

Interacción entre gametos: Cómo lo logra el espermatozoide?

Rosa A Sierra¹ Bact, Marta Olivera-Angel^{1,2} MV.Dr Sci Agr

¹ Grupo Biogénesis - Biotecnología Animal ² Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido: 24 febrero, 2000; aceptado: 8 agosto, 2000)

Resumen

A la interacción entre el espermatozoide y el oocito preceden una serie de eventos en el espermatozoide conocidos como "capacitación", los cuales cambios incluyen hiperactivación de la movilidad, incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y desestabilización de la membrana espermática. Estos cambios le permitirán adquirir la habilidad para contactar la zona pelúcida del oocito, sufrir reacción acrosómica, pasar al espacio perivitelino y llevar a cabo la interacción entre la cabeza espermática y la membrana plasmática del oocito para desencadenar una serie de eventos de señalización llamados "activación del oocito", los cuales le permiten a éste finalizar la meiosis II e iniciar el ciclo mitótico celular. Existen dos hipótesis para explicar la activación del oocito inducida por el espermatozoide: la hipótesis del "receptor", en la cual el espermatozoide fertilizante interactuaría con un receptor de superficie específico en el oocito y permitiría la transducción de señales y su posterior activación. La segunda hipótesis es la "fusión", donde se argumenta que existe un factor citosólico espermático que una vez ocurre la fusión de las membranas del oocito y el espermatozoide, entra al citoplasma del oocito y activa los caminos que le permitirán su activación.

Palabras clave: Activación, capacitación, fertilización, interacción, óvulo, reacción acrosómica.

Introducción

Aunque después de dejar el testículo el espermatozoide en muchas especies de mamíferos es morfológicamente diferenciado, aún no ha adquirido ni la movilidad progresiva ni la habilidad de fertilizar un oocito. Durante su tránsito a través del epidídimo los espermatozoides adquieren la habilidad de moverse progresivamente, aunque sigan siendo incompetentes para llevar a cabo el proceso de fertilización. Es en el tracto reproductivo femenino y por un período finito de tiempo, que el espermatozoide sufre una serie de cambios fisiológicos conocidos como capacitación, que le confieren la habilidad para fertilizar; estos cambios incluyen: desestabilización de la membrana plasmática, modificación y expresión de antígenos de superficie y fosforilación de las tirosinas proteicas.

Dependiendo de la especie, el sitio fisiológico de la capacitación es el útero o el oviducto (37); *in vitro* se consigue al incubar los espermatozoides en medios definidos que simulen la composición del fluido oviductal. En la mayoría de los casos, estos medios contienen sustratos energéticos tales como piruvato, lactato y glucosa (dependiendo de la especie), además de $NaHCO_3$ y Ca^{2+} y como fuente proteica generalmente se usa la albúmina sérica. La acción de estos componentes en el medio es promover la capacitación en el nivel molecular.

Bases moleculares de la capacitación

La capacitación involucra cambios bioquímicos que incluyen la remoción de los componentes adsorbidos de la superficie del esperma, cambio en la composición lipídica e incremento en la fluidez y metabolismo de la membrana. Se produce también hiper-

activación del movimiento flagelar, que se cree es debido a la redistribución de los componentes membranales durante la capacitación.

La observación de que la capacitación puede ocurrir *in vitro* de manera espontánea en un medio definido sin la adición de fluidos biológicos, sugiere que este proceso es intrínsecamente modulado por el espermatozoide, como si éste estuviera pre-programado para sufrir capacitación cuando se encuentra en medios apropiados, o es posible que la regulación de la capacitación ocurra por un mecanismo desinhibitorio de los factores decapacitantes que se encuentran dentro del fluido epididimal, líquido seminal y fluido femenino (1,19) (véase figura 1).

Plasma seminal bovino. El plasma bovino contiene proteínas secretadas por las vesículas seminales, muy relacionadas unas con otras, conocidas como PSB. Estas proteínas (PSB A1/A2, PSB-A3, PSB-30 kDa) se adhieren al espermatozoide durante la eyaculación, a través de los fosfolípidos colina presentes en su membrana, y para ligar la heparina y las apolipoproteínas A-I. Experimentos de Therián y col. 1998 (28) demostraron que las proteínas PSB y las otras proteínas que también se unen al colesterol, tales como las HDL que transfieren los lípidos presentes en el fluido folicular u oviductal, juegan un papel muy importante en la salida del colesterol que ocurre durante la capacitación.

Colesterol. Los espermatozoides recién eyaculados no son capaces de sufrir exocitosis acrosomal porque de alguna manera su membrana se encuentra "congelada" por las altas concentraciones de colesterol. La concentración de colesterol (CHOL) membranar va cambiando a medida que el espermatozoide hace su tránsito por el epidídimo, en algunas especies aumenta y en otras disminuye. Y cuando el espermatozoide es eyaculado la relación colesterol /fosfolípidos (C/F) determina el estado de capacitación del espermatozoide. En el semen recién eyaculado hay una relación C/F alta (0.4-0.8), y durante la capacitación el colesterol se mueve de la membrana plasmática a los aceptores proteicos solubles presentes en el fluido oviductal causando la disminución de la microviscosidad de la membrana, la relajación del empaquetamiento de los fosfolípidos y finalmente permitiendo la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa.

La pérdida de colesterol conlleva a que se produzca la exposición de los receptores de membrana para

la manosa; se sugiere que este receptor inicialmente está localizado bajo la membrana plasmática y que la salida de colesterol ocasiona su movimiento hacia la bicapa de fosfolípidos (10); estos cambios podrían ser los responsables del flujo de los iones Ca^{2+} y HCO_3^- .

El papel de los constituyentes de los medios

Para el estudio de la capacitación se ha utilizado el modelo *in-vitro*, en donde se ha demostrado que a pesar de que no existe un modelo universal, sí hay componentes comunes en los medios que juegan un papel muy importante en la promoción de la capacitación (véase figura 1).

Albúmina sérica. La albúmina sérica presente en los medios de capacitación (ratón, hamster, ganado bovino y humanos) parece actuar de manera similar al plasma seminal como un "excavador" que permite remover el colesterol (CHOL), (10,18), lo cual puede llevar a cambios en la fluidez de la membrana plasmática (34, 35). Algunos experimentos han demostrado que existen otras proteínas que se unen al CHOL, tales como las HDL o proteínas que transfieren los lípidos presentes en el fluido folicular u oviductal, las cuales pueden reemplazar a la albúmina en los ensayos *in vitro* (27). El colesterol presente en el eyaculado humano puede ser necesario para evitar que los componentes del plasma seminal remuevan el colesterol de la membrana en forma temprana.

Calcio (Ca^{2+}). Aunque el papel de este ión en el inicio o regulación de la capacitación es aún controvertido, se sabe que el Ca^{2+} ingresa al espermatozoide como consecuencia de la apertura de los canales dependientes de voltaje, por depolarización de la membrana plasmática.

El Ca^{2+} juega un papel muy importante en la transducción de señales, actuando como enzima efectora a través de la adenilato ciclasa (AC), enzima que regula el metabolismo del AMP_c (30).

Bicarbonato (HCO_3^-). Su requerimiento ha sido demostrado en algunas especies; el movimiento transmembranar de este anión, probablemente a través de antiportes Na^+/H^+ podría ser el responsable del aumento del pH intracelular observado durante la capacitación (9,29). Adicionalmente podría regular el metabolismo del AMP_c, ya que en los espermatozoides la AC es estimulada directamente por este anión (31,22,17). Los cambios en la concentración de bicar-

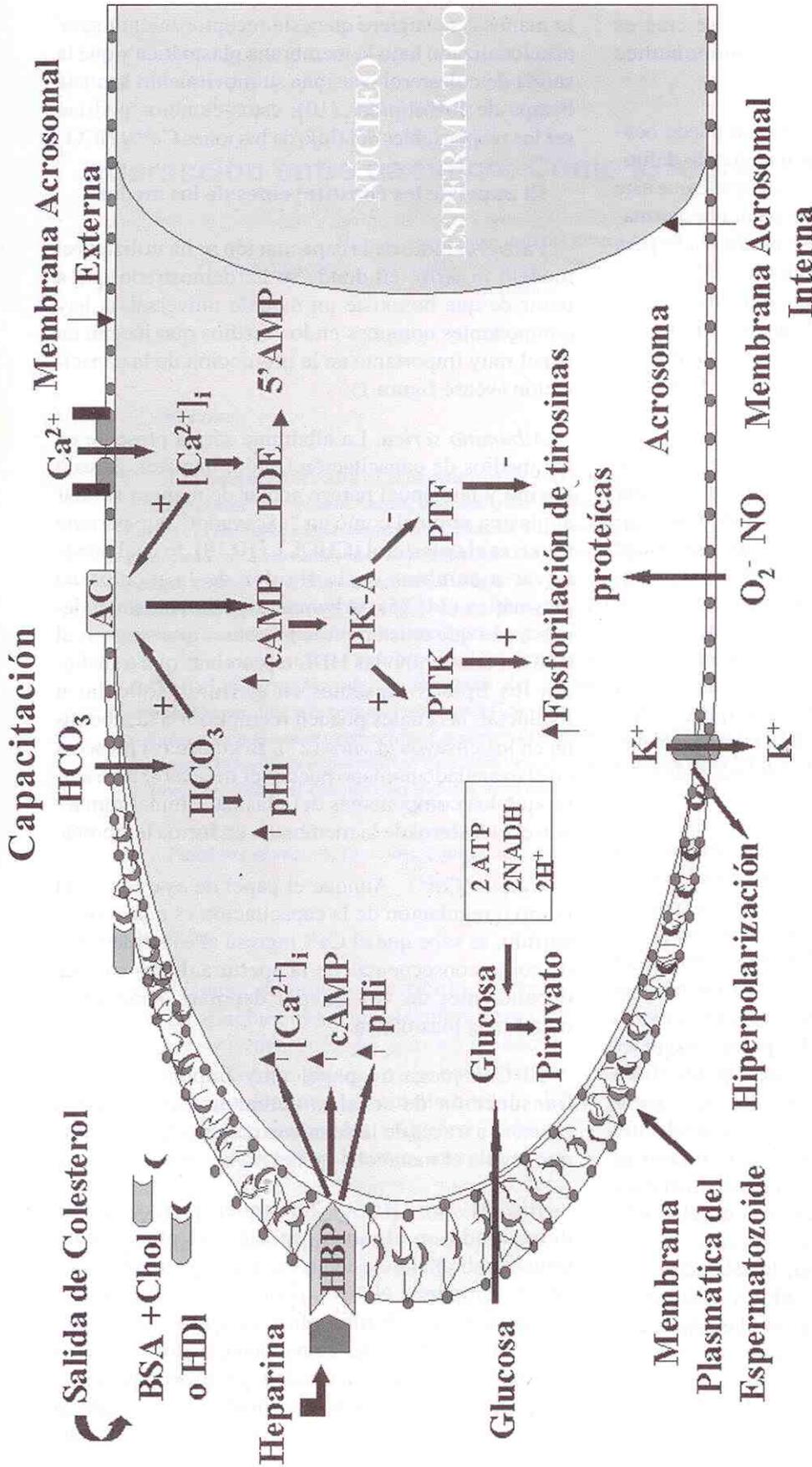


Figura 1: Modificado de Visconti y Kopf (30). Representación esquemática de los caminos de señalización transmembranal e intracelular que se han propuesto como participantes en la regulación de la capacitación espermática en mamíferos. La adenilato ciclasa (AC) puede ser activada por el calcio que penetra a través de canales iónicos dependientes de voltaje, que además puede activar la fosfodiesterasa nucleotídico cíclico (PDE) y también por el bicarbonato quien ingresa en contra de gradientes y ocasiona un incremento en el pH_i. La adenilato ciclasa una vez es activada sintetiza AMPc y éste activa la proteína quinasa A (PKA), la cual conduce a un incremento en la fosforilación de tirosinas proteicas a través de la activación de proteína tirosina quinasa (PTK) o la inactivación de proteína tirosina fosfatasa (PTF); este aumento en la fosforilación de la tirosinas proteicas también puede ser causado por radicales libres. La albúmina sérica bovina (BSA) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) retiran el colesterol (Chol) de la membrana plasmática, aumentando su fluidez. La heparina remueve las proteínas de unión a la heparina(HBP) que inhiben la capacitación e induce un aumento intracelular del Ca_i, del AMPc y del pH_i. La hiperactivación de espermatozoides de toro; cuando éste está recién eyaculado respira de manera anaerobia permeabilidad del K⁻. La glucosa inhibe la capacitación de espermatozoides de toro; cuando éste está recién eyaculado respira de manera anaerobia utilizando de glucosa y piruvato, hasta que se hiperactiva y comienza a respirar aerobiamente a través de sus mitocondrias..

bonato, bajas en el epidídimo y altas en el plasma seminal y en el oviducto, podrían jugar un papel importante suprimiendo la capacitación en el epidídimo y promoviéndola en el tracto femenino (7).

Efectores y segundos mensajeros intracelulares

Metabolismo del AMPc. El papel del AMPc en la capacitación y la reacción acrosómica es incierto, sólo se ha podido establecer bien su papel en la movilidad espermática (11). Estudios recientes han demostrado que durante la capacitación se aumenta la actividad de la protein kinasa A (PK-A), y que estos cambios de actividad reflejan elevaciones del AMPc intracelular.

La forma de regulación del metabolismo del AMPc puede estar relacionada con el cambio en la fluidez de los iones Ca^{2+} y HCO_3^- . Ambos son capaces de estimular la actividad de la AC en los espermatozoides, pero los mecanismos de cómo se produce esta activación aún no se conocen.

Fosforilación de tirosina. El aumento de la fosforilación de residuos de tirosina ha sido correlacionado con la capacitación del espermatozoide. Este evento media una variedad de funciones celulares tales como: la regulación del crecimiento, el control del ciclo celular, el ensamblaje del citoesqueleto, la regulación de las corrientes iónicas y la regulación de receptores. El incremento en la fosforilación de tirosina es dependiente del BSA, Ca^{2+} y $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; la ausencia en el medio de uno de estos constituyentes previene la capacitación. En los espermatozoides de la cabeza del epidídimo que no poseen la habilidad para capacitarse o fertilizar, no se presentan cambios en la fosforilación de sus proteínas, lo cual sugiere que esta capacidad es adquirida durante la maduración epididimal.

La fosforilación de tirosinas y la capacitación parecen estar regulados por la vía del cAMP/PK-A (30); actualmente no se sabe si el aumento en la fosforilación de las tirosinas proteicas sea debido a una estimulación de la tirosina kinasa o a la inactivación de una fosfotirosina fosfatasa, o a ambos (36,37).

pH intracelular (pHi). Algunos autores describen un aumento del pHi durante la capacitación, aparentemente debido al movimiento transmembranal del

HCO_3^- (32). Este anión regula muchos aspectos de la función del espermatozoide de los mamíferos. Uno de los mecanismos comparte las características del intercambio de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependiente de Na^+ ; el segundo camino para la salida de ácido no requiere iones extracelulares. Pero este cambio en el pHi no activa directamente la vía de los segundos mensajeros, sino que actúa creando un medio adecuado para que puedan actuar las enzimas activadas por el aumento del Ca^{2+} intracelular durante la fertilización (5).

Potencial de membrana. El proceso de capacitación se acompaña por la hiperpolarización de la membrana plasmática, que pasa de -35 a -50 mV en el ratón y de -30 a -60 mV en el bovino. Esto es debido en parte a un aumento en la permeabilidad al K^+ , causado probablemente por la liberación de la modulación inhibitoria a la que venía siendo sometido el espermatozoide. La hiperpolarización posiblemente causa un cambio en los canales de Ca^{2+} de una forma inactiva cerrada a una forma activa cerrada, estado desde el que podrían ser abiertos al contactar la zona pelúcida (3).

Radicales libres. La acción de los radicales libres en la función espermática parece estar relacionada con la hiperactivación de la movilidad y la capacitación. Algunos investigadores encontraron que las especies reactivas de oxígeno regulan la fosforilación de varias proteínas después de la estimulación de NAPH-oxidasa endógena o la adición de H_2O_2 (2,21); esto mejora la capacitación y el adosamiento a la zona pelúcida.

Heparina o glicosaminoglicanos. Se postula que éstas modulan la capacitación uniéndose y removiendo proteínas de la membrana espermática que se cree actúan inhibiendo la capacitación. La heparina puede aumentar la síntesis del AMPc, elevar el pHi y aumentar la fosforilación de tirosinas proteicas; el mecanismo y la relevancia fisiológica de esto no es clara (16,24). La capacitación inducida por la heparina no involucra la salida de colesterol de la membrana (28).

Glucosa. Tiene efectos inhibitorios o estimuladores en la capacitación dependiendo de las especies. En los bovinos tiene efectos inhibitorios en el metabolismo del AMPc y reduce el pHi (24,29).

HDL. Los niveles de HDL presentes en el líquido oviductal son altos durante la ovulación y bajos du-

rante las otras épocas del ciclo; la HDL facilita la salida de colesterol de la membrana plasmática y media la capacitación espermática (20).

Reacción Acrosómica

El espermatozoide hiperactivado sufre un proceso de reconocimiento por parte de la glicoproteína específica de la zona pelúcida ZP_3 , receptor primario de ZP, quien junto con la progesterona proveniente del fluido folicular y las células del cúmulus inducen la reacción acrosómica.

La reacción acrosomal es mediada por receptores acoplados a proteína G; la subunidad alfa de ésta activa la fosfolipasa C (PLC β 1), producida por proteínas de la zona pelúcida y modulada por fosforilación de tirosinas proteicas, cliva el fosfoinositol difosfato en inositol trifosfato (IP $_3$) y diacil glicerol (DAG). Esto conduce al incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} (conocidas como ondas de Ca^{2+} , las cuales se han observado que ocurren como un pico inicial seguido de una meseta que dura algunos minutos), la modulación de las proteínas kinasas y al metabolismo de los fosfolípidos por la vía de segundos mensajeros. Este evento exocítico es caracterizado por múltiples puntos de fusión entre la membrana citoplasmática y la membrana acrosomal externa, exponiendo el contenido acrosomal lo que permite la penetración a través de la zona pelúcida del oocito (véase figura 1).

Progesterona. Componente del fluido folicular que induce la hiperactivación y la reacción acrosomal, media la exocitosis acrosomal operando a través de la transducción membranal que involucra el aumento del Ca^{2+} intracelular y modula el metabolismo de las kinasas proteicas y los fosfolípidos por la vía de segundos mensajeros. El receptor de la progesterona en el espermatozoide humano está localizado únicamente en la membrana plasmática de la cabeza y contiene un dominio de unión a esteroides (6). Se piensa que este receptor de superficie tiene propiedades similares a las de un canal de Ca^{2+} , canal de cloro; intercambiador bicarbonato/cloro y GABA (25).

El mecanismo del efecto de la progesterona se ha relacionado con el incremento del flujo de cloro (aumento intracelular de Cl^-) con la consiguiente hiperpolarización de la célula, es decir se torna más electronegativa, aparentemente por un complejo re-

ceptor esteroide-canal de cloro. Con el aumento del Cl^- intracelular, el espermatozoide intercambia por HCO_3^- , lo que produce un aumento del pH y/o aumento de la actividad de la AC, siendo ambos importantes para la reacción acrosómica (25).

Ca^{2+} . Los espermatozoides son transcripcionalmente y translacionalmente inactivos; por lo tanto los canales iónicos que son utilizados en el espermatozoide deben haber sido sintetizados durante la espermiogénesis. El único canal de calcio activado por voltaje que ha sido detectado durante la espermiogénesis es el canal de calcio tipo T, activado por bajo voltaje.

Los canales de Ca^{2+} son los responsables aparentemente de las reacciones acrosomales y funcionan particularmente disminuyendo o minimizando la reacción acrosomal espontánea. La elevación de Ca^{2+} que desencadena la reacción acrosomal, parece ser debida a una estimulación por parte de la ZP_3 (13,14).

Fusión espermatozoide-oocito

El espermatozoide se fusiona de una forma específica con el oolema e inicia una serie de señales en el oocito que conllevan a la "activación" de éste, lo que permite completar la meiosis II e iniciar el ciclo celular mitótico. Existen dos hipótesis sobre cómo se produce la activación del oocito inducida por el esperma: la hipótesis de la fusión y la hipótesis del receptor (véase figura 2).

En la **hipótesis de la fusión** se postula que después de producirse la fusión entre las dos membranas, un factor soluble derivado del citoplasma espermático activa el oocito (26); este factor se conoce con el nombre de **oscilina** por su habilidad para inducir oscilaciones del Ca^{2+} intracelular cuando es microinyectado dentro de un oocito; sin embargo aún no se sabe si induce otros eventos durante la activación (23).

En la **hipótesis del receptor** se cree el esperma interactúa con un receptor de superficie específico (33). Se han propuesto tres tipos diferentes: receptores tipo integrina, receptores acoplados a proteína G o a tirosina kinasa; estos inducen una cascada de señales de transducción intracelular causadas por la interacción entre las regiones específicas de la cabeza del espermatozoide y la membrana plasmática del oocito, señales que son posteriormente amplificadas mediante la producción de segundos mensajeros.

Activación del Oocito

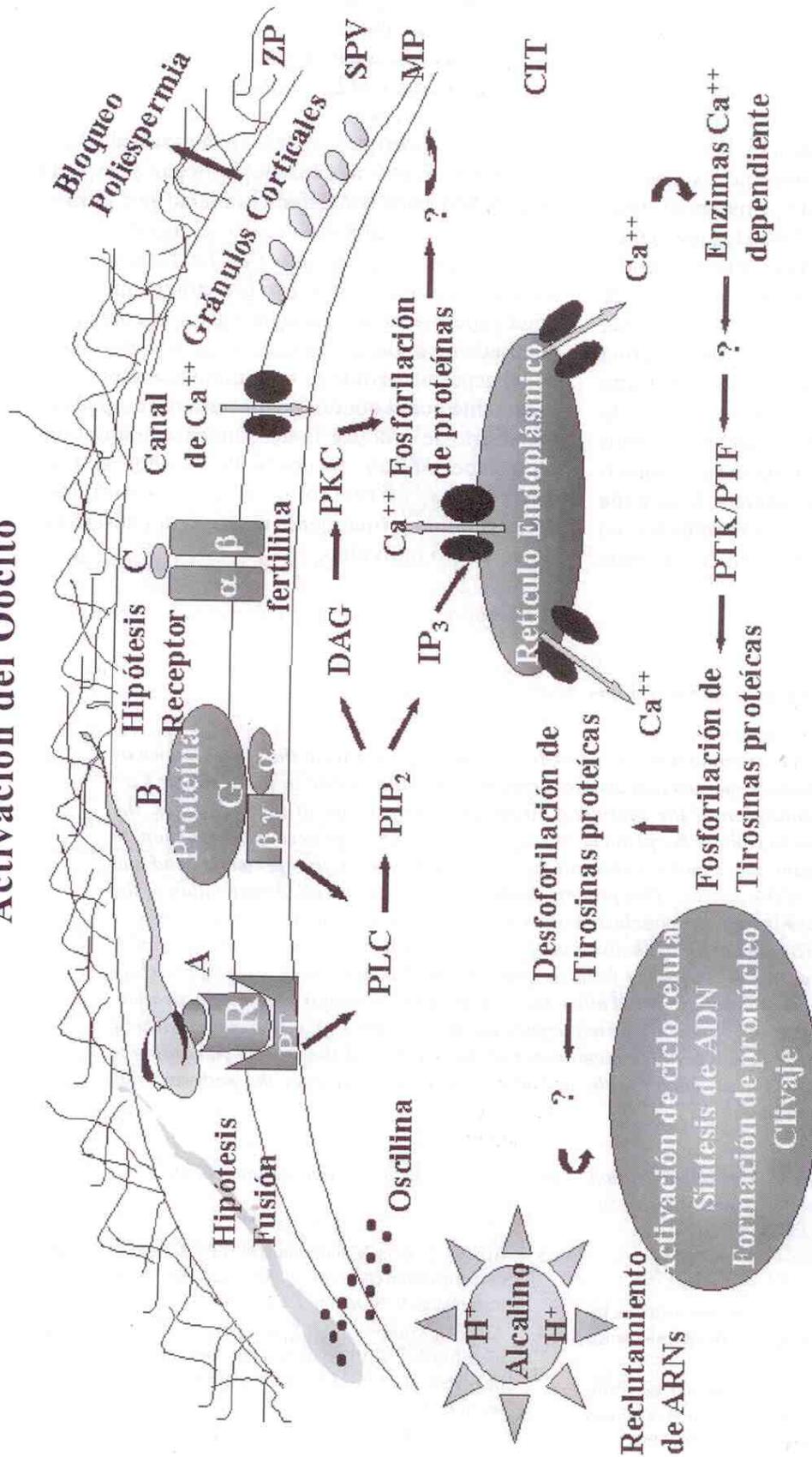


Figura 2. Modificado de Yosef y Shalgi (5) y Evans y Kopf (12). Diseño esquemático de la activación del oocito inducida por un espermatozoide y utilizando mecanismos de señalización mediados por (A) receptor tirosina kinasa, (B) receptor acoplado a proteína G o (C) receptor tipo integrina. La unión del espermatozoide a cualquiera de estos receptores en el oocito, o el ingreso de una proteína espermática soluble (oscilina) ocasiona un aumento en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular, a expensas del retículo endoplásmico (RE) y de la entrada del exterior; este incremento induce por un lado a reanudación de la meiosis y la activación del ciclo celular y por otro lado la exocitosis de los gránulos corticales que ocasionan el bloqueo de la poliespermia, esta reacción cortical también puede ser iniciada por proteínas quinasas dependientes de calcio (PKC). El aumento del ca. activa además enzimas dependientes de Ca⁺⁺, las cuales pueden facilitar la activación de proteínas tirosina kinasa (PTK) o inactivar proteínas tirosina fosfatasa (PTF). La fosforilación de sustratos proteicos específicos produce señales espermáticas que regularán corriente abajo el ciclo celular. El pH_i alcalino dentro del oocito ovulado suministra un medio adecuado para que las enzimas activadas por incremento del calcio actúen. DAG diacilglicerol; IP₃ inositol 1,4,5 trifosfato, PIP₂ fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, PLC fosfolipasa C.

Existen en el oocito proteínas similares a las integrinas y a las fibronectinas que son importantes para la adhesión al espermatozoide y para la organización de los componentes de membrana (15); una de ellas es la fertilina (PH-30), la cual ha sido propuesta como la molécula que podría ser la mediadora de las interacciones oocito-esperma; ésta es un heterodímero compuesto de dos proteínas transmembranales (subunidad α y β) localizadas en la región posterior de la cabeza del espermatozoide, que comparte similitudes con algunas proteínas de adhesión viral incluyendo topología de la membrana, acción proteolítica, dominio de unión a desintegrina y dominio putativo fusogénico. La subunidad α contiene una región con homología a los péptidos de fusión viral y la subunidad β contiene dominios con homología a la familia de las integrinas, conocidas como desintegrinas, lo que sugiere la función adhesiva celular de la fertilina β . El problema con la fertilina es que no está localizada en el segmento

ecuatorial del espermatozoide, sino en la región postacrosomal; por esto se cree que estaría más involucrada en la adhesión y/o en la fusión secundaria esperma-oocito (12).

Sólo los espermatozoides que han sufrido reacción acrosómica son capaces de llegar al espacio perivitelino para contactar el oolema por el margen apical del segmento ecuatorial, donde está su único dominio fusogénico (4). La fusión de las bicapas membranales ocurre probablemente cuando el espermatozoide cesa de mover la cola como resultado de la despolarización; cuando esto sucede, el espermatozoide es engolfado completa y rápidamente por el oocito; pocos minutos después de penetrarlo se produce la descondensación del núcleo espermático, la unión de las dos células germinales, el restablecimiento del número cromosómico y finalmente el inicio del desarrollo de un nuevo individuo.

Summary

Interaction between gametes: the sperm how do it?

The interaction between sperm and oocyte preceded by a series of events in the sperm known as "capacitation"; these changes include a dramatic increase in mobility, a rise in intracellular Ca^{2+} concentration and destabilization of the spermatid membrane. As a result of these changes, the sperm acquires the ability to contact the pellucid zone of the egg, to undergo acrosomic reaction, to pass through the perivitelline space and to carry out the interaction between the spermatid head and the plasmatic membrane of the oocyte. This process leads in turn to events called "activation of the oocyte", which make possible both the conclusion of meiosis II and initiation of the cellular mitotic cycle. Two hypotheses exist to explain the activation of the oocyte induced by the sperm. The first is the hypothesis of the "receptor", where the fertilizing sperm would interact with a specific surface receptor on the oocyte, this interaction would allow the transmission of signals and later activation. The other hypothesis is that of "fusion", which argues for the existence of a spermatid cytosolic factor that occurs after the fusion between membranes of the oocyte and the sperm. According to this second hypothesis, the sperm enters to the oocyte cytoplasm and activates the pathways that make oocyte activation possible.

Key words: *acrosomic reaction, activation, capacitation, fertilization, interaction, oocyte.*

Referencias

1. Acolt TS, Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and quiescence factor. *Biol. Reprod.* 1984;30: 926-935.
2. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham WD, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in control of human sperm function. *J. Cell. Sci.* 1995;108:2017-202.
3. Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell. Biol.* 1996;134:637-645.
4. Arts EG, Kuiken J, Jager S, Hoekstra D. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa specific involvement of the equatorial segment after the acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 1993;217:1001-1009.
5. Ben-Yosef D, Shalgi R. Early ionic events in activation of mammalian egg. *Rev. Reprod.* 1998;3:96-103.

6. Blackmore P. News and views of non-genomic progesterone receptors on spermatozoa. *Andrologia* 1998;30:255-261.
7. Brooks DE. Epididymal function and their hormonal regulation. *Aust. J. Biol. Sci.* 1983;36:205-221.
8. Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of ras-dependent activation of raf. *Science* 1993;262:1069-1072.
9. Cross NL, Razy-Faulkner P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* 1997;56:1169-1174.
10. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 1998;59:7-11.
11. Eddy Em, O'Brien DA. The spermatozoon. En: Knobil E, Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press, 1994; 29-77.
12. Evans J, Kopf S. Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation *Andrologia* 1998;30:297-307.
13. Florman H, Arnoult C, Kazam I, Li Ch, O'Tooie C. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biol. Reprod.* 1998;59:12-16.
14. Florman HM, Lemos JR, Arnoult C, Kasam I, Li C, et al. A tale of two channels: a perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm. *Biol. Reprod.* 1998;59:12-16.
15. Fusi FM, Vignali M, Bussaca M, Bronson RA. Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol Reprod. Dev.* 1992;31:215-222.
16. Galantino-Homer H, Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 1997;56:707-719.
17. Garty N, Salomon Y. Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 1987;218:148-152.
18. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* 1985;32:145-153.
19. Hunter Ag, Normes Ho. Characterization and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, 1969;20:419-427.
20. Lane M, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Heparin and high-density lipoprotein mediated bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.* 1999; 60:169-175.
21. Leclerc P, De Lamirand E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radical. Biol. Med.* 1997;22:643-656.
22. Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through the direct activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 1985;260:9699-9705.
23. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI. *et al.* Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature.* 1996;379:364-368.
24. Parrish JJ, Susko-Parrish JJ, Uguz C, First NL. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 1994;51:1099-1108.
25. Purohit S, Laloraya M, Kumar P. Bicarbonate-dependent lipid ordering and protein aggregation are part of the nongenomic action of progesterone on capacitated spermatozoa. *J. Androl.* 1998;19:608-618.
26. Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increase and mimics fertilization in hamster eggs. *Dev.* 1990; 110:1295-1302.
27. Thérien I, Manjunath P. Phospholipid-binding proteins of bovine seminal vesicles modulate HDL- and heparin-induced capacitation of spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1996;54(suppl 1), 62 (abstract 23).
28. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 1998;59:768-776.
29. Uguz C, Vredenburg WL, Parrish JJ. Heparin-induced capacitation but intracellular alkalization of bovine sperm is inhibited by Riadenosine-3', 5'- cyclic monophosphothioate. *Biol. Reprod.* 1994;51:1031-1039.
30. Visconti P, Kopf G. Minireview. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 1998;59:1-6.
31. Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochem Biophys. Acta.* 1990;1054:231-236.
32. Vredengburgh-Wilberg Wl, Parrish JJ. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 1995;40:490-502.
33. Williams Cj, Schultz RM and Kopf GS. Role of G proteins in mouse egg activation: stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional muscarinic receptor. *Dev. Biol.* 1992; 151:288-296.
34. Wolf DE, Cardullo RA. Physiological properties of the mammalian sperm membrane. En: Baccetti B (ed). *Comparative Spermatology 20 Years After*, New York, Raven Press, 1991;599-604.
35. Wolf DE, Hagopian SS, Isogima S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J. Cell. Biol.* 1986;102:1372-1377.
36. Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber Mj, et al. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Science.* 1993;262:1065-1069.
37. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En Knobil E, Neil JD (eds). *The Physiology of Reproduction*, New York, Raven Press, 1994;189-317.
38. Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. pH regulation in mouse sperm. Identification of Na⁺, Cl⁻ and HCH₃⁻ dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their role in sperm capacitation. *Dev. Biol.* 1996;173:510-520.