

# Determinación del efecto de la temperatura en la reacción acrosomal espontánea en muestras seminales previas a procedimientos de reproducción asistida

Paloma Neri Vidaurre, <sup>1</sup> Víctor Torres Flores, <sup>2</sup> Alberto Vielma Valdez, <sup>1</sup> Ranferi Gaona Arreola<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Antecedentes:** la capacitación espermática es un proceso dependiente del calcio y se relaciona con una cascada de cambios bioquímicos. El espermatozoide, ya capacitado, puede responder a los receptores de la zona pelúcida e incrementar aún más la concentración de calcio intracelular y con altas concentraciones de progesterona en el aparato genital femenino se induce la reacción acrosomal.

**Objetivo:** determinar el efecto de la temperatura de incubación en la reacción acrosomal espontánea en muestras seminales capacitadas previas a procedimientos de reproducción asistida.

**Material y método:** estudio prospectivo con muestras de semen obtenidas de 10 pacientes normoespermáticos con tres a seis días de abstinencia sexual; se usó el marcador óptico fluorescente fura ff-AM que permite detectar el incremento de calcio intracelular. Cada muestra se dividió en dos fracciones iguales: muestras capacitadas incubadas a temperatura ambiente (25°C) y muestras capacitadas incubadas a 37°C.

**Resultados:** no hubo diferencia significativa en la tasa de reacción acrosomal espontánea entre muestras seminales capacitadas mantenidas a temperatura ambiente y las incubadas a 37°C, aun después de cuatro horas de la capacitación; sin embargo, la reacción acrosomal espontánea tendió levemente a ser mayor en muestras incubadas a 37°C, porque después de la adición de progesterona, el influjo de calcio fue menor.

**Conclusiones:** si bien la temperatura es importante para la capacitación espermática, no lo es para la reacción acrosomal, de manera que los espermatozoides mantenidos a 25°C tienen la misma probabilidad de realizar una reacción acrosomal que los incubados a 37°C.

**Palabras clave:** reacción acrosomal espontánea, temperatura, muestras seminales, reproducción asistida.

## ABSTRACT

**Background:** Sperm capacitation is a calcium dependent-process and is related to a cascade of biochemical changes. Capacitated sperm may respond to receptors of zona pellucida and increase even more the intracellular calcium level and with high levels of progesterone in the female genital tract acrosomal reaction is induced.

**Objective:** To determine the effect of incubation temperature on the spontaneous acrosomal reaction in capacitated seminal samples before assisted reproduction procedures.

**Material and method:** A prospective study was done with semen samples obtained from 10 normosperm patients with three to six days of sexual abstinence; fura ff-AM fluorescent optical marker was used, which is able to detect the increased intracellular calcium. Each sample was divided into two equal fractions: capacitated samples incubated at environment temperature (25°C) and capacitated samples incubated at 37°C.

**Results:** There was no significant difference in the spontaneous acrosomal reaction rate between capacitated seminal samples maintained at environment temperature and those incubated at 37°C, even after four hours of capacitation; however, spontaneous acrosomal reaction tended slightly to be higher in samples incubated at 37°C, because after progesterone addition, calcium influx was lower.

**Conclusions:** Even though temperature is important for sperm capacitation, it is not for acrosomal reaction; thus sperm maintained at 25°C have the same probability to do an acrosomal reaction than those incubated at 37°C.

**Key words:** spontaneous acrosomal reaction, temperature, seminal samples, assisted reproduction.

Recibido: junio 2013.

Aceptado: agosto 2013.

Este artículo debe citarse como: Neri-Vidaurre P, Torres-Flores V, Vielma-Valdez A, Gaona-Arreola R. Determinación del efecto de la temperatura en la reacción acrosomal espontánea en muestras seminales previas a procedimientos de reproducción asistida. Reproducción (Méjico) 2013;6:97-103.

<sup>1</sup> Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana, Hospital Ángeles México, México, DF.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF.

Correspondencia: Centro de Reproducción CEERH. Agrarismo 208, primer piso, Torre A, colonia Escandón, CP 11800, México, DF. Correo electrónico: aemm50@ceerh.com.mx

**E**n el espermatozoide humano, la modulación de la concentración del calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es fundamental para entender los mecanismos implicados en la fisiología del espermatozoide, como la capacitación espermática y la reacción acrosomal.<sup>1</sup>

La capacitación espermática es un proceso dependiente del calcio y está relacionado con una cascada de cambios bioquímicos: incremento en el contenido de AMPc (adenosin-monofosfato-cíclico), consecuente activación de la proteína cinasa A (PKA) e incremento de la actividad de la proteína tirosina cinasa (PTK). Durante el proceso también hay una pequeña, pero consistente alcalinización del pH intracelular de ~0.14 unidades y elevación de la concentración de calcio intracelular (Figura 1).<sup>2,3</sup>

Una vez capacitado el espermatozoide, es capaz de responder a los receptores de la ZP3 (zona pelúcida) e incrementar aún más la concentración de calcio intracelular y con altas concentraciones de progesterona en el aparato genital femenino, consecuentemente se induce la reacción acrosomal; proceso que permite al espermatozoide cruzar la zona pelúcida, fusionarse con el oolema del ovocito y liberar su contenido al citoplasma; las mitocondrias y el flagelo serán degradados, mientras que el resto de los componentes tendrán una importante función en la concepción (Figura 2).<sup>2,4</sup>

La capacitación espermática se realiza *in vitro*, bajo protocolos establecidos, que incluyen la incubación de los espermatozoides capacitados a temperatura corporal, previa a los procedimientos de reproducción asistida. Diferentes estudios demuestran que la temperatura de incubación en muestras capacitadas tiene un efecto modulador en la movilidad espermática y en la reacción acrosomal espontánea,<sup>6-10</sup> que ocurre en el hámster entre 30 y 60%, en ratones en 30 a 35%<sup>10,11</sup> y en 20 a 25% en humanos.<sup>12</sup>

Una reacción acrosomal prematura en espermatozoides capacitados compromete su capacidad para reconocer la zona pelúcida con pérdida de su movilidad y viabilidad y, por tanto, de fertilización. Sin embargo, el efecto de la temperatura de incubación en la reacción acrosomal espontánea en espermatozoides humanos capacitados está poco estudiado desde el punto de vista de la modulación de la concentración del calcio intracelular.

Se sabe que en los mecanismos de entrada de calcio ( $Ca^{2+}$ ) inducidos por la zona pelúcida se produce un flujo iónico que provoca una despolarización y un pico de calcio en milisegundos en espermatozoides capacitados y, consecuentemente, en la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje tipo T (CCDV-T).<sup>12-14</sup>

Estos canales se detectaron en espermatozoides incubados con el marcador óptico fura 2, en los que se observó un incremento en el calcio intracelular inducido por la despolarización con potasio.<sup>15</sup> Estos canales se inactivan en 90 segundos en un medio sin calcio,<sup>15</sup> se estimulan al alcalinizar el pH intracelular<sup>16</sup> y durante la capacitación espermática.<sup>17</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

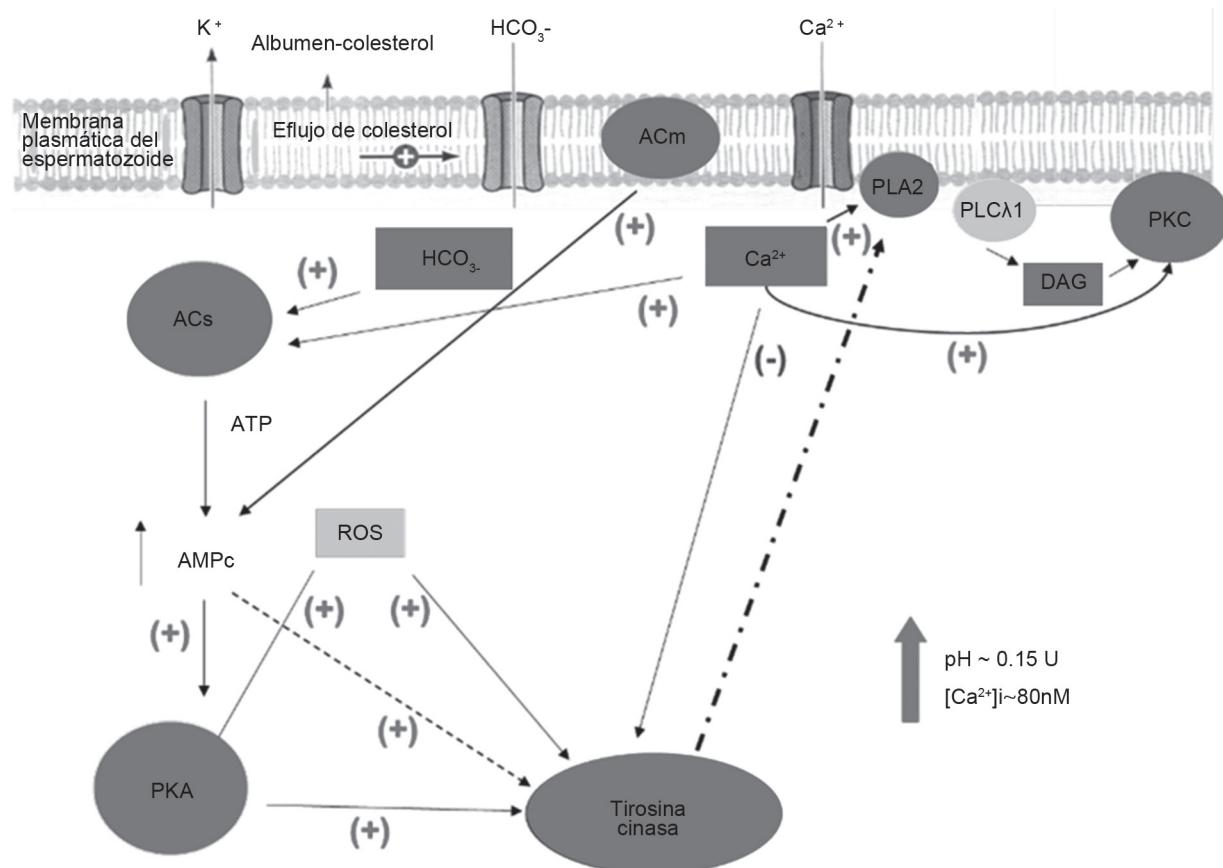
Estudio prospectivo con muestras de semen de 10 pacientes normoespérnicos con tres a seis días de abstinencia sexual, obtenidas, bajo consentimiento informado, en el Centro Especializado en Esterilidad y Reproducción Humana del Hospital Ángeles en la Ciudad de México.

Se utilizó el marcador óptico fluorescente fura ff-AM, que permite detectar el incremento de calcio intracelular y reactivos de Sigma-Aldrich; se usó un medio para esperma humano con buffer de Hepes (H-HSM), diseñado por Suárez y colaboradores.<sup>4</sup>

### Purificación de las muestras, carga con el marcador fluorescente y capacitación

La obtención de espermatozoides se realizó por medio de la técnica de Percoll (75/50% en 150 mM NaCl+10 mM Hepes pH 7.4, H-HSM), de acuerdo con Suárez y colaboradores,<sup>4</sup> con algunas modificaciones establecidas en el laboratorio de biomembranas del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM.<sup>18,19</sup> Cada muestra se dividió en dos fracciones iguales: *a*) muestras capacitadas incubadas a temperatura ambiente (25°C) y *b*) muestras capacitadas incubadas a 37°C. Para cada grupo se realizaron tres mediciones: basal (control), dos horas poscapacitación y cuatro horas poscapacitación.

Para las mediciones del calcio intracelular, las muestras se incubaron con 5  $\mu$ M de fura ff en 1 mL de medio H-HSM, a temperatura ambiente y a 37°C durante 40



**Figura 1.** En la capacitación espermática inicialmente existe un eflujo de colesterol de la membrana plasmática en presencia de albúmina que permite la entrada de calcio y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que estimula la adelinato ciclase soluble elevando las concentraciones de ATP, mismas que por medio de fosfodiesterasas aumentan las concentraciones de AMP cíclico que a su vez estimulan a una proteína cinasa A, y ésta, a una proteína tiroamina cinasa. Modificada de la referencia 2.

minutos. Las muestras se lavaron por centrifugación y el botón celular se resuspendió con 3 mL de medio H-HSM, a temperatura ambiente y a 37°C para cada grupo, respectivamente.

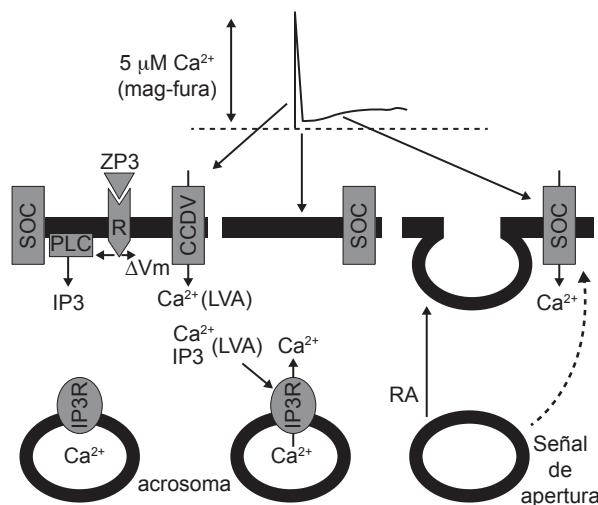
Para medir el pH intracelular, los espermatozoides ya cargados con fura ff también se cargaron con 1 μM BCECF-AM durante 30 minutos, adicionado junto con fura ff-AM 10 minutos antes de terminar el tiempo de incubación.

**Estudio del influjo de calcio dependiente del voltaje**  
Las muestras incubadas con fura ff se colocaron en una celdilla óptica, en donde las condiciones de temperatura se mantuvieron de la misma manera: a temperatura ambiente

y a 37°C. Bajo constante agitación magnética y un minuto después de iniciado el registro de fluorescencia, 4 μM de progesterona, concentración similar a la encontrada en las células del cúmulo, fueron adicionados y el registro se observó durante más de un minuto; esto se realizó en ambas condiciones de temperatura, excepto el control.

La fluorescencia se midió en un fluorómetro PTI (Photon Technology International), con un filtro de interferencia óptica de 488 nm, excitándose alternativamente a 340 y 380 nm. La diferencia de estos intervalos se convirtió a concentración de calcio intracelular, usando la ecuación de Grynkiewicz,<sup>20</sup> con una Kd=5.5 μM.

Asimismo, la fluorescencia de los espermatozoides cargados con BCECF se detectó a 550 nm, excitándose



**Figura 2.** Modelo de los mecanismos de movilización de calcio que se propone dispara la zona pelúcida durante la reacción acrosomal. La zona pelúcida produce un incremento de calcio debido a dos fenómenos en paralelo: uno rápido, que activa un receptor que produce la despolarización de la membrana ( $\Delta V_m$ ), que abre los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T ( $Ca^{2+}_{LVA}$ ), elevando transitoriamente la concentración de calcio intracelular. Al mismo tiempo, la zona pelúcida se une a un receptor acoplado a la proteína Gq, vía PLC, produciendo inositol trifosfato. Éste, junto con el calcio elevado, producto de la activación del canal T, activan los receptores a inositol trifosfato (IP3R) de la membrana del acrosoma, vaciando su contenido de calcio al citosol. Consecuentemente, se activan los canales operados por depósitos intracelulares de calcio en la membrana plasmática, produciendo una entrada secundaria y sostenida de calcio intracelular, con lo que realiza la reacción acrosomal Modificada de la referencia 5.

alternadamente entre 500 y 439 nm. Los radios 500/439 se analizaron con el programa Felix del PTI para convertir los valores obtenidos a valores de pH.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar y se analizaron con prueba t de Student. Valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

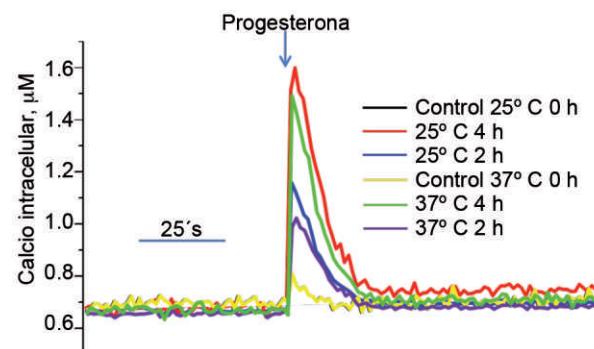
#### RESULTADOS

El efecto de la temperatura en la concentración de calcio intracelular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje en espermatocitos poscapacitados incubados

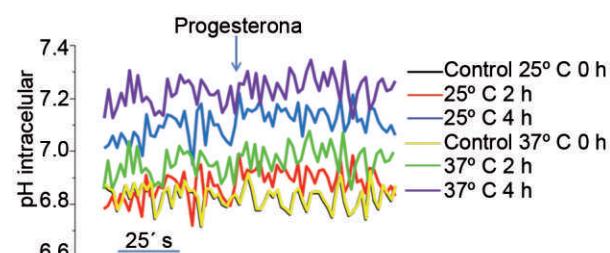
a 25 y 37°C, a cero, dos y cuatro horas, estimulados con 4  $\mu M$  de progesterona se muestra en la Figura 3.

Los espermatocitos poscapacitados incubados a 25°C tuvieron un ligero aumento, aunque estadísticamente no significativo, en el influjo de la concentración de calcio intracelular, en comparación con los espermatocitos incubados a 37°C; esta condición se mantuvo en los registros realizados a las dos horas ( $1.02 \pm 0.9$  vs  $1.15 \pm 0.88$ ) y a las cuatro horas ( $1.5 \pm 1.1$  vs  $1.6 \pm 0.85$ ) poscapacitación. Sólo se realizó un registro inicial (control) para ambas condiciones.

Debido a que los canales de calcio son muy sensibles al pH intracelular durante la reacción acrosomal, éste se valoró en cada condición. Se observó (Figura 4) que la adición de progesterona eleva el pH intracelular en



**Figura 3.** Incremento de calcio inducido con progesterona en espermatocitos humanos. Los espermatocitos se incubaron durante dos y cuatro horas poscapacitación a temperatura ambiente (25°C) y a 37°C. Los registros son representativos de 10 muestras diferentes de semen.

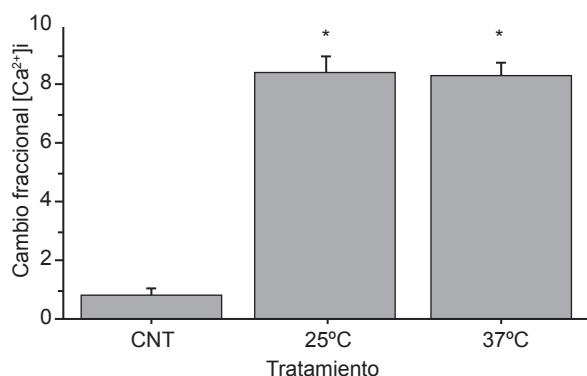


**Figura 4.** Efecto de la temperatura en el pH intracelular en espermatocitos humanos. Los espermatocitos humanos se incubaron a 25 y a 37°C, dos y cuatro horas poscapacitación y después de dos minutos de iniciado el registro se estimularon con 4  $\mu M$  de progesterona.

muestras poscapacitadas incubadas dos horas a 25°C, de 6.85 a 6.90, y a las cuatro horas, de 7.9 a 7.13. A 37°C de 6.93 a 6.99 a dos horas y a cuatro horas de 7.9 a 7.24. Si bien las diferencias tampoco son estadísticamente significativas, señalan que conforme aumenta el tiempo, mayor es el valor del pH intracelular obtenido, ya sea a 25 o a 37°C. Es decir, al incrementarse el tiempo de incubación, cada vez más espermatozoides podrían realizar reacción acrosomal espontánea, por lo que se alcaliniza más el medio, pero no en el control.

En términos estadísticos, al normalizar el control, la incubación a temperatura ambiente (25°C) promueve de manera eficiente los mecanismos celulares implicados en la capacitación espermática y en la concentración de calcio intracelular, con similitud a los espermatozoides incubados a 37°C ( $8.3 \pm 0.4$  vs  $8.4 \pm 0.5$ ); esto es, cuatro horas poscapacitación (Figura 5).

Si estos tratamientos se comparan con el control, esto es, el registro inmediatamente al salir la muestra de capacitar, sí se observan diferencias significativas en la concentración de calcio intracelular, lo que confirma que a medida que aumenta el tiempo de incubación de una muestra poscapacitada, independientemente de la temperatura a la que se mantenga, habrá un influjo mayor de calcio.



**Figura 5.** Cambio fraccional de la concentración de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  inducido con progesterona en espermatozoides humanos. Espermatozoides no capacitados (CNT) y capacitados durante cuatro horas a temperatura ambiente (25°C) y a 37°C, donde el valor del control es de  $0.81 \mu M = 1$ . Podemos observar que el incremento en los incubados a 25°C, en comparación con el control, fue de 8.4 veces, mientras que en los incubados a 37°C fue de 8.3 veces. \* $p < 0.05$ ,  $n=10$ .

## DISCUSIÓN

La movilidad espermática en muestras capacitadas es significativamente dependiente de la temperatura de incubación. Con el sistema CASA se encontró que los espermatozoides incubados cuatro horas a 20°C fueron incapaces de tener hiperactivación y mostraron diferentes parámetros de movilidad cuando se compararon con espermatozoides capacitados a 37°C;<sup>21</sup> sin embargo, hay que recordar que la capacitación espermática es un proceso reversible que se realiza durante un periodo largo (una a cuatro horas), en donde las muestras pueden ser lavadas con medio de cultivo nuevo o simplemente incrementar la temperatura de incubación para aumentar la movilidad nuevamente. Por el contrario, la reacción acrosomal es un proceso irreversible y rápido (segundos), en el que el espermatozoide puede perder totalmente su movilidad y viabilidad.

De lo anterior surge la inquietud de hacer este estudio, porque hay veces que por cuestiones ajenas, en procedimientos de reproducción asistida (por ejemplo, inseminación intrauterina), ésta se retrasa y se realiza incluso cinco horas después de la capacitación, lo que hace cuestionarnos si la incubación de la muestra seminal a 37°C aumenta o no la tasa de reacción acrosomal espontánea reduciendo con ello la posibilidad de la unión óvulo-espermatozoide.

En la bibliografía existen muy pocos estudios que describen el efecto de la temperatura en la reacción acrosomal espontánea medida desde el punto de vista de la modulación de las concentraciones de calcio intracelular.<sup>22</sup>

Los resultados comunicados en este estudio muestran que no existe diferencia significativa en la tasa de reacción acrosomal espontánea entre muestras seminales capacitadas mantenidas a temperatura ambiente y muestras capacitadas incubadas a 37°C, aun después de cuatro horas poscapacitación. Sin embargo, hay una ligera tendencia a ser mayor en muestras incubadas a 37°C, porque después de la adición de progesterona, el influjo de calcio es menor; es decir, hubo una población de espermatozoides que llevaron a cabo la reacción acrosomal espontánea y los restantes la realizaron después de la inducción con esta hormona.

Lo anterior se ejemplifica muy bien en el efecto en el pH intracelular, porque los espermatozoides capacitados incubados a 37°C registraron mayor alcalinización –dada por la liberación de calcio intracelular por la reacción acrosomal espontánea– que los espermatozoides mantenidos a temperatura ambiente.

Tocanne y colaboradores<sup>23</sup> en 1989 mencionaron que se requiere la temperatura de incubación adecuada para la expresión de la capacidad de fertilización de los espermatozoides humanos *in vitro*; sin embargo, al estudiar de manera indirecta la reacción acrosomal espontánea por inducción de progesterona, demostramos que a 25°C hay un influjo de calcio similar al que se observa cuando se capacitan los espermatozoides a 36°C (Figura 1).

Lo anterior nos lleva a discutir que si bien la temperatura es importante para la capacitación espermática, no lo es para la reacción acrosomal, de manera que los espermatozoides mantenidos a 25°C tendrán la misma probabilidad de realizar una reacción acrosomal que los incubados a 37°C. Sin embargo, Green<sup>24</sup> demostró en 1999 una diferencia significativa de reacción acrosomal espontánea entre espermatozoides hiperactivados y espermatozoides no hiperactivados sugiriendo que los espermatozoides hiperactivados son más propensos a realizar reacción acrosomal espontánea que los no hiperactivados. De acuerdo con nuestros resultados, si tenemos en cuenta que los espermatozoides incubados a 37°C tienen mayor movilidad que los mantenidos a 25°C, los hallazgos fueron similares, pero nosotros no encontramos diferencia significativa.

Los hallazgos de este estudio también son similares a los reportados por Marín-Briggiler y su grupo,<sup>21</sup> quienes reportaron que a 20°C los espermatozoides tenían bajos porcentajes de reacción acrosomal espontánea. De manera que las muestras podrían ser transportadas y mantenidas a esta temperatura en inseminaciones retrasadas, así como en reinseminaciones. Asimismo, sugieren que esta incubación a 20°C también puede beneficiar a los pacientes con factores capacitantes rápidos, cuyos espermatozoides se distinguen por capacitarse rápidamente.

Harper,<sup>22</sup> al estudiar el proceso de exocitosis *in vivo*, propuso que la reacción acrosomal espontánea se asocia con muerte celular o es un mecanismo selectivo en los espermatozoides humanos para quitar los de mala calidad.

Por tanto, en los humanos, el proceso de fertilización es exclusivo de los espermatozoides que alcanzan el ovocito con su acrosoma intacto para realizar la reacción acrosomal en la superficie de la zona pelúcida.

## CONCLUSIÓN

Las muestras poscapacitadas pueden mantenerse a temperatura ambiente (25°C) o a 37°C.

## REFERENCIAS

- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, et al. Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 2005;243:79-172.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* 2002;53:121-131.
- 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.
- Suarez SS, Wolf DP, Meizel S. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 1986;14:107-121.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, et al. Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2001;11:1571-1584.
- Mahi CA, Yanagimachi R. The effect of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and the acrosome reaction of Golden hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1973;35:55-66.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, et al. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol Reprod* 1983;29:173-179.
- Fleming AD, Kuehl TJ. Effects of temperature upon capacitation of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 1985;233:405-411.
- Si Y. Temperature-dependent hyperactivated movement of hamster spermatozoa. *Biol Reprod* 1997;57:1407-1412.
- White DR, Phillips DM, Bedford JM. Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990;90:71-80.
- Yanagimachi R. *In vitro* acrosome reaction and capacitation of Golden hamster sperm by bovine follicular fluid and its fractions. *J Exp Zool* 1969;170:269-280.
- Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR, Tanaka S. The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated *in vitro*. *Hum Reprod* 1989;4:57-62.
- Santi CM, Darszon A, Hernández-Cruz A. A dihydropyridine-sensitive T-type Ca<sup>2+</sup> current is the main Ca<sup>2+</sup> current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* 1996;271:1583-1593.

14. Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13004-13009.
15. Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, et al. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6757-6762.
16. Linares-Hernández L, Guzmán-Grenfell AM, Hicks-Gómez JJ, González-Martínez MT. Voltage dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 1998;1372:1-12.
17. Fraire-Zamora JJ, González-Martínez MT. Effect of intracellular pH on the depolarization-evoked calcium influx in human sperm. *Am J Physiol* 2004;287:1688-1696.
18. Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Hernández-Rueda Y, Darszon A, et al. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod* 2011;26:2626-2635.
19. González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA, Guzmán-Grenfell AM. Stimulation of voltage dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Arch Biochem Biophys* 2002;408:205-210.
20. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* 1985. 260:3440-3450.
21. Marín-Briggiler CI, Tezón JG, Miranda PV, Vázquez-Levin MH. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril* 2002;77:252-259.
22. Harper C, Cummesson JA, White MRH, Publicover S, et al. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci* 2008;121:2130-2135.
23. Tocanne JF, Dupou-Cézanne L, López A, Tournier JF. Lipid lateral diffusion and membrane organization. *FEBS Lett* 1989;257:10-16.
24. Green S, Fishel S, Rowe P. The incidence of spontaneous acrosome reaction in homogeneous populations of hyperactivated human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;7:1819-1822.