importante también señalar que a las 2,5 h de incubación LFC fue incapaz de inducir RA. Otros experimentos en los cuales se incluyó Hci y 3-DZA en el medio de incubación, la

incorporación de grupos ^3H -metilo a la fracción lipídica fue inhibida en aproximadamente 90%; además, en este sistema, dichos agentes causaron una inhibición de las RA inducidas por LFC de más o menos un 60%. Cuando los fosfolípidos ^3H -metilados fueron separados por cromatografía en placa fina, se observó la presencia de FNE y FNNE en mayor proporción, y una proporción menor de FC; además un lípido no identificado presentaba una marcación isotópica bastante elevada. Hemos sugerido que este lípido podría tratarse de un plasmalógeno de FNE, ya que otros lípidos que se utilizaron como estándar en la identificación de dicho lípido, como plasmalógeno de colina y esteres metílicos de ácidos grasos presentaban valores de Rf bastante diferentes. Aunque el porcentaje de marcación del lípido desconocido es bastante alto (un 38% del total) no es posible por el momento especular acerca de su función.

Se puede sugerir varias maneras por las cuales las reacciones de transmetilación de fosfolípidos podrían ser importantes en los eventos de membrana de la capacitación y RA. Es sabido por ejemplo que FNE aumenta la fluidez de la membrana del eritrocito (Hirata y Axelrod, 1980). En nuestro caso la presencia de FNE en el espermatozoide de hamster, y por consiguiente el aumento de fluidez a nivel de las membranas parecen ser importantes en la capacitación y/o la RA, como ha sido sugerido anteriormente por Friend (1982); por otro lado, (Hirata y Axelrod, 1980) se ha sugerido que la metilación de fosfolípidos podría facilitar la entrada de Ca^{++} al interior de las células y es sabido que el Ca^{++} es indispensable para la RA (Yanagimachi y Usui, 1974). Además, debemos hacer notar que las reacciones de transmetilación de fosfolípidos facilitan la translocación de dichos fosfolípidos (*flip-flop*) lo cual causa una perturbación a nivel de la membrana plasmática que eventualmente podría facilitar los eventos de fusión asociados a la RA.

Dado que la incorporación de grupos ^3H -metilo fueron distribuidos en una alta proporción en FNE y FNNE (54,6% del total incorporado), los precursores de FC, se debe tomar en cuenta que dicha incorpo-

ración corresponde a 3,5 h de incubación, tiempo en el cual recién los espermatozoides comienzan a experimentar la RA; por consiguiente es posible pensar que FC se acumula durante los eventos tempranos de la RA sirviendo como sustrato para fosfolipasa(s) A_2 (Llanos *et al.*, 1982) cuyo producto de su actividad, una LFC endógena, actúa en los eventos de fusión en varios sitios de la membrana plasmática, promoviendo así la posterior fenestración y por ende finalmente la culminación de la RA. Un mecanismo similar ha sido planteado por Hirata y Axelrod (1980) para la exocitosis de gránulos secretorios en mastocitos.

Finalmente, debemos hacer notar que tanto 3-DZA como Hci también son capaces de inhibir carboximetilación de proteínas (Tezón, 1983) y que los sustratos y enzimas para la carboximetilación de proteínas se han encontrado en la cola del espermatozoide de rata (Bouchard *et al.*, 1980). Adicionalmente, Tezón (1983) observó que el proceso de carboximetilación de proteínas aumentaba prácticamente al doble en los espermatozoides de hamster con motilidad durante la capacitación, sugiriendo que carboximetilación de proteínas estaría asociada al mecanismo por el cual se produce la hiperactivación de la motilidad, probablemente inducida por catecolaminas, lo cual proveería de un parámetro bioquímico apropiado para el estudio de uno de los eventos del proceso de capacitación. Indudablemente que se necesitan mayores estudios para poder plantear una función específica de metilación de fosfolípidos y proteínas durante el proceso de capacitación y RA.

Actividad de fosfolipasas y su relación con la reacción acrosómica

Hace bastante tiempo que se ha hipotetizado que tanto la actividad de fosfolipasa A como los productos de su actividad, los lisofosfolípidos, podrían estar implicados en eventos celulares exocitóticos (Bach, 1974). Debido a esto Lucy (1975) sugirió la posible participación de fosfolipasa A en la reacción de acrosoma del espermatozoide

de mamífero. Anteriormente Allison y Hartree (1970) habían reportado la presencia de fosfolipasa A en extractos acrosomales de espermatozoides de carnero. Ultimamente, actividad de Fosfolipasa A_2 (definida así por presentar inhibición característica por bromuro de p-bromofenacilo) (Volwerk *et al.*, 1974) se ha encontrado asociada a material soluble y vesículas una vez que el espermatozoide de hamster ha desarrollado la RA (Llanos *et al.*, 1982). De esa forma parece no haber duda de la existencia de fosfolipasa A_2 en las estructuras asociadas a la cabeza del espermatozoide (Fig. 3).

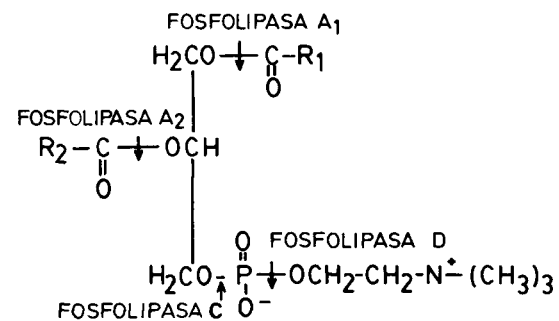


Fig. 3: Acción de diferentes tipos de fosfolipasas en diferentes sitios de la fosfatidilcolina.

Evidencias que sugieren función de fosfolipasa A₂ (FLA₂) en la reacción acrosómica

En 1979, Lui y Meizel observaron que tanto en un sistema sincrónico como asincrónico de inducción de RA, dos inhibidores de fosfolipasa A_2 : mepacrina y bromuro de p-bromofenacilo, eran agentes capaces de bloquear la reacción acrosómica *in vitro*. Similares resultados fueron obtenidos por Ono *et al.*, (1982) cuando adicionaron dichos inhibidores a un sistema *in vitro* inductor de capacitación y RA en espermatozoide de cobayo; sin embargo, en estos estudios se utilizó albúmina no purificada, que contiene actividad de fosfolipasa A_2 como contaminante (Elsbach y Pettis, 1973), siendo esta enzima exógena la que pudo inducir RA, tal como ha sido sugerido por Singleton y Killian (1983); de esta forma los resultados obtenidos con los inhibidores se pueden haber debido, al menos en parte, a una inhibición de la

enzima exógena. Posteriormente Llanos *et al.*, (1982) demostraron que la actividad de fosfolipasa A_2 es liberada al medio de incubación como resultado de la RA de espermatozoide de hamster. En dichos trabajos se utilizaron dos sistemas inductores de RA, uno asincrónico con epinefrina y otro sincrónico, en que las RA fueron inducidas con el ionóforo de protones FCCP (carbonil-cianuro p-trifluorometroxifenilhidrazona). Luego de que un alto porcentaje de espermatozoides experimentara la RA, los sobrenadantes con medio de incubación y productos de la RA fueron parcialmente purificados, encontrándose finalmente una actividad aumentada de FLA $_2$. La caracterización preliminar de la enzima reveló actividad a pH 7,4-7,8, pero no a pH 4,5, estimulable por iones Ca^{++} , e inhibible por mepacrina y bromuro de p-bromofenacilo. Las características de dicha enzima corresponden a FLA $_2$ asociadas a membranas de una variedad de células somáticas (Brockerhoff y Jensen, 1974). A este respecto es importante puntualizar que Thakkar y Franson (1984) demostraron la existencia de FLA $_2$ asociada a alguna de las membranas del espermatozoide humano, siendo sus características de pH, activación e inhibición semejante a las ya reportadas por nosotros (Llanos *et al.*, 1982) para el caso del espermatozoide de hamster.

Singleton y Killian (1981) reportaron las primeras evidencias sugiriendo que una FLA $_2$ comercial (de páncreas porcino) era capaz de estimular las RA de espermatozoide de cobayo *in vitro*. Estos autores también sugirieron que FLA $_2$ asociada a BSA podría "imitar la acción de la FLA $_2$ del espermatozoide". Posteriormente, (Llanos *et al.*, 1982) se demostró que una FLA $_2$ comercial (de veneno de abeja) era capaz de estimular la RA de espermatozoides de hamster en ausencia de epinefrina en el medio de incubación; sin embargo esta enzima no tenía ningún efecto en presencia de epinefrina.

Estos resultados se pueden interpretar al considerar que la FLA $_2$ exógena puede estimular RA bajo condiciones sub-óptimas de capacitación (ausencia de epinefrina), es decir, cuando la actividad de la FLA $_2$ endógena no es máxima; sin embargo, en

presencia de epinefrina se produce una capacitación total, siendo la FLA $_2$ endógena estimulada lo suficiente como para eliminar totalmente la necesidad de una enzima exógena.

Desde otro punto de vista, se ha planteado que la actividad de FLA $_2$ no estaría involucrada en RA, sino sería una consecuencia de la RA, más bien que un requisito para ella, y que su función estaría relacionada con fusión espermatozoide-oocito (Conway y Metz, 1976). Sin embargo, Yanagimachi (1981) y Dravland y Meizel (1982) han demostrado que los inhibidores de FLA $_2$ no inhiben fusión espermatozoide-oocito. De suerte que parece ser que la función de la FLA $_2$ de espermatozoide de mamífero está asociada a los eventos de la RA más bien que a la fusión de gametos.

Efecto de los productos de la actividad de FLA $_2$ sobre la RA

En el espermatozoide existe una gran variedad de fosfolípidos que podrían servir como sustratos para la acción de FLA $_2$, produciendo una sustancia de características fusógenas como son los lisofosfolípidos (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Utilizando espermatozoides de cobayo, Fleming y Yanagimachi (1981) demostraron que la lisofosfatidilcolina (LFC) y lisofosfatidiletanolamina (LFE) podían estimular RA fisiológicas cuando eran adicionadas al medio de incubación en concentraciones apropiadas. Ozhu y Yanagimachi (1982) y Llanos y Meizel (1983) demostraron que LFC exógena puede estimular RA en espermatozoides de hamster que ya han sido preincubados por un cierto período; es decir, podemos aventurarnos a decir que LFC ejerce su efecto sólo sobre espermatozoides "capacitados". Dado que la inducción de RA por LFC exógena es realmente rápida (0,5-1 min) se puede sugerir que la producción de un lisofosfolípido (LFL) endógeno (muy probablemente LFC) por acción de FLA $_2$ del espermatozoide es una de las etapas finales de los eventos bioquímicos de la RA. Específicamente, dicho LFL endógeno actuaría promoviendo "perturbación" o "desestabilización" de la membrana donde es produ-

cido, jugando un papel vital en los eventos de fusión de las membranas comprometidas en la RA. La adición de LFC exógena, utilizada para inducir sincrónicamente RA en un alto porcentaje de espermatozoides capacitados, estaría entonces de algún modo "imitando" la acción de algún LFL endógeno. Aun cuando estamos conscientes de que la acción de LFC exógena podría estar sobrepasando algunas de las últimas etapas del proceso de capacitación (o bien alguno de los eventos de la RA), creemos que ésta no invalida la posibilidad que este método pueda ser utilizado como un agente de diagnóstico o "marcador" de la capacitación en espermatozoides de mamífero, como ya se ha sugerido (Llanos y Meizel, 1983; Riffo y Llanos, 1985). El hecho de que los espermatozoides sean capaces de responder a la acción de LFC exógena sólo después de un período de incubación determinado (1-3 h según condiciones de incubación), sugiere que las membranas asociadas a la cabeza del espermatozoide (membrana plasmática y probablemente acrosomal externa) son gradualmente modificadas en su composición durante la incubación; existe también una segunda probabilidad relacionada con sustancias que estarían recubriendo la superficie del espermatozoide, que al ser también gradualmente removidas durante la incubación permitirían la acción funcional de LFC; finalmente, tampoco se puede descartar una combinación de ambos fenómenos. En relación a la capacidad fertilizante del espermatozoide inducido a reaccionar con LFC, Ohzu y Yanagimachi (1982) demostraron que dichos espermatozoides eran capaces de fertilizar un 86% de los oocitos con zona pelúcida luego de una hora de coincubación; bajo esas condiciones ninguno de los oocitos inseminados con espermatozoides no tratados con LFC fue fertilizado.

No debemos olvidar finalmente que otro de los productos de la acción de FLA₂ son los ácidos grasos; en relación a este punto, Creutz (1981) ha demostrado que ácidos grasos cis-no saturados (cis-AG) favorecen la agregación de gránulos de cromafín aislados. Posteriormente se demostró (Meizel y Turner, 1983) que los ácidos cis-oleico,

cis-vaccénico y araquidónico estimulaban la RA de espermatozoide de hamster *in vitro* 15 min después de su adición al medio. Es probable entonces que los cis-AG y LFC tengan funciones diferentes en los eventos de membrana de la RA. Karnovsky *et al.* (1982) sugiere que los cis-AG podrían perturbar membranas a través de cambios en "fluidificación local" (a nivel de un "microdominio"); de suerte que, si los cis-AG son liberados por acción de FLA₂, ellos debieran estimular la RA por cambios en la fluidez de las membranas involucradas en dicho evento excitotico. Es probable también que los resultados con ácido araquidónico se deban a metabolización de este compuesto a prostaglandinas como PGE₂; a este respecto Nuzzo *et al.*, (1983) han reportado evidencias sugiriendo que 'PGE' estimula la RA de espermatozoide de cobayo. Quizás los metabolitos del ácido araquidónico del espermatozoide y/o los secretados por el tracto reproductivo femenino tienen una función en la RA *in vivo*; a este punto hay que agregar que el cúmulo oóforo —un sitio putativo de iniciación de la RA *in vitro*— secreta PGE₂ (Schuetz y Dubin, 1981).

Posible función de otro tipo de fosfolipasas en capacitación y RA

Trabajos de Srivastava *et al.* (1982) han demostrado la presencia de fosfolipasa C a nivel de las membranas asociadas a la cabeza del espermatozoide de mamífero (Fig. 3), lo cual hizo sugerir a los autores que dicha enzima podría estar implicada en alguno de los eventos de la RA; se ha sugerido que fosfolipasa C (Mitchell, 1982) podría generar como un producto indirecto, una alta concentración de ácido fosfatídico que ha sido considerado como un ionóforo de Ca⁺⁺, y puesto que el Ca⁺⁺ exógeno es esencial para la RA, entonces el influjo de Ca⁺⁺ podría ser explicado a través de dicho mecanismo.

Un terreno fértil de investigación futura en este campo podría incluir el intento de establecer una relación entre Fosfolipasa C, Fosfatidilinositol (FI), fosfatidilinositol-monofosfato (FI 4P) y fosfatidilinositol-difosfato (FI 4,5 P₂); y esto debido a que

se ha planteado que los productos de la acción de fosfolipasa C sobre FI 4,5 P₂; es decir, diacilglicerol (DG) e inositoltrifosfato (IP₃) jugarían papeles cruciales en la funcionalidad de una variedad de células somáticas estimuladas por ciertos agonistas (Berridge, 1984).

En el caso específico del espermatozoide, si bien se ha considerado que Ca⁺⁺ exógeno no es esencial para la capacitación, no se puede descartar una movilización de Ca⁺⁺ intracelular desde compartimientos "almacenadores" de Ca⁺⁺ a otros sitios donde podría estimular reacciones bioquímicas propias del proceso de capacitación; a este respecto se ha considerado que el IP₃ juega un papel importantísimo en la movilización de Ca⁺⁺ intracelular (Berridge, 1984). Por otro lado, durante la capacitación se ha postulado la aparición de proteínas fosforiladas, sin embargo, la proteína quinasa responsable de estas fosforilaciones no ha sido bien establecida (dependiente o no de cAMP) (Garbers y Kopf, 1980). A este respecto, el diacilglicerol (el otro producto de la fosfolipasa C) juega un papel fundamental en la activación de la nueva proteína quinasa C (Berridge, 1984). De modo que investigaciones futuras en relación a fosfolipasa C, IP₃, DG y proteína quinasa C como factores reguladores de la funcionalidad del espermatozoide, podrían dar nuevas expectativas para el conocimiento global de las bases moleculares de la capacitación y/o la RA.

Posible función de otras enzimas hidrolíticas acrosomales en la RA

Dado que existen numerosos tipos de enzimas asociadas a la estructura acrosomal (McRorie y Williams, 1974), se ha sugerido la participación de algunas de ellas en la RA. Específicamente se ha planteado la posible función de: a) enzimas "tipo-tripsina", probablemente acrosina (activación de otras enzimas hidrolíticas, o hidrólisis de proteínas de membrana lo que facilitaría fusión). b) Mg⁺⁺-ATPasa (regulación del pH intra-acrosomal). c) Na⁺-K⁺-ATPasa (influjo de K⁺, importante en capacitación y RA). d) ATPasa transportadora de Ca⁺⁺ (influjo de Ca⁺⁺, fundamental para RA).

Para obtener un conocimiento más detallado acerca de la información planteada, el lector podrá consultar las excelentes revisiones de McRorie y Williams (1974), Meizel (1978, 1984) y Yanagimachi (1981).

INTEGRACION Y CONCLUSIONES FINALES

Diversos autores han planteado su propio mecanismo molecular para explicar los eventos de la RA, los cuales han sido interpretados bastante fielmente por Yanagimachi (1981).

En base a lo que se ha planteado, se sugiere acá un mecanismo molecular para la explicación de la RA, que no está exento de mucha especulación e imaginación, pero que sin embargo se basa en la interpretación de evidencias experimentales publicadas durante los últimos años. Para poder establecer el modelo de RA que se plantea de acuerdo a lo ya descrito, se asumirá como puntos básicos los siguientes.

1. Las reacciones de transmetilación de fosfolípidos estimuladas por señales externas ocurren preferentemente a nivel de la membrana plasmática (con acumulación de FC en la monocapa externa) (Hirata y Axelrod, 1980; Mato y Alemany, 1983).
2. Las características de la actividad de FLA₂ asociada a la cabeza del espermatozoide hace suponer que dicha enzima está asociada a membranas (Llanos *et al.*, 1982; Thakkar y Franson, 1984; Brockerhoff y Jensen, 1974).
3. Participación del sistema proacrosina-acrosina (o alguna otra enzima "tipo tripsina") en los eventos de membrana de la RA (Dravland *et al.*, 1984), cuya ubicación sería la matriz acrosomal (Green y Hockaday, 1978).

El mecanismo hipotético que se plantea para la RA, y que está basado fundamentalmente en estudios realizados en espermatozoides de hamster, es el siguiente (ver Fig. 4).

Durante la capacitación las reacciones de transmetilación de fosfolípidos a nivel de la membrana plasmática sobre el acrosoma serían inducidas por epinefrina; estas re-

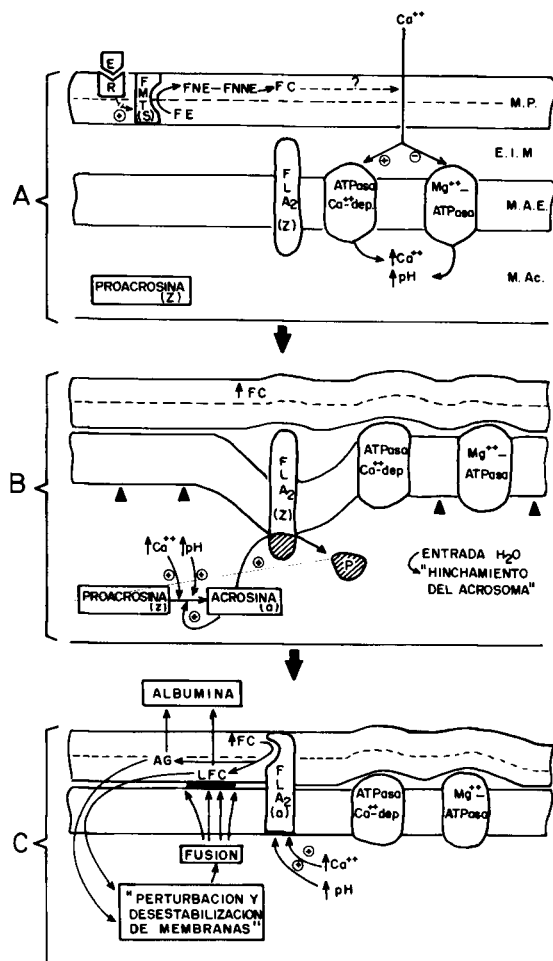


Fig. 4: Diagrama del modelo planteado para el mecanismo de la RA (ver detalles en el texto de la sección integración y conclusiones finales). Abreviaturas y signos: E, epinefrina; R, receptor; FMT(s); fosfolípido metil transferasas; FE, fosfatidiletanolamina; FNE, fosfatidil-N-monometiltanolamina; FNNE, fosfatidil-N-N-dimetiletanolamina; FC, fosfatidilcolina; M.P., membrana plasmática; E.I.M., espacio intermembranas; M.A.E., membrana acrosomal externa; M.Ac., matriz acrosomal; FLA₂(z); fosfolípasa A₂ zimógeno; FLA₂(a); fosfolípasa A₂ activa; p, péptido; LFC, lisofosfatidilcolina; AG, ácido graso; + efecto estimulador, - efecto inhibitorio; ↑, aumento de; A → B → C, eventos irreversibles.

acciones producirían un aumento de fluidez de la membrana plasmática y acumulación de FC (el sustrato para FLA₂) en la cara externa de dicha membrana. Probablemente a través de este mecanismo o algún otro, el Ca⁺⁺ externo fluiría (posiblemente por apertura de algún canal de Ca⁺⁺) al espacio entre la membrana plasmática y la acrosomal externa. El influjo de Ca⁺⁺ podría actuar inhibiendo una Mg⁺⁺-ATPasa (bomba de H⁺) y activando un ATPasa dependiente de Ca⁺⁺, (ambas localizadas en

la membrana acrosomal externa) lo que se traduciría en un aumento de K⁺ y agua al interior del acrosoma. El hinchamiento del acrosoma favorecería la sobreposición de las membranas plasmática y acrosomal externa; al mismo tiempo, el aumento de Ca⁺⁺ y pH intraacrosomal produciría la activación de proacrosina a acrosina (o alguna otra enzima "tipo tripsina") a nivel de la matriz acrosomal; acrosina activaría por proteólisis una FLA₂ (al estado de Zimógeno, asociada a la membrana acrosomal externa), dicha FLA₂ al perder un péptido sufriría un cambio conformacional que no sólo favorecería su actividad, sino también cambiaría sus características lipofílicas, pudiendo "insertarse" hasta la parte externa de la membrana plasmática donde existiría gran cantidad de sustrato FC (producido anteriormente por metilaciones), la acción de FLA₂ produciría el fusógeno lisofosfatidilcolina y probablemente ácidos grasos cis-no saturados que inducirían fusión de las membranas ya sobrepuestas. La albúmina, que puede ligar LFC y ácidos grasos, podría estar regulando las cantidades de dichas sustancias a una concentración óptima para causar fusión, sin inhibir otras moléculas de FLA₂ por exceso de producto. Una vez producidas las fusiones en diferentes sitios del área acrosomal, la vesiculación (fenestración) sería un proceso favorecido termodinámicamente que se desarrollaría en forma espontánea.

Finalmente, aunque no se descarta la formación de fusógeno a nivel de la membrana acrosomal externa ni la posible presencia de FLA₂ a nivel de la membrana plasmática, la preferencia por la hipótesis ya generada permite plantear una secuencia vectorial de lo que podría ser un interesante proceso de regulación concertada para producir en forma más sincrónica los irreversibles eventos de la RA en espermatozoide de mamífero.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Sra. Felicitas Rodríguez por su paciencia y excelente trabajo de secretaría, al Sr. Ricardo Guerra por sus ilustraciones y a los Dres. Ana M. Pino y Luis E. Valladares por su ayuda y estimulantes discusiones

acerca del mecanismo de la RA. Se agradece también muy sinceramente al Dr. Claudio Barros, por la gentil donación del material biológico utilizado en algunos de los experimentos acá citados.

Algunos de los trabajos del autor citados en este texto fueron financiados por Grant N° 83010 de la Organización Mundial de la Salud y Proyecto B-2015-8522 DIB. Universidad en Chile.

REFERENCIAS

- ALLISON, A.C. y HARTREE, E.F. (1970) Lysosomal enzymes in the acrosome and the possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 21: 501-515.
- AUSTIN, C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. Ser.* 34: 581-596.
- AUSTIN, C.R. (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature (London)* 162, 63.
- BACH, M.K. (1974) A molecular theory to explain the mechanisms of allergic histamine release. *J. Theor. Biol.* 45: 131-151.
- BARROS, C., BEDFORD, J.M., FRANKLIN, L.E. y AUSTIN, C.R. (1967) Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 34: C1-C5.
- BARROS, C. (1974) Capacitation of mammalian spermatozoa, in *Physiology and Genetics of Reproduction, Part B* (E.M. Coutinho and F. Fuchs, Eds.). Plenum Press, New York, pp. 3-24.
- BEDFORD, J.M. (1970) Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.* 2: 128-158.
- BEDFORD, J.M. (1983) Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in Eutherian Mammals. *Biol. Reprod.* 28: 108-120.
- BERRIDGE, M.J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- BOUCHARD, P., GAGNON, C., PHILLIPS, D.M. y BARDIN, C.W. (1980) The localization of protein carboxyl-methylase in sperm tails. *J. Cell. Biol.* 86: 417-423.
- BROCKERHOFF, H.Y. JENSEN, R.G. (1974) Lipolytic enzymes. Academic Press, Inc. U.S.A.
- CHANG, M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature (London)* 168: 697-698.
- CHIANG, P.K., IM Y.S. y CANTONI G.L. (1980) Phospholipid biosynthesis by methylations and choline incorporation. Effect of 3-Deazaadenosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 174-181.
- CONWAY, A.F., METZ, C. (1976) Phospholipase activity of sea urchin sperm: its possible involvement in membrane fusion. *J. Exp. Zool.* 198: 39-48.
- CORNETT, L.E. y MEIZEL, S. (1978) Stimulation of *in vitro* capacitation and the acrosome reaction of hamster spermatozoa by catecholamines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4954-4958.
- CREUTZ, C.E. (1981) Cis-unsaturated fatty acids induce the fusion of chromaffin granules aggregated by synexin. *J. Cell. Biol.* 91: 247-256.
- DRAVLAND, J.E. y MEIZEL, S. (1982) The effect of inhibitors of trypsin and phospholipase A₂ on the penetration of zona pellucida-free hamster egg by acrosome-reacted hamster sperm. *J. Androl.* 3: 388-395.
- DRAVLAND, J.E., LLANOS, M.N., MUNN, R.J. y MEIZEL, S. (1984) Evidence for the involvement of a sperm trypsinlike enzyme in the membrane events of the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 232: 117-128.
- ELSBACH, P. y PETTIS, P. (1973) Phospholipase activity associated with serum albumin. *Biochim., Biophys. Acta* 269: 89-93.
- FLEMING, A.D., y YANAGIMACHI, R. (1981) Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.* 4: 253-273.
- FRIEND, D.S. (1977) The organization of the spermatozoal membrane, in: *Immunobiology of Gametes* (M. Edidin y M.H. Johnson, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 5-30.
- GARBERS, D.L. y KOPF, G.S. (1980) The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides, in: *Advances in cyclic Nucleotide Research.*, Vo. 13 (P. Greengard y A. Robinson, Eds.). Raven Press, New York, pp. 251-306.
- GREEN, D.P.L. y HOCKADAY, A.R. (1978) The histochemical localization of acrosin in guinea pig sperm after the acrosome reaction. *J. Cell. Sci.* 32: 177-184.
- HARTREE, E.F. (1975) The acrosome-lysosome relationship. *J. Reprod. Fert.* 44: 125-126.
- HIRATA, F. y AXELROD, J. (1980) Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 209: 1082-1090.
- JANSON, V.E. y SASTRY, B.V.R. (1981) The role of S-adenosyl-methionine mediated methylation in human sperm motility. *Fed. Proc.* 40: 717. Abstr. 2782.
- KARNOWSKY, M.J.; KLEINFELD, A.M.; HOOVER, R.L. y KLAUSNER, R.D. (1982) The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell. Biol.* 94: 1-6.
- KATZ, D.F. y OVERSTREET, J.W. (1980) Mammalian sperm Movement in the secretions of the male and female genital tracts, in: *Testicular development, structure and function* (A. Steinberger y E. Steinberger; Eds.). Raven Press, New York, pp. 481-489.
- KATZ, D.F. y YANAGIMACHI, R. (1980) Movements characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol. Reprod.* 22: 759-764.
- LEIBFREID, M.L. y BAVISTER, B.D. (1982) Effect of eepinephrine and hypotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. *J. Reprod. Fert.* 66: 87-93.
- LLANOS, M.N., LUI, C.W. y MEIZEL, S. (1982) Studies of phospholipase A₂ related to the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 221: 107-117.
- LLANOS, M.N. y MEIZEL, S. (1983) Phospholipid methylation increases during capacitation of golden hamster sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.* 28: 1043-1051.
- LLANOS, M.N., RONCO, A.M., PINO, A.M. y VALLADARES, L.E. (1985) The transmethylation inhibitor 3-Deazaadenosine, inhibits *in vitro* testosterone production by rat testis interstitial cells stimulated with hCG. *J. Steroid Biochem* 23: 73-76.
- LUCY, J.A. (1975) Aspects of the fusion of cells *in vitro* without viruses. *J. Reprod. Fert.* 44: 193-205.
- LUI, C.W., MEIZEL, S. (1979) Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 207: 173-185.

36. MANN, T. y LUTWAK-MANN, C. (1981) Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
37. MATO, J.M. y ALEMANY, S. (1983) What is the function of phospholipid N-methylation? *Biochem. J.* 213: 1-10.
38. McRORIE, R.A. y WILLIAMS W.L. (1974) Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 777-803.
39. MEIZEL, S. (1978) The mammalian sperm acrosome reaction: A biochemical approach, in: Development in Mammals, Vol. 3 (M.H. Johnson, Ed.). North-Holland, Amsterdam, pp. 1-62.
40. MEIZEL, S., LUI, C.W., WORKING, P.K. y MRSNY, R.J. (1980) Taurine and hypotaurine: Their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro*, and their presence in sperm and reproductive tracts fluids of several mammals. *Dev. Growth Differ.* 22: 483-494.
41. MEIZEL, S. (1981) Inhibition of the hamster sperm acrosome reaction by transmethylating inhibitors. *J. Exp. Zool.* 217: 443-446.
42. MEIZEL, S. y TURNER, K.O. (1983) Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acid. *FEBS Lett.*, 161: 315-318.
43. MEIZEL, S. (1984) The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. *Biol. Rev.* 59: 125-157.
44. MITCHELL, R.H. (1982) Is phosphatidylinositol really out of the calcium gate? *Nature (London)* 296: 492-493.
45. NUZZO, N.A., JOYCE, C. y ZANEVELD, L.D.D. (1983) Role of prostaglandins in the acrosome reaction and fertilization. *Biol. Reprod.* 28, Suppl. 1: 38.
46. OHZU, E. y YANAGIMACHI, R. (1982) Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. *J. Exp. Zool.* 224: 259-263.
47. ONO, K., YANAGIMACHI, R. y HUANG, T.T.F., Jr. (1982) Phospholipase A of guinea pig spermatozoa: its preliminary characterization and possible involvement in the acrosome reaction. *Dev. Growth Differ.* 24: 305-310.
48. RIFFO, M. y LLANOS, M. (1985) Fosfolipasa Lisofosfolípidos. Participación en la reacción acrosómica de espermatozoide de mamífero. *Jornadas Científicas Depto. Cs. Básicas. Fac. Medicina, División Sur, Universidad de Chile*, abstr. R-5.
49. RUSSEL, L., PETERSON, R. y FREUD, M. (1979) Direct evidence for formation of hybrid vesicles by fusion of plasma and outer acrosomal membranes during the acrosome reaction in boar spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 208: 41-56.
50. SCHUETZ, A.W. y DUBIN, N.H. (1981) Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell-oocyte complex. *Endocrinology* 108: 457-463.
51. SINGLETON, C.L. y KILLIAN, G.J. (1981) Phospholipase A₂ in albumin induces the acrosome reaction *in vitro* of guinea-pig sperm. *The Physiologist* 24: 45 (Abstract).
52. SINGLETON, C.L. y KILLIAN, G.J. (1983) A study of phospholipase in Albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa *in vitro*. *J. Androl.* 4: 150-156.
53. SRIVASTAVA, P.N., BREWER, J.M. y WHITE R.A. (1982) Hydrolysis of p-nitro-phenylphosphorilcoline by alkaline phosphatase and phospholipase C from rabbit sperm-acrosome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108: 1120-1125.
54. TALBOT, P. y FRANKLIN, L.E. (1976) Morphology and kinetics of the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 198: 163-176.
55. TEZON, J.G. (1983) Changes of endogenous carboxylation during *in vitro* capacitation of hamster spermatozoa. *Biol. Reprod.* 28, Suppl. 1: 70 Abstr. 75.
56. THAKKAR, J.K., EAST, J. y FRANSON, R.C. (1984) Modulation of phospholipase A₂ activity associated with human sperm membranes by divalent cations and calcium antagonists. *Biol. Reprod.* 30: 679-686.
57. VOLWERK, J.J., PIETERSON, W.A. y DE HASS G.H. (1974) Histidine at the active site of phospholipase A₂. *Biochemistry* 13: 1446-1454.
58. YANAGIMACHI, R. y USUI, N. (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 89: 161-174.
59. YANAGIMACHI, R. (1977) Specificity of sperm-egg interaction, in: Immunobiology of Gametes (M. Edidin y M.H. Johnson, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 255-295.
60. YANAGIMACHI, R. (1978) Sperm-egg association in mammals, in: Current Topics in Developmental Biology, Vol. 12 (A.D. Moscona y A. Monroy, Eds.) Academic Press, New York, pp. 83-105.
61. YANAGIMACHI, R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals, in: Fertilization and Embryonic Development *in vitro* (L. Mastroianni, Jr. y J.D. Biggers, Eds.). Plenum Press, New York, pp. 82-182.

Nota: Durante el proceso de revisión y publicación de este artículo, otras importantes revisiones acerca del tema fueron publicadas. El autor recomienda los trabajos de Langlais y Roberts (1985; *Gamete Res.* 12: 183-224), Wassarman (1987; *Annu. Rev. Cell Biol.* 3: 109-142) y Yanagimachi (1988; in *Physiology of Reproduction*, Raven Press, pp. 135-185).