



Ginecología y Obstetricia

© Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología

Ginecol. obstet. 1997; 43 (3) : 183-190

TEMA DE REVISIÓN

Mecanismo de fertilización

Percy Bellido

Definición

La definición tradicional indica que fertilización es un proceso de unión de los pronúcleos femeninos y masculinos para la formación de un nuevo ser.

No se trata sólo de la penetración de una célula pequeña (espermatozoide) en una grande (oocito). Se trata de una interacción intercelular, altamente especializada, en la cual un gameto activa el otro.

La interacción oocito espermatozoide es un complejo proceso secuencial, que se inicia con el reconocimiento de receptores complementarios en la superficie de ambos gametos¹ y finaliza con la unión de los cromosomas paternos y maternos. Durante este proceso, el momento crucial es la fusión de las membranas plasmáticas de ambos gametos.

Puede haber interferencia en la fertilización; fungicidas², magnesio³ nitrazepan⁴, pulsos sonográficos y Doppler⁵, estrés⁶, zinc⁷, apolipoproteínas⁸; cambios en la insulina de madres obstaculizan la fertilización en ratones⁹.

Es importante mencionar las opiniones de dos investigadores. Hiroi¹⁰ indica que fertilización es el proceso que incluye muchos eventos, tales como maduración del oocito y espermina, unión, reacción acrosómica, penetración, fusión, reacción cortical, zona de reacción y fusión nuclear de ambos gametos.

Sutovsky¹¹ menciona que la fertilización es una cascada de eventos que resultan en la unión de los genomas paternos y maternos y el establecimiento de potencial metabólico del cigote. Esta interacción incluye la descondensación del núcleo del espermatozoide en pronúcleo, la junta del centrosoma del cigote y la reunión de las proteínas del centrosoma y los microtúbulos del aster alrededor del centriolo del espermatozoide. Tanto la formación del pronúcleo masculino y la unión del centrosoma del cigote son pasos cruciales requeridos para la aposición nuclear y unión genómica.

Primer contacto del espermatozoide con el oocito

De los 300 millones de espermatozoides eyaculados durante el coito, solamente 200 de ellos llegan al tercio externo de la trompa. Aquí, los espermatozoides tienen la posibilidad de entrar en contacto y atravesar, en forma sucesiva, la masa acumulada y la corona radiada, antes de contactar con la zona pelúcida.

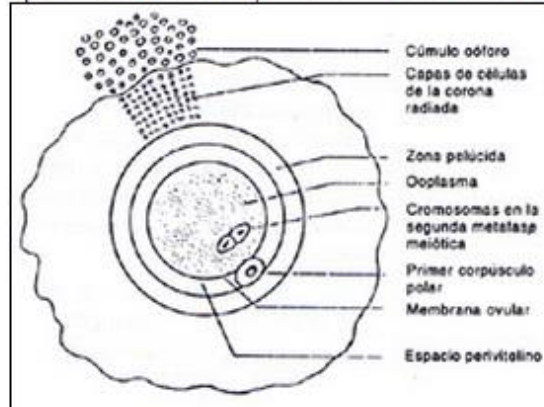
De otro lado, el oocito es liberado con una serie de capas que lo cubren. El tamaño del folículo parece tener efectos beneficiosos en la fertilización, como se ha demostrado en la fertilización in vitro¹².

La masa acumulada tiene una matriz acelular hecha de carbohidratos, ácido hialurónico y proteínas. Para atravesarla, es necesario que el espermatozoide haya tenido la capacitación. Los espermatozoides que no han completado su reacción acrosómica previa a la penetración de esta capa, no son capaces de penetrarla. Es posible que la hialuronidasa (no de origen acrosómico) unida a la membrana ayude a la penetración de la masa acumulada. Se postula que la diferencia individual de espermatozoides permitiría una ruta preferencial en la masa acumulada, que facilitaría la penetración del espermatozoide. La sincronización de los mecanismos



mencionados, son prerequisite para los siguientes acontecimientos de la fertilización. Se ha postulado que la acción mecánica ayuda a desnudar la masa acumulada, en la que intervienen secreciones tubáricas.

Gráfico 1. Diagrama representativo de un óvulo después de la ovulación, con sus cubiertas celulares.



Respecto a lo corona radiada, sus células están ancladas en la zona pelúcida. La sola acción mecánica no es suficiente para separarla. Es necesario una acción fermentativa que separe las uniones intercelulares de la corona radiada; se ha observado esta separación en ausencia de espermatozoides. Se ha estudiado la CD46, una proteína cofactor de membrana, que protege a la célula de compicniento homólogo; parece ser que sirve para la adhesión molecular del espermatozoide al oocito, encontrada en mayor concentración en espermatozoides que en espermátides¹³.

Unión del espermatozoide con la zona pelúcida

La zona pelúcida es una lámina glicoproteica de varias micras de espesor. Su componente acelular, secretado por el oocito en desarrollo, se llama membrana vitelina. La zona pelúcida participa en el fenómeno de adherencia del espermatozoide oocito, induce la reacción acrosómica y participa en el posterior bloqueo para poliespermia. Los residuos de carbohidratos de las glicoproteínas ZP juegan un rol clave en este paso temprano de la fertilización. Esto se ha demostrado estudiando una batería de lectinas, todas ellas preferencialmente localizadas en la región interna de la zona pelúcida¹⁴.

En los mamíferos, la zona pelúcida tiene proteínas (70%), hexosa (20%), ácido siálico (3%) y sulfato (3%). Al microscopio electrónico, esta superficie tiene apariencia de enrejado, con muchos filamentos. En la matriz de la zona pelúcida de muchos mamíferos hay varias glicoproteínas mayores; dos de ellas, ZP2 y ZP3, tienen los filamentos, la ZP1 entrecruza los filamentos como una malla tridimensional, mientras que la ZP3 actúa como un receptor del espermatozoide. La unión específica de una especie de espermatozoide a la zona pelúcida es mediada por una molécula (galactosil transferasa) en la superficie de la cabeza del espermatozoide que une el oligosacárido de unión O de la ZP3 a una proteína tirosina quinasa¹⁵. Una vez localizada la unión, ocurre en el espermatozoide la reacción acrosomal.

La ZP3 (83Kd) funciona como molécula de adhesión y como secretagoga para la exocitosis acrosomal¹⁶. Estas glicoproteínas ZP inician una rápida exocitosis acrosomal. Se han encontrado una rápida exocitosis acrosomal. Se ha encontrado 30,000 sitios do unión de 1 a 29 NM, en la ZP3. Esto sugiere una unión compleja, en que participan múltiples receptores en la superficie del espermatozoide, así como ligando.

Es necesario la integridad del acrosoma y se ha estudiado que se encuentra favorecida con la presencia de antioxidantes: superóxido desmutasa, catalasa, citocromo C; glutatión peroxidasa¹⁷.

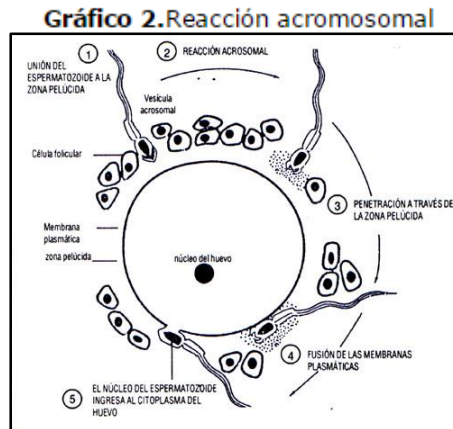
Kodama ha comprobado que la capacidad de unión del espermatozoide a la zona pelúcida está incrementada, cuando una condición peroxidativa media incrementa la formación de peróxidos lipídicos¹⁸. Dicho autor menciona que, una condición peroxidativa suave incrementa una formación de lípidos peroxidativos, sin modificación significativa de grupos sulfidrilos libres y parámetros de motilidad espermática, proveen potencial fertilización de espermatozoides por un incremento de su capacidad de unión a la zona pelúcida¹⁹.



Reacción acrosomal

El acrosoma es una membrana que cubre la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, formando como un gorro; se encuentra en la mayoría de las especies. Topográficamente se localiza por dentro de la membrana plasmática, con la cual contacta, la membrana acrosomal externa; internamente, se encuentra la membrana acrosomal interna.

El acrosoma o membrana circundante tiene dispuestas una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que incluyen hialuronidasa, acrosín, pro acrosín, fosfasa, aril sulfatasa, collagenasa, fosfolipasa C, beta galactosidasa, siendo las dos primeras las más estudiadas²⁰. Tiene otras proteínas que pueden ser neutralizadas por anticuerpos²¹.



La reacción acrosomal implica la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática envolvente, seguido de la liberación del contenido acrosomal.

En el ratón, al menos, el mecanismo disparador es la ZP3 de la zona pelúcida, lo cual activa un complejo mecanismo intracelular, que incluye el influjo del calcio en el citosol del espermatozoide, lo cual se piensa, inicia la exocitosis.

En los humanos, la fusión se inicia en el borde del capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial del acrosoma, donde parece que las membranas son intrínsecamente menos estables. Esta región es rica en sitios de unión de calcio. La reacción acrosomal es rápida y dura de 2 a 15 minutos *in vitro*.

Previa a la reacción acrosómica, los espermatozoides de muchas especies muestran un patrón de motilidad alterado, llamado hiperactivación. De un inicial movimiento lineal progresivo, los espermatozoides empiezan a mostrar un patrón de movimiento errático, con golpes de látigo de la cola.

Mecanismo de la reacción acrosómica

Esencialmente, un componente gelatinoso del oocito interactúa con la membrana plasmática del espermatozoide, induciendo un incremento del pH intracelular y una despolarización dependiente del calcio.

El cambio de pH causado por un eflujo de hidrogeniones y un influjo de sodio es calcio independiente. Tanto el incremento de pH como la despolarización de la membrana permiten la activación de canales de calcio de la membrana plasmática, permitiendo un influjo masivo de iones calcio. Este alto nivel del calcio intracelular induce la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática circundante y la liberación del contenido acrosomal

En los espermatozoides de mamíferos, la ZP2 podría ser considerada como un ligando disparador de la reacción acrosómica. La proteína G es encontrada en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal externa. Los segundos mensajeros potenciales serían: adenilclasa, que genera AMPc, fosfolipasa C, que induce a inositol trifosfato y diaciglicerol, fosfolipasa D generadora de ácido fosfatídico, fosfolipasa A2, que genera ácido araquidónico.

La reacción acrosomal es muy variable de un espermatozoide a otro; unos la hacen pronto, otros más tarde; en algunos el disparador resulta inadecuado y en otros el mecanismo de traducción fallará en algún paso. Por eso se piensa que, los pocos espermatozoides que llegan a la masa del oocito indican un proceso de selección.



Green, luego de estudios, ha propuesto la existencia del péptido promotor de fertilización, que es un tripéptido similar a la hormona liberadora de tirotrópica y que ha demostrado ser capaz de estimular la capacitación y habilitada de fertilización en los espermatozoides epididimales del ratón²².

Asimismo se ha investigado el papel de la hexoquinasa localizada subcelularmente en el espermatozoide, y que modula la capacitación y la reacción acrosómica²³.

También se ha demostrado la estimulación del movimiento y reacción acrosómica del espermatozoide humano, por el liposoma PC12, encapsulando ATP²⁴.

Usando el análisis del flujo citométrico de una reacción acrosómica espontánea o inducida, se obtuvo un predictor de respuesta acrosómica, a cambio con ionóforo²⁵.

Es motivo de estudio el efecto de la catalasa para capacitar el espermatozoide²⁶, porque neutraliza el peróxido de hidrógeno que se produce.

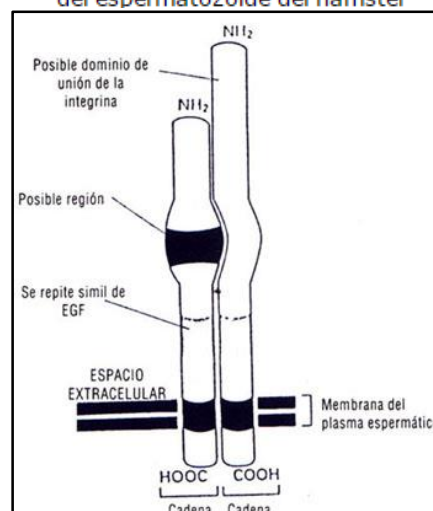
El ión cobre (100 microgramos/mL) interfiere no sólo en la reacción acrosómica, sino en la motilidad y viabilidad del espermatozoide²⁷.

La unión ZP3 receptor del espermatozoide produce reacción acrosómica y expone el sistema proacrosín/acrosín. El proacrosín por autoactivación, se transforma en su forma proteolítica activa: acrosín. Esta es una proteasa serina que une más al espermatozoide a la zona pelúcida y condiciona su penetración. La zona pelúcida es un sustrato específico y natural para acrosín y su hidrólisis y fertilización pueden ser inhibidas por anticuerpos monoclonales antiacrosín²⁸. Algunos estudios no le dan mucha importancia al acrosín.

Fusión del espermatozoide al oocito

Cuando el espermatozoide ha penetrado la capa extracelular del oocito, interactúa fuertemente con las microvellosidades de dicha superficie. Las microvellosidades vecinas a las zonas de contacto se elongan y lo agrupan alrededor del espermatozoide, para asegurarlo firmemente y permitir su fusión con el oocito. Después de la fusión, el espermatozoide entero es desvainado de la cabeza y las microvellosidades son absorbidas. Varias proteínas de superficie del espermatozoide con actividad catalítica (galactosil transferasa, proteasas y glucosidasas) o de lectinas, reconocen y unen de manera específica a componentes glicoproteicos de la zona pelúcida del óvulo, como un requisito previo a la fecundación²⁹.

Gráfico 4. Proteína PH-30 en la membrana plasmática del espermatozoide del hamster



Sólo un espermatozoide llega a fusionarse con la membrana del oocito. Dos mecanismos aseguran esto:

Una rápida despolarización de la membrana plasmática del oocito, la cual es causada por la fusión del primer espermatozoide; este mecanismo es temporal.

La denominada reacción cortical, sobre la cual posteriormente nos referiremos.



En los mamíferos, la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de la región post acrosomal es la que aparentemente se fusiona con la membrana plasmática del oocito. Esta región solo tiene posibilidad de fusión después de la reacción acrosómica. La superficie de la mayoría de oocitos está constituida por áreas de vellosidades cortas.

Una vez unidas las membranas plasmáticas del espermatozoide y oocito, establecen un punto de fusión; aquí ya no es necesario la motilidad del espermatozoide. La fusión es dependiente de la temperatura, pH, y calcio.

En los hamsters se ha encontrado una proteína transmembrana, llamada PH-30, la cual empieza a ser expresada en la superficie del espermatozoide durante la reacción acrosomal, la cual condiciona la unión entre espermatozoide y oocito, además de proveer la fusión de sus membranas.

Esta proteína está compuesta de dos subunidades transmembrana glucosiladas, llamadas alfa y beta, las cuales permanecen juntas por uniones no covalentes. El dominio extracelular de la subunidad alfa contiene una región hidrofóbica de cerca de 20 residuos de aminoácidos, semejantes a las regiones de fusión de proteínas virales (un virus a células infectadas).

El dominio extracelular amino terminal de la subunidad beta semeja a los dominios de algunas proteínas que se unen a las integrinas (receptores celulares de superficie que ayuda a adherirse a la matriz extracelular); esta subunidad ayuda a que el espermatozoide se adhiera al oocito, preparándolo para la fusión.

Una vez unidas fuertemente las membranas del espermatozoide y oocito, se produce el ingreso del pronúcleo masculino al citosol del oocito, para, luego de una sucesión de acontecimientos, se produzca un nuevo núcleo diploide, iniciándose una nueva vida.

Hay que considerar además otras proteínas, que son detectadas sólo en los oocitos maduros (no en los inmaduros), que garantizan fertilización adecuada³⁰. La cantidad y calidad de espermatozoides determinan su fusión al oocito³¹.

Se ha encontrado, en el erizo del mar, que la fertilización estimula la asociación de la proteína quinasa con detergente insoluble en el citoesqueleto del oocito. Sus niveles aumentan a los cinco minutos de fertilización, al igual que la proteína tirosinkinasa³².

Reacción cortical del oocito

Es un mecanismo que permite que un solo espermatozoide una su pronúcleo con el oocito, ocurriendo en éste despolarización de membrana e incremento de pH intracelular.

Para explicar la activación del oocito se ha planteado dos hipótesis:

a. La hipótesis del receptor. La GTP une los receptores de membranas a enzimas que generan segundos mensajeros intracelulares.

b. La hipótesis del factor espermático soluble, que activaría los oocitos, situación comprobada en gametos de mamíferos; se sugiere al calcio y al inositol fosfato como los protagonistas de este proceso.

El primer evento de activación en la mayoría es la despolarización de membrana plasmática³³. Este mecanismo varía según la especie; en los humanos, el espermatozoide induce una corriente hacia fuera en la membrana citoplasmática del oocito, por la activación de los canales del potasio; aquí interviene el calcio.

Mecanismo de la reacción cortical

Cuando el espermatozoide se fusiona con la membrana plasmática del oocito, se activa la vía del inositol fosfolípido³⁴. En su momento causa el incremento citosólico de calcio, de 0,1 micro mol a 10 micro mol, en minutos retorna a los niveles de reposo. Pequeñas nuevas oleadas continúan por varios minutos después de la fertilización. La oleada u onda de calcio se inicia en el sitio de unión del espermatozoide - oocito, difundiéndose en sucesivas oleadas, que, según las especies, ocurren cada 4 a 10 segundos.

Este incremento del calcio activa una reacción cortical inicial, en la cual los gránulos corticales liberan su contenido por exocitosis. Esto ha sido observado en todas las especies³⁵. En el erizo del mar, la liberación de calcio mediada



por GMP cíclico no es requerida para el incremento del calcio durante la fertilización³⁶. El aumento de calcio intracelular previene la poliespermia y activa el metabolismo del oocito³⁷.

Un segundo fenómeno es el incremento del pH intracelular, que no se presenta en todas las especies^{39,40}. En el erizo del mar se ha observado un mecanismo antiporte $\text{Na} + \text{H}^+$, por activación de proteína C quinasa, y esto causa alcalinización del citoplasma. Esta elevación del pH es necesaria para varios eventos de la activación que luego ocurrirán. Está en estudio el rol de la proteína C quinasa en la exocitosis⁴¹, el cual es cuestionado.

Eventos estructurales

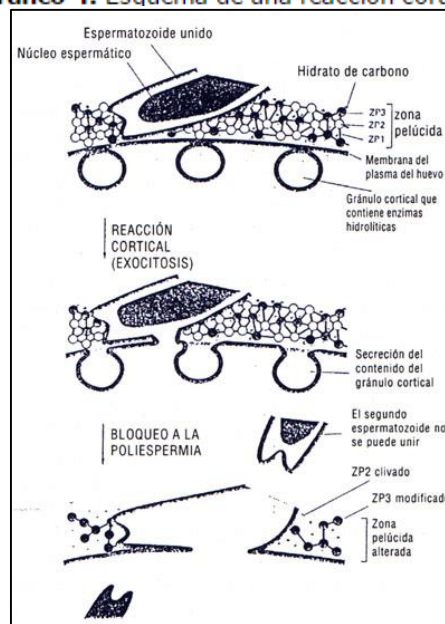
El primer cambio estructural de la reacción cortical del oocito es la exocitosis de los gránulos corticales, que son pequeñas organelas esféricas unidas a la membrana y originadas en el complejo de Golgi y que contiene enzimas y mucopolisacaridasas.

En el oocito de erizo de mar, se ha observado cerca de 20 000 gránulos corticales, que inician la exocitosis en la zona de unión del espermatozoide oocito y que luego en oleada se excitan el resto de gránulos. Esto modifica la membrana vitelina, tanto por la acción de enzimas liberadas en el espacio perivitelino, como por acción de las mucopolisacaridasas, que inducen un influjo de agua en dicho espacio, causando su expansión.

El mecanismo de la exocitosis está siendo estudiado; se ha encontrado que la quinasa Cdc 2/ ciclín B y la quinasa de actividad MAP disminuyen inmediatamente después de la exocitosis⁴².

En los mamíferos también se observa los cambios en la zona pelúcida, llamada zona de reacción.

Gráfico 4. Esquema de una reacción cortical



Todos estos cambios son manejados in vitro con las técnicas de fertilización ICSI (intracytoplasmic sperm injection), ROSI (round spermatid injection) ELSI (elongated spermatid injection) ELSI (elongated spermatid injection)⁴³⁻⁴⁵.

Los gránulos corticales de los oocitos podrían realizar dos mecanismos: 1) hidrólisis de los residuos de carbohidratos terminales de glicoproteína ZP por glicosidasas contenidas en los gránulos; y 2) por adición de nuevas glicoproteínas a la ZP después de la exocitosis de gránulos corticales⁴⁶. Es importante un buen número de gránulos para evitar la poliespermia ⁴⁷.

¿Por qué sólo un espermatozoide fertiliza al oocito?



Esto es debido a la reacción cortical, que no sólo activa al oocito, sino que al mismo tiempo previene la interacción de espermatozoides supernumerarios.

En los ratones, este cambio en la zona pelúcida no sólo impide el ingreso de espermatozoide de la misma especie, sino de otras especies. Esto se llama bloqueo vitelino. Cuando hay varios espermatozoides en el espacio perivitelino, se supone un debilitamiento de la zona de reacción y una fuerte reacción vitelina, como ocurre en el conejo.

Si más de un espermatozoide se une al oocito, condición llamada poliespermia, se forman husos extra mitóticos o multipolares, resultando en una inadecuada segregación de cromosomas durante la división celular, se producen células no diploídicas y el desarrollo celular es frenado. Los cambios intensos de temperatura y una variedad de agentes químicos que cambian el pH, inducen poliespermia, probablemente por alteración del citoesqueleto.

Algunos autores postulan que la reacción cortical sirve como una alteración química de la zona pelúcida o membrana vitelina, para proteger al embrión de infección bacteriana.

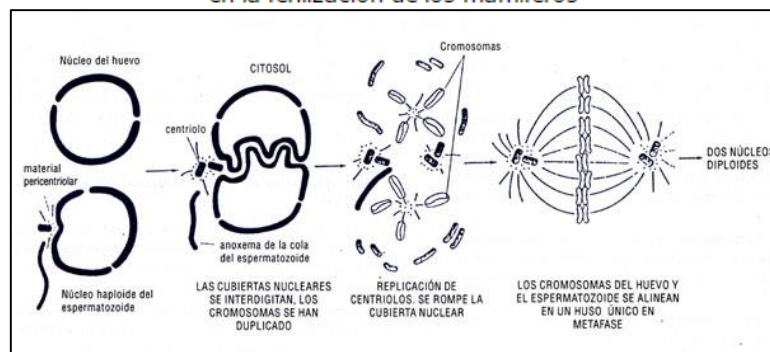
En *Xenopus*, se ha encontrado que gránulos corticales de lectina, al unirse al ligando alfa galactocidasa con intervención del calcio, impiden la poliespermia⁴⁸.

Se ha demostrado una distribución de diferentes residuos de azúcares en la zona pelúcida de la rata, con cambios en la posfertilización de la beta galactocidasa, con otros cambios que bloquean la poliespermia⁴⁹.

Se ha estudiado que la aminopeptidasa liberada por oocito fertilizado bloquea la reacción acrosómica, previniendo poliespermia, ya que bloquea la unión espermatozoide oocito⁵⁰.

El propanolol induce poliespermia en la fertilización del erizo de mar⁵¹, por bloqueo de reacción cortical, la cual es incompleta.

Gráfico 5. Unión de los pronúcleos del espermatozoide y del oocito en la fertilización de los mamíferos



Formación del cigoto

Una vez fertilizado el oocito, se llama cigote o cigoto. La fertilización, sin embargo, no está completa, hasta que los pronúcleos masculino y femenino se han unido y combinado sus cromosomas en un núcleo diploide. En el caso de los mamíferos hay una peculiaridad; primero, ambos pronúcleos migran al centro del oocito, acercándose; luego sus membranas se interdigitan y rompen, para dar paso a la primera división mitótica.

El centriolo, dañado por el pronúcleo masculino, se replica, y los cromosomas de ambos gametos son integrados en huso único, el cual realizará las divisiones posteriores y constituyen el cigote. El siguiente paso es la formación de una nueva membrana nuclear alrededor de la cromatina masculina y femenina, descondensadas, para reproducir el pronúcleo y durante su desarrollo ocurre formación de DNA y transcripción de RNA.

La fertilización marca el inicio de uno de los fenómenos más apasionantes de la biología: el proceso de embriogénesis, en el cual el cigote se desarrolla y se transforma en un nuevo individuo.

El metabolismo de la glucosa es vital para el desarrollo del oocito fertilizado, utiliza el piruvato como nutriente esencial hasta el estadio de ocho células después una glucosa y otras enzimas de la vía glucolítica³⁷.

Durante la espermatogénesis, el núcleo del espermatozoide es envuelto en distintas histonas y protaminas. La asociación del DNA con estos aminoácidos altamente básicos, se piensa, es la causa de la condensación y



represión de la actividad del DNA. Sakkas⁵² ha demostrado que paquetes de DNA pobres en cromatina o con daño contribuyen a falla de condensación del espermatozoide después de ICSI fracasando la fertilización.

La rigidez de la cabeza del espermatozoide de mamíferos necesaria para la penetración de la zona pelúcida, es debida a la extensiva cadena S-S de estas protaminas, las cuales son reguladas por zinc de la glándula prostática.

Cuando el espermatozoide ingresa al citoplasma del oocito, su envoltura nuclear se rompe, las protaminas son liberadas y ocurre la condesación de ambos pronúcleos. Esta descondensación no es específica de especies, ya que el pronúcleo del espermatozoide humano puede ser descondensado cuando ingresa a un oocito de anfibio.

La migración del pronúcleo masculino y femenino al centro del oocito, ha sido muy estudiada. Las pruebas de fluorescencia conjugada, para los elementos del citoesqueleto, han mostrado que en el ratón hay una área condensada de microfilamento debajo de la corteza de la región del cuerpo polar. Además, en los microtúbulos del huso hay 16 microtúbulos citoplasmáticos organizando el centriolo.

Después de la incorporación del esperma, las mitocondrias son desplazadas de la pieza de unión del esperma y el centriolo espermático es expuesto al citoplasma del oocito. Este evento es seguido por la formación de microtúbulos del aster, el cual es responsable de la unión de los pronúcleos masculino y femenino⁵³.

El oocito brinda mitocondrias, ARN, reserva glucoproteicas y metabólicas; el espermatozoide contribuye con el centrosoma y proteínas⁵⁴.

Referencias bibliográficas

General

1. Schawalman H, Doderlein G, Clinica Obstetrica Ginecológica -Tomo I. Edit Alhambra-Fertilization 27-39 - 1966.
2. Greger R, Windhorst U. Comprehensive Human Physiology: From cellular mechanism to integration - Fertilización 2265-2275 Edit Springer Verlag.
3. Albert B, Bray D, Lewis J et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. NY/London 3ª, edición Germ Cells and fertilization: 1011-1034, 1994.
4. Rosenfield A, Fathalla M. FIGO Manual de reproducción humana-OPS-FIGO: 77-85, 1994.

Citada

1. Guzmán AM y col. Sistema molecular en las interacciones celulares - Ginecol Obst Mex 1992; 60(11): 299-306.
2. Jeffay SC, Libbus BL. Acute exposure of female hamster to carbendanz during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation. Reprod Toxicology Division 1996; 183-9.
3. Kiss SA, Kiss I. Effect of magnesium ions on fertility, sex ratio and mutagenesis in Drosophila melanogaster males. Magnes Res 1995; 8(3): 243-7.
4. Kishi K, Kanamori S et al. Potential parameters of male reproductive toxicity: reproductive performance histopathology and sperm evaluation in SD rats given nitrazepan. J. Toxicol 3 ci 11995; 20(3): 329-39.
5. Horderr MM, Barnet SB. Diagnostic ultrasound in veterinary practice: How safe is it? Aust Vet J 1996; 73(1): 10-5.
6. Cameron JL. Stress and behaviorally induced reproductive dysfunction in primates. Semin. Reprod End 1997; 15(1):37-45
7. Bertello L. Oligoelementos en clínica III: el zinc. Rev Asoc Med 1993; 106 (2):27-31.
8. Huang LS et al. A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(20): 10903-7.
9. Vesel J, C Koss et al. Effects of impaired insulin secretion on the fertilization of mouse oocytes. Human reprod 1995; 180:3233-36.
10. Hiroi M. Elucidation of the mechanism of fertilization and clinical application of assisted reproductive technology. Nippon Sanka Fujinka G. Z. 1996; 48: 578-90.
11. Sutosjy P, Hewston L. Molecular medical approaches for alleviating infertility and understanding assisted reproductive technologies. Proc Assoc Am Physician 1996; 108:432-43.



12. Miller KF, Golberg JM, Falcone T. Follicle size and implantation of embryos from in vitro fertilization. *Obstet Gynecol* 1996; 13: 652-6.
13. Ketamura M, Matsumiya K et al. The fertilizing ability of human epididymal sperm. *J Assit Reprod Genet* 1996; 13: 652-6.
14. Avilees M, Jarber L, Castells MT. Modifications of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 1996; 44: 370-81.
15. Barros C, Crosby JA, Moreno RD. Early steps of sperm egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol Int* 1996; 144: 33-9.
16. Thaler CD, Cardullo RA. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is complex binding even. *J Biol Chem* 1996 20; 271 (38): 23289-97.
17. Maxwell VM, Stijanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev* 1996; 013-20.
18. Kodama H, Kuribayashy Y. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* 1996; 17 (2): 151-7.
19. Kodama H, Kuribayashy Y. Offer peroxidation. *J Androl* 1996.
20. Menkveld R, Rhenerev JP, et al. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology, and fertilization in vitro. *Fertil* 1996; 65: 637-44.
21. Coonrod SA, Hen JC. Inhibition of bovine fertilization in vitro by antibodies to SO-1010. *J Reprod Fertil* 1996; 107: 287-97.
22. Green CM, Cokle SM, et al. Fertilization promoting peptide, a tripeptide similar to ability of human spermatozoa in vitro. *Hum reprod.* 1996; 11 (4): 830-6.
23. Naz RK, Motre C et al. Hexokinase present in human sperm is not tyrosine phosphorylated but its antibodies effect fertilizing capacity. *J Androl* 1996; 17(2); 143-40.
24. Skiba Lahiani M, Auger J et al. Stimulation of movement and acrosome reaction of human spermatozoa by PC12 liposomes encapsulating ATP. *Int J Androl* 1995; 18(6): 287-94.
25. Cavver Ward JA, Jaroudi KA, et al. High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 1923-8.
26. Avilees M, Jarber L, Castells MT. Modification of the binding pattern in the rat zona pellucida after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 1996; 44: 370-81.
27. Roblerol, Guadarama A et al. Effect of cooper ion on the motility, viability, acrosoma reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 1996; 147: 871-74.
28. Barros C, Crosby JA, Moreno RD. Early steps of sperm - egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biol Int* 1996; 144: 33-9.
29. Guzman AM, Palomar M. Sistemas moleculares en las interacciones celulares I: fecundation en mamíferos. *Gine Obst Mex* 1992; 60(11): 299-306.
30. Spitzer D et al. Different proteins patterns derived from follicular of mature and immature human follicle. *Human Reprod* 1996; 11(4): 798-807.
31. Lowas DB, Santis M, Keefe T. A bridge to intracytoplasmic sperm injection -high inseminations human follicle. *Human Reprod* 1996; 11(4): 789-807.
32. Walker G, Burgess D, Kinsey WH. Fertilization promotes selective association of the Abi kinase with the egg cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 1996; 70: 165-71.
33. Laurinda A, Jafre L, Cross electrical regulation of sperm egg fusion. *Ann Rev Physical* 1996; 48: 191-200.
34. Muto A, Kime S et al. Calcium waves along the cleavage furrows in cleavage stage *Xenopus* embryos and its inhibition by heparin. *J Cell Biol* 1996; 135(1): 181-90.
35. Benn Yosef D, Orob N, Shalgi R. Intracellular pH of rat egg is not affected by fertilization and the resulting calcium oscillations. *Biol Reprod* 1996; 13: 461-8.
36. Lee SJ et al. The cyclic GMP mediated calcium release pathway in sea urchin eggs is not required for the rise in calcium during fertilization. *Dev Biol* 1996; 180: 324-25.
37. Hirol M. Elucidation of the mechanism of fertilization and clinical application of assisted reproductive technology. *Nippon Sanka Fujinka* 1996; 48: 578-90.



- 38 Deguchi R, Osanai K, Morisawa M. Extracellular calcio entry and calcio release from inositol 1, 4, 5 triphosphate of the manne bivelve *Mytilus edulis*.
- 39 Ben Yosef D et al. Intracellular pH of rat eggs is not affected by fertilization and the resulting calcium oscillaations. *Biol Reprod* 1996; 13: 461-8.
- 40 Phillips KP, Balts JM. Intracellular pH change does not accompany egg activation in the mouse. *Mol Reprod Dev* 1995; 147: 54-60.
- 41 Ducibella T, Lefevre L. Study of protein kinase C. Antagonists on cortical granule exocytosis cell-cycle resumption in fertilized mouse eggs. 1997; 46: 216-26.
- 42 Moss J, Kopf GS. Cycloheximide, induced activation of mouse eggs: effects on *cdc2/cyclin B*. *J Cell Sci* 1996; 109: 739-48.
- 43 Tesarik J, Rolet F. Spermatid injection into human oocytes II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 780-3
- 44 Lewin A, Weiss DB et al. Delivery following intracytoplasmic injection of mature sperm cells recovered by testicular fine needle aspiration in a case of hypergonadotropic. *Hum Reprdo* 1996; 11: 769-71.
- 45 Goto K, Kinoshita A. Blastocist formation following intracyttoplasmic injection of in vitro derived spermatides into bovine oocytes. *Human Reprod* 1996; 11:
- 46 Avilees et al. Modification of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vitro fertilization. *Mol Reprod Rev* 1996; 44: 370-81.
- 47 Schakoff ME, Powers RD. An ultraestructural analysis of on oocyte from an in vitro fertilization patient with repeated poliespermic fertilization. *J Assist Reprod Genec* 1996; 13: 477-84.
- 48 Quill TA, Hedrik JL. The fertilization layer mediated block to polyspermy in *Xenopus laevis*. *Arch Biophys* 1996; 333: 326-32.
- 49 Raz T, Skutelsky E, Shalgi R. Post fertilizationchange in the zona pellucida glycoproteins of rats eggs. *Histochem Cell Biol* 1996; 180: 395-403.
- 50 Togo T, Morisawa M. Aminopeptidase like protease released from oocytes effects oocytes surfaces of polysperm block oocytes os the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Biol* 1997; 147: 219-27.
- 51 Hicocha A, Shatten G. Propanolol induces polysperm during sea urchin fertilization. *Mol Reprod Rev* 1996; 180: 387-91.
- 52 Sakkas D, Urner F et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1996; 11: 387+-91.
- 53 Sutovsky P, Navara CS. Fate of the sperm mitochondria and the incorporation, conversion and disassembly of the sperm tail structure during bovine fertilization. *Biol reprod* 1996; 13: 1995-205.
- 54 Thibault C. Fertilization in mammals, *Contracep fertil Sex* 1996; 24: 519-25.