

# Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos

Sebastián Cánovas,\* Pilar Coy\*

\*Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, España.

## **Molecular features of fertilization: gamete binding and fusion**

### **ABSTRACT**

*Fertilization is a complex and fascinating biological process. The interactions between gametes transform two differentiated cells on a totipotent zygote. A few cell surface proteins in both gametes have been identified as essential for binding and fusion of gametes. At the zona pellucida level the binding is initiated by species-restricted binding of the sperm to the zona pellucida and is facilitated by the protein SED1 and/or by the binding of sperm surface beta1/4-galactosyltransferase I (GalT-I) to glycoside chains of the ZP3. This binding triggers the acrosome reaction. Among the molecules that participate on binding and fusion of gametes are included disintegrins on the sperm (ADAM1 and ADAM2) which interact with integrins ( $\alpha 6/\beta 1$ , CD9, GPI-protein) in the egg plasma membrane, while cysteine-rich secretory proteins (CRISP) and the proteins named as Izumo participate in the fusion. The knowledge of the molecules and mechanisms involved in these processes will allow us not only a better understanding of the events underlying mammalian sperm-egg interaction, but also the development of new methods for both fertility regulation and diagnosis and clinic treatment of human and animal infertility.*

**Key words.** Fertilization. Spermatozoa. Oocyte. Acrosome reaction. Fertility.

### **INTRODUCCIÓN**

La fecundación es uno de los procesos biológicos descritos más fascinantes y a la vez más complejos. Comienza con el transporte de gametos en el tracto reproductor y concluye con la formación de los pronúcleos y la singamia de los mismos, para dar paso al desarrollo embrionario. Esta interacción entre células altamente especializadas proporciona un ejem-

### **RESUMEN**

La fecundación es un complejo y fascinante proceso biológico. Las interacciones entre gametos transforman dos células diferenciadas en un cigoto totipotente. Diferentes proteínas de la superficie celular de ambos gametos han sido identificadas por su participación en la unión y fusión de gametos. La interacción se inicia con la adhesión del espermatozoide a la zona pelúcida. Esta unión presenta restricciones según las especies y es mediada por la proteína *SED1* y/o la unión de la galactosiltransferasa (*GalT-I*) a las cadenas de glúcidos de la zona pelúcida (*ZP3*), desencadenando la reacción acrosómica. Entre las moléculas que participan en la unión y fusión de gametos se incluyen las desintegrinas del espermatozoide (*ADAM1* y *ADAM2*), las cuales interactúan con las integrinas ( $\alpha 6/\beta 1$ , *CD9* o proteínas ancladas a *GPI*) del oolema, mientras que en la fusión participan las proteínas secretoras ricas en cisteína (*CRISP*) y las proteínas *Izumo*. El conocimiento de las moléculas y los mecanismos implicados en estos procesos nos permitirá un mejor entendimiento de las interacciones espermatozoide-ovocito, y el desarrollo de nuevos métodos, tanto para la regulación de la fertilidad, como para el diagnóstico y tratamiento clínico de los problemas de infertilidad en mamíferos, incluida la especie humana.

**Palabras clave.** Fecundación. Espermatozoide. Ovocito. Reacción acrosómica. Fertilidad.

plo único de numerosos procesos celulares, que convierte dos células totalmente diferenciadas en un cigoto totipotente.<sup>1</sup>

Además, la interacción espermatozoide-ovocito es el fundamento de un gran número de ensayos de funcionalidad espermática utilizados a nivel clínico en la especie humana y en especies animales, cuyo objetivo es predecir el éxito de la fecundación, por lo que un mayor conocimiento de los mismos supondrá me-

jas en su aplicación en las clínicas y laboratorios de reproducción asistida. Teniendo en cuenta que los problemas de fertilidad afectan a una gran proporción de parejas (entre 10 y 20% de la población mundial),<sup>2,3</sup> el número de potenciales pacientes sometidos a tratamientos de fertilidad y que se pueden beneficiar de los avances producidos en este campo oscila entre 40 y 80 millones de personas.<sup>2</sup>

En esta revisión repasaremos los mecanismos de interacción del espermatozoide con la zona pelúcida, el proceso de reacción acrosómica, y la unión y fusión propiamente dicha de los gametos con el objetivo de que sirva de referente para una mejor comprensión y actualización de los conocimientos sobre los mecanismos de interacción ovocito-espermatozoide. Sin embargo, no se tratará el proceso de capacitación y el paso a través del *cumulus oophorus*, que consideramos anteriores a la interacción entre gametos, en sentido estricto.

Desde el año 1951 se conoce que para que los espermatozoides de mamífero puedan fecundar deben sufrir el proceso de capacitación,<sup>4,5</sup> durante el cual se producen cambios bioquímicos en la membrana plasmática<sup>6</sup> que dan lugar a una remodelación de las moléculas de la superficie celular, permitiendo al espermatozoide responder al estímulo provocado por los ligandos de la zona pelúcida (ZP) y sufrir la reacción acrosómica (RA). Sin embargo, aún no se conocen con exactitud todos los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso.

*In vivo*, los espermatozoides capacitados que alcanzan la porción ampular del oviducto deben contactar con las células del *cumulus oophorus* (CO) que rodean al ovocito. Inicialmente se propuso que el CO, formado por las células de la granulosa y una matriz de ácido hialurónico, podía ser atravesado gracias a la motilidad espermática y la presencia de la proteína PH-20.<sup>7</sup> Posteriormente se demostró la existencia de la proteína *Hyal5* con actividad hialuronidasa que permitiría la penetración a través del CO mediante la digestión de la matriz de ácido hialurónico, cuestionándose la función de la proteína PH-20.<sup>8</sup>

Una vez superadas las células del CO, el espermatozoide interacciona con el ovocito. Este proceso de interacción se produce a tres niveles: la ZP, que induce la exocitosis del contenido acrosomal; la membrana plasmática del ovocito, con la que se fusiona y finalmente el citoplasma, donde se produce la descondensación del núcleo espermático.

## UNIÓN ESPERMATOZOIDE-ZONA PELÚCIDA

Aunque clásicamente la interacción entre espermatozoide y ZP se ha considerado como uno de los

principales responsables del bloqueo de la fecundación interespecífica,<sup>9,10</sup> actualmente se sabe que dicha interacción presenta restricciones por especie, pero no es específica en sentido estricto.<sup>11</sup> Numerosos estudios han evidenciado que la unión del espermatozoide a la ZP es un proceso mediado por carbohidratos,<sup>12-14</sup> pero los oligosacáridos precisos a los que se une el espermatozoide permanecen bajo debate y pueden variar según la especie.

La ZP está formada por un número variable, según la especie, de glicoproteínas denominadas de forma genérica ZP1, ZP2 y ZP3, habiéndose descrito la ZP4 en la especie humana,<sup>15</sup> en rata<sup>10</sup> y en hámster (*Genbank bankit821091, DQ838550*).<sup>16</sup> Sus principales funciones son la unión del espermatozoide, prevención de la polispermia, protección del embrión hasta la implantación y el bloqueo de la fecundación heteroespecífica.<sup>17-19</sup> Sin embargo, existen referencias que demuestran que no siempre esa especificidad funciona de forma estricta.<sup>20,21</sup>

## Modelos de unión espermatozoide-ZP

A pesar de las numerosas investigaciones llevadas a cabo, no existe un único modelo de unión espermatozoide-ZP globalmente aceptado para los mamíferos.<sup>22,23</sup> Mientras que en el ratón, se asume que los oligosacáridos de la ZP3 (ZPC) son los responsables de la unión del espermatozoide, en otros animales como el cerdo y la vaca hay evidencias de que la ZP3 $\alpha$  o ZP4 (ZPB), se unen al espermatozoide.<sup>24</sup>

Los modelos que postulan la participación de determinados glúcidos del tipo O-unidos y N-unidos como receptores espermáticos, implican a las glucosidasas de los gránulos corticales como responsables de la eliminación de esos glúcidos tras la fecundación. En ratón, se ha propuesto que los espermatozoides se unen a glúcidos del tipo O-unidos de la ZP3 y que éstos son eliminados después de la fecundación.<sup>25</sup> Sin embargo, otros estudios evidencian el papel de las cadenas de oligosacáridos N-unidos en la unión del espermatozoide en ganado bovino y porcino.<sup>24,26</sup> En la especie bovina se ha descrito la participación de residuos de manosa<sup>27</sup> y la implicación del ácido siálico, tal y como demostró recientemente nuestro grupo.<sup>28</sup>

Actualmente se cuestionan los modelos descritos en la especie murina que proponen a los oligosacáridos como responsables de la unión del espermatozoide a la ZP, proponiéndose que la función de los oligosacáridos en el proceso de unión espermatozoide-ZP quedaría restringida al establecimiento de la especificidad de especie.<sup>29</sup>

El modelo descrito por el grupo del Dr. Dean propone que es la estructura supramolecular de las proteínas la que determina la unión del espermatozoide a la ZP, la cual es modificada por una proteasa liberada desde los gránulos corticales. El mencionado modelo se propuso a raíz de los resultados obtenidos utilizando animales transgénicos, en los que se habían introducido los genes de ZP2 y ZP3 humana ZP2h y ZP3h y que formaron una zona pelúcida con ZP1 de ratón con una morfología normal.<sup>22</sup> Según este modelo, la ZP formada por ZP2 y ZP3 con una disposición tridimensional específica, sería responsable de la unión del espermatozoide. Tras la unión de un espermatozoide y la extrusión de los gránulos corticales, se produciría una modificación de la ZP2 que ocasionaría un cambio de la conformación espacial, impidiendo que se puedan unir más espermatozoides. En este modelo, aunque no se descarta la participación de los carbohidratos, no sería necesaria su modificación tras la fecundación.

### Receptores del espermatozoide que se unen a la ZP

Se han estudiado un gran número de receptores espermáticos para proteínas de la zona pelúcida. En el ratón se ha demostrado la existencia de una molécula denominada *sp56* con afinidad por las cadenas de oligosacáridos de la ZP. Además se han descrito otras moléculas denominadas zona adhesinas, proacrosina, *sp38*, *P47*, *IAM38* y un grupo de proteínas llamadas espermadhesinas involucradas en la unión primaria y secundaria a la ZP, aunque los ligandos de zona específicos para este grupo de moléculas no se conocen.<sup>30,31</sup>

A nivel del espermatozoide una de las moléculas más estudiadas como receptor de los ligandos de la ZP ha sido la  $\beta$ -1,4 Galactosiltransferasa (GalT-I). GalT-I, como molécula de la membrana plasmática, puede actuar como un receptor específico de glicoproteínas incluyendo la ZP3.<sup>25,32</sup>

Todos los ligandos conocidos para GalT-I tienen residuos terminales N-acetilglucosamina. Sin embargo, esto no es suficiente para que una glicoproteína se una como ligando. Por ejemplo, ZP1 y ZP2 tienen residuos N-acetilglucosamina como terminales no reducidos, pero no son ligandos para la GalT-I.<sup>25</sup>

La importancia biológica de la GalT-I y la adhesión a la ZP3 ha sido comprobada mediante ensayos *in vitro*. En experimentos utilizando ZP solubilizada se comprobó que ésta inhibe la actividad del enzima N-acetilglucosaminidasa, sugiriendo que la

ZP es reconocida por este enzima.<sup>33</sup> Cuando los residuos N-acetilglucosamina son bloqueados o eliminados de la ZP3 solubilizada, ésta pierde su capacidad para unir espermatozoides.<sup>25</sup> Estos resultados sugieren que la interacción entre GalT-I y ZP3 es necesaria para la unión entre gametos. Sin embargo, parece no ser totalmente imprescindible, al haberse demostrado que espermatozoides procedentes de ratones transgénicos sin GalT-I podían unirse a la ZP aunque el número de espermatozoides unidos fue menor. Por ello, se sugiere que en la ZP de ovocitos ovulados existe otro ligando independiente de GalT-I que permite la unión del espermatozoide a la ZP, pero que no participa en la exocitosis del acrosoma.<sup>34</sup>

Con el objetivo de encontrar otro receptor espermático, distinto a GalT-I, que explicara la unión a ZP de los espermatozoides que no expresan esta proteína, se estudió una proteína de superficie particularmente atractiva, presente en espermatozoides de cerdo que también participa en la unión del espermatozoide a la ZP, denominada *SED1*<sup>35,36</sup> y que previamente había sido aislada mediante cromatografía de afinidad en columnas de ZP.<sup>37</sup>

Se ha demostrado que la proteína *SED1* es capaz de unirse selectivamente a la ZP de ovocitos no fecundados. Además, mediante ensayos competitivos usando *SED1* recombinante, diferentes dominios de *SED1* y anticuerpos contra la misma, se demostró la participación de esta proteína en la adhesión del espermatozoide al ovocito. Estos resultados fueron confirmados cuando se utilizaron ratones transgénicos que no expresan *SED1* y mediante cruzamiento se observó una reducida fertilidad en fecundación *in vivo*. Además los espermatozoides fueron incapaces de unirse a la ZP a pesar de no observarse aparentes defectos en su morfología, concentración, estado del acrosoma o motilidad.<sup>32,34-36</sup>

Estos mismos autores<sup>35</sup> estudiaron si la supresión del gen responsable de la expresión de la proteína *SED1*, podría haber provocado un efecto inesperado sobre la expresión o función de la GalT-I, comprobándose que ésta no se veía afectada, de modo que ambas son independientes.

Recientemente<sup>36</sup> se ha propuesto que *SED1* es necesaria para la adhesión inicial entre espermatozoide y ZP, facilitando en esta adhesión inicial que los oligosacáridos de ZP3 establezcan un estrecho contacto con su receptor espermático, entre los cuales se encontraría GalT-I. La unión de ZP3, según este modelo, consigue la activación de una proteína-G y la apertura de canales iónicos que finalmente desencadenarían la RA.

## REACCIÓN ACROSÓMICA

En mamíferos, para el éxito de la fecundación es necesario que el espermatozoide sufra el proceso de capacitación y a continuación la reacción acrosómica, lo cual le permitirá la penetración a través de la zona pelúcida y la unión al ovocito.

El proceso de RA consiste en la exocitosis del contenido del acrosoma como consecuencia de la fusión, en diferentes puntos, entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa, quedando expuesta la membrana acrosomal interna.<sup>17,38</sup> El proceso de RA está mediado por una compleja interacción de señales celulares que incluyen activación de proteínas cinasas y su posterior fosforilación, activación de canales iónicos y otros procesos aún por definir.<sup>39</sup>

La exocitosis del acrosoma puede ser desencadenada por varios agonistas naturales entre los cuales destaca la ZP como principal inductor. Bajo condiciones *in vitro*, la ZP solubilizada, la progesterona o el ionóforo de calcio también pueden inducir la RA.<sup>40</sup> Sin embargo, recientemente<sup>41</sup> se ha demostrado en ratón que la mera unión del espermatozoide a la zona no es suficiente para inducir la RA, proponiendo que es necesaria la penetración del espermatozoide en la matriz de la ZP para que se desencadene la exocitosis.

Aunque inicialmente se consideró la RA como un evento aislado, posteriormente se ha comprobado que es un proceso continuo que se inicia con la capacitación y que se ve dramáticamente acelerado tras el contacto con la zona pelúcida.<sup>42</sup>

Al igual que en otros procesos de secreción, en la RA el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental, ya que es necesario para la activación de las enzimas que participan en la fusión de membranas.<sup>43</sup> Además, este ión también regula el proceso de hiperactivación, la quimiotaxis y participa en la capacitación.<sup>44</sup> Aunque no se conoce totalmente la cascada de señales que culmina con la RA, se sabe que la inducción de la RA por la ZP y otros agonistas como la progesterona, desencadenan dicha reacción por el efecto que ejercen sobre el flujo de iones, principalmente sobre el  $\text{Ca}^{2+}$ , el metabolismo de los fosfolípidos, los niveles de AMPc y la fosforilación de proteínas.<sup>45</sup>

Los espermatozoides son capaces de movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  tanto del medio extracelular como de los depósitos intracelulares<sup>46</sup> y diferentes autores han demostrado en humanos<sup>47</sup> y ratón<sup>39</sup> que el acrosoma puede actuar como depósito intracelular de calcio.

En ratón el receptor que interacciona con la ZP3 está localizado sobre la región anterior de la cabeza

del espermatozoide, mientras que en humanos, a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide existen al menos dos receptores distintos que se unen a la ZP, uno es un receptor acoplado a una proteína G y el otro es un receptor tirosina cinasa acoplado a fosfolipasa C.<sup>48</sup>

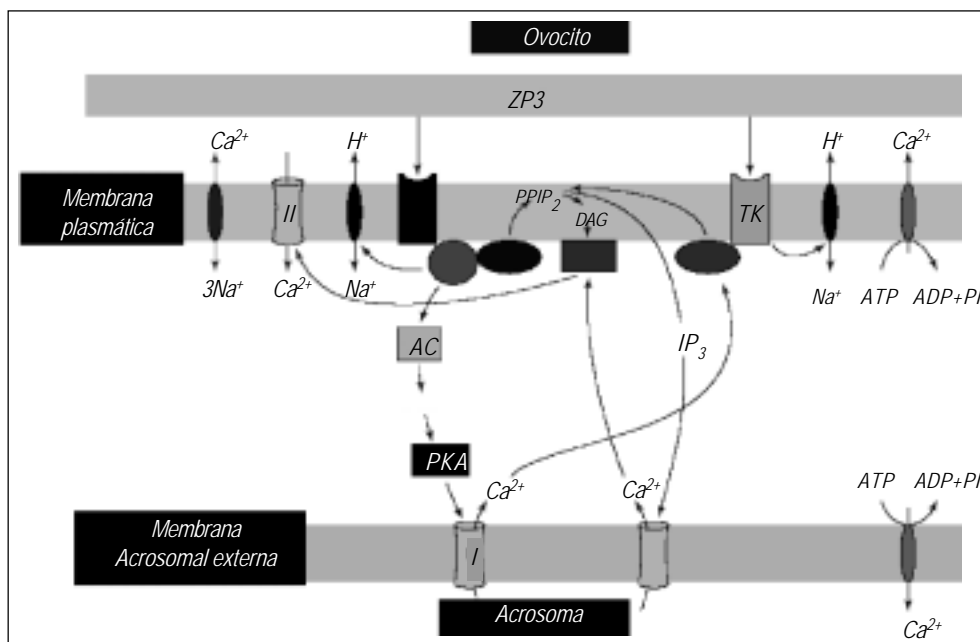
Resultados de diferentes laboratorios concluyen que durante la RA hay al menos dos fases de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol<sup>44</sup> y que están implicados distintos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>45</sup> Diferentes marcadores han mostrado que el aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  se inicia en la cabeza del espermatozoide y más específicamente en el segmento ecuatorial, si bien no necesariamente esto significa que sea en este punto donde se inician las señales tras la interacción con ZP3 o donde se abren los primeros canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>49</sup>

En primer lugar se produce una respuesta temprana de los canales dependientes de voltaje que provocan un aumento de calcio inicial, durante un breve periodo, el cual es seguido de una elevación prolongada que se mantiene a lo largo del tiempo.<sup>49</sup> Sin embargo, el proceso que actúa como nexo de unión entre las dos fases de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  permanece sin esclarecerse totalmente, aunque se ha propuesto que es el acrosoma el responsable de la liberación del calcio que se produce entre los dos eventos y que dicho calcio es acumulado a nivel del acrosoma durante el proceso de capacitación.<sup>39</sup>

Inicialmente se sugirió que el aumento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  era debido a un flujo extracelular del mismo a través de los canales  $\text{Ca}_{v1}$  (tipo-L), aunque estudios más recientes proponen que la cinética de la entrada que se produce inicialmente es compatible con los canales  $\text{Ca}_{v3}$  (tipo-T) y además la RA se inhibe por varios antagonistas de canales  $\text{Ca}_{v3}$ . Con base a ello, algunas moléculas como urocorina o fenvalerato han demostrado que pueden inhibir los canales tipo-T en células espermatogénicas y se ha propuesto que podrían tener aplicaciones anticonceptivas.<sup>50,51</sup>

Un modelo básico que intenta explicar los diferentes mecanismos implicados en el aumento de calcio intracelular que se produce en el espermatozoide como consecuencia de su unión a la ZP y que conlleva la exocitosis del acrosoma es el propuesto por Breitbart, *et al.*<sup>52</sup> (Figura 1). Sin embargo, este modelo no alcanza a explicar todas las evidencias obtenidas a nivel experimental, por lo que también revisaremos algunas de las propuestas hechas más recientemente por otros autores sobre los mecanismos implicados.<sup>38,45,53</sup>

El citado modelo propone que el espermatozoide se une a la ZP3 mediante oligosacáridos, al menos a



**Figura 1.** Representación esquemática de los mecanismos implicados en la RA. (Modificado de Breitbart, et al. 1997). ZP3: glicoproteína 3 de la zona pelúcida; R: receptor; TK: tirosin quinasa; G: proteína-G; PLC: fosfolipasa C; PK (A, C): proteína quinasa (A, C); PIP<sub>2</sub>: fosfoinositol fosfato; DAG: diacilglicerol; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; AC: acetilcolina.

través de dos receptores diferentes R y TK; (Figura 1) a nivel de su membrana plasmática. Los receptores (R) están acoplados a una proteína-G, la cual activa la fosfolipasa C  $\beta_1$  (PLC  $\beta_1$ ) y podrían regular la actividad de la adenilato ciclasa (AC) para producir AMPc y activar la proteína cinasa A (PKA). Esta PKA activa a su vez un canal dependiente de calcio a nivel de la membrana acrosomal externa, que liberaría  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior del acrosoma hacia el citosol del espermatozoide, provocando el primer aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, relativamente pequeño, el cual permite la activación de la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ).

Según Darszon, et al.<sup>45</sup> la unión de la ZP3 a su receptor activa una proteína Gi que está involucrada en el cambio de pH intracelular, mediado por los transportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$ ; además causa despolarización de membrana, la cual abre los canales  $\text{Ca}_v$  provocando la entrada inicial de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En cualquier caso, para la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> (fosfatidil inositol bifosfato) y la producción de DAG (diacilglicerol) e IP<sub>3</sub> (inositol trifosfato) es necesario que se produzca una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Según algunos autores,<sup>57</sup> la activación de las fosfolipasas PLC $\beta_1$  (mediante la proteína G acoplada al receptor R) y la PLC $\gamma$  (mediante el ligero aumento de calcio por movilización desde el acrosoma), genera la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> para formar IP<sub>3</sub> y DAG. La PKA y el IP<sub>3</sub> activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana acrosomal externa provocando el aumento de calcio intracelular mediante movilización desde el acrosoma.

El DAG es capaz de activar la proteína cinasa C (PKC) y la fosfolipasa A2, además de tener un efecto de retroalimentación positiva sobre la PLC.<sup>53</sup> La PKC provoca la apertura de los canales de calcio en la membrana plasmática del espermatozoide, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular al citosol.

La salida del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares daría lugar a un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mientras que la concentración acrosomal disminuye, provocando la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  implicados en el almacenamiento (SOC, store opens channels), que se sitúan a nivel de membrana plasmática, desencadenando la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  que supone un aumento sostenido de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

El fenómeno de entrada capacitativa de calcio se produce en un gran número de células y se basa en la apertura de un canal de calcio situado en la membrana plasmática como consecuencia de la reducción de calcio en las reservas internas.<sup>54</sup>

Se ha propuesto que los receptores que median esta entrada sostenida de calcio pertenecen a la familia de canales iónicos denominada TRP (transient receptor potential).<sup>45,53</sup> En ratón se ha demostrado la implicación del TRPC2 en la inducción de la RA por ZP3<sup>55</sup> y la presencia al menos de TRPC1, 2 y 5,<sup>45</sup> canales de la familia TRP.

En el espermatozoide, la sucesión de estos dos mecanismos (salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares y el flujo de entrada desde el medio extracelular) está en concordancia con los hallazgos

que demuestran que los eventos iniciales de la reacción acrosómica requieren bajas concentraciones (del orden de micromoles) de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que los eventos posteriores, incluida la fusión de membranas, requieren mayores niveles (del orden de milimolar) de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>53</sup>

Sin embargo, este modelo no explica cuál sería el papel de la progesterona, cuyo efecto ha sido demostrado en la exocitosis del acrosoma.<sup>56</sup> Otras propuestas sugieren que la progesterona podría actuar sobre un receptor situado a nivel de membrana plasmática y activar la PLC<sup>45</sup> o que la PLC $\beta$  participa en la exocitosis del acrosoma inducida por progesterona, teniendo en cuenta que la estimulación con dicha hormona produce un aumento en la formación de DAG.<sup>53</sup>

Respecto a los receptores sobre los cuales actuaría la progesterona existen algunas controversias.<sup>48</sup> Mientras que algunos autores proponen que existen dos receptores acoplados a un canal de  $\text{Cl}^-$  (uno es un receptor tipo GABA y el otro es un receptor de glicina), otros sugieren que existe sólo un receptor que provoca ambos efectos simultáneamente. En cualquier caso, estos receptores para neurotransmisores provocarían una salida de iones  $\text{Cl}^-$  que causan una despolarización de la membrana, necesaria para la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrados en el aumento inicial de este ión.<sup>45</sup>

Finalmente, para que la exocitosis tenga lugar es necesario que se produzca la fusión de membranas y la salida del contenido del acrosoma. Se ha demostrado que la mezcla o fusión de dos membranas es un proceso que ocurre de forma espontánea, y la repulsión entre las cargas de los fosfolípidos previene la interacción inicial.<sup>38</sup>

A pesar de ello, en el espermatozoide la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se mantienen separadas mediante una estructura de filamentos de F-actina formada durante la capacitación y dependiente de la activación de la proteína cinasa A, la fosforilación en tirosina de algunas proteínas y la activación de la fosfolipasa D (PLD).<sup>57</sup>

Durante la RA es necesario que se produzca la despolimerización de la F-actina, lo que provoca la destabilización de la estructura de filamentos para dar lugar a que la membrana acrosomal externa y la parte interna de la membrana plasmática puedan ponerse en contacto íntimamente.

Los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (sobre 500nM) que se producen como consecuencia de la inducción de la RA, provocan la activación de proteínas *cortadoras* de actina, que inducen la ruptura de los filamentos de actina y el desmantelamiento de la

estructura de sostén entre ambas membranas que las mantenía separadas.<sup>57</sup>

La exocitosis del acrosoma que tiene lugar durante la RA, implica entre otros procesos, el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la formación de complejos de proteínas *SNARE* para que se produzca la fusión de membranas,<sup>54,58</sup> tal y como ocurre, por ejemplo, en la exocitosis de vesículas sinápticas.

Las proteínas *SNARE* son una familia de proteínas que forman complejos estables y que han sido involucradas en la fusión de membranas. Además, algunas de ellas han sido identificadas en espermatozoides de mamíferos y se ha determinado que anticuerpos contra dichas proteínas inhiben la exocitosis del acrosoma.<sup>58</sup> En concreto las proteínas denominadas *syn-taxins1* y *2*, *SNAP25* y *VAMP2* se cree que participan en la exocitosis, a partir de los resultados que demuestran que las neurotoxinas botulínicas que producen la rotura de estas proteínas tienen un efecto inhibitorio sobre la RA.<sup>59</sup>

Sin embargo, este modelo que implica la actuación de las proteínas *SNARE* tampoco explica de forma global la fusión de membranas que ocurre durante la RA, al no considerar el papel de las fosfolipasas, proteínas cinasas, proteínas fosfatasa o incluso la función del citoesqueleto de actina que ha sido demostrado participan en la RA. Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios que tengan en cuenta de forma global todos los mecanismos descritos que pueden estar implicados, para tener un conocimiento completo del proceso de exocitosis del acrosoma.

## INTERACCIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON EL OOLEMA

Una vez que el espermatozoide atraviesa la ZP y ha sufrido la RA, el siguiente evento es contactar con el ovocito. Tras la RA se provoca una remodelación de la superficie del espermatozoide, quedando expuesta la membrana acrosomal interna, que contactará con las microvellosidades del ovocito, según se ha demostrado en diferentes estudios en roedores.<sup>49</sup> La interacción se inicia con una primera unión lábil y a continuación tiene lugar la adhesión celular propiamente dicha entre los dos gametos, para culminar con la fusión de las dos membranas.<sup>60,61</sup>

Numerosos estudios implican a varias moléculas a nivel del espermatozoide y del ovocito como responsables de la interacción. Durante los últimos años, se ha desarrollado un modelo que sugiere que la unión espermatozoide-oolema es el resultado de la

adhesión entre las integrinas del oolema y sus ligandos presentes en la membrana del espermatozoide. La identificación de las proteínas implicadas es uno de los principales objetivos de numerosos proyectos de investigación.

Las proteínas espermáticas que participan en este proceso presentan homología con las desintegrinas, una familia de moléculas, conocida como *ADAM* entre las que destacan la proteína 1 secretora rica en cisteína *CRISP1*, fertilina  $\alpha$  *ADAM1*; fertilina  $\beta$  *ADAM2* y cirtestina *ADAM3*. Además se ha descrito la existencia de una familia de proteínas tipo inmunoglobulinas, denominadas *Izumo* que son necesarias para que se produzca la fusión.<sup>62,63</sup>

Respecto al oolema, las proteínas que se consideran implicadas en esta interacción son denominadas integrinas ( $\alpha_6\beta_1$  y otras) y tetraspaninas *CD9*.<sup>60,64</sup> Además se han obtenido evidencias de la participación de una segunda tetraspanina *CD81* en la fusión de los gametos, la cual está estrechamente relacionada con *CD9* en su estructura y funciones.<sup>65</sup> Utilizando ratones *knock-out* para la molécula *CD81*, observaron una reducción de la fertilidad en los ratones obtenidos en la cuarta o quinta generación.

Una de las principales barreras para la identificación de las moléculas responsables del proceso de unión y fusión de gametos es la falta de un ensayo *in vitro* de unión espermatozoide-ovocito que simule fielmente las condiciones fisiológicas en que se produce esta interacción.<sup>66</sup>

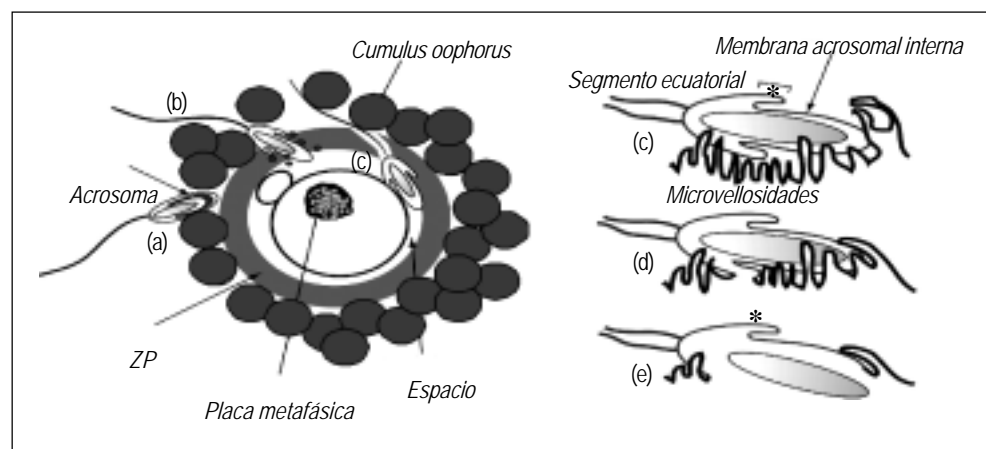
El proceso de fusión de membranas puede ser dividido en tres eventos claves:

- El primero consiste en el reconocimiento de membranas o adhesión y se trata de un contacto inicial entre las dos membranas mediado por

uniones proteína-proteína o por uniones proteína-carbohidrato.

- El segundo consiste en la aposición de las membranas; la actividad fusogénica de las proteínas conlleva que las dos membranas tengan un contacto íntimo y se produzca la adhesión uniéndose físicamente las dos membranas (a través de interacciones proteína-lípido o proteína-proteína), lo cual induce un cambio de conformación irreversible de modo que las proteínas se doblan sobre sí mismas.
- El tercer evento corresponde a la mezcla de lípidos; una vez que las membranas están en contacto, se produce la mezcla de lípidos dando como resultado una bicapa que permite la continuidad citoplasmática entre las dos células.<sup>67</sup>

La fusión queda restringida a una región específica de cada gameto. En el espermatozoide existe una porción de membrana plasmática, denominada región o segmento ecuatorial, que cubre parte del acrosoma, pero no se fusiona con la membrana acrosomal externa durante la RA (Figura 2). En esta región es donde se produce el contacto con el oolema y se inicia el proceso de fusión entre ambos gametos.<sup>68</sup> En el ovocito, la fusión se produce a nivel de las microvellosidades presentes en la mayor parte del oolema; sin embargo, en roedores, se ha observado que la parte del oolema más cercana a la placa metafásica no presenta estas microvellosidades y la fusión raramente ocurre a este nivel, no existiendo moléculas de *CD9*, ni integrinas en dicha área. Se ha propuesto<sup>69</sup> que las microvellosidades actúan como una plataforma donde se concentran las proteínas que participan en la adhesión y fusión, una estrategia utilizada ampliamente en los sistemas biológicos para aumentar la superficie. Incluso las microvello-



**Figura 2.** Representación esquemática de las interacciones espermatozoide-ovocito. (Modificado de Kaji y Kudo, 2004). (a) El espermatozoide atraviesa el CO y se une a la ZP. (b) Tras la unión a la ZP se produce la RA. (c) El espermatozoide atraviesa la ZP y se une al oolema. (c) Detalle de la unión del espermatozoide al oolema. (d) La fusión se inicia a nivel del segmento ecuatorial. (e) Tras la fusión el oolema va englobando al espermatozoide.

sidades actúan como una profusión de la membrana con un bajo radio de curvatura, lo que puede facilitar que se produzca un contacto íntimo entre el espermatozoide y el oolema.

### **Moléculas implicadas en el proceso de unión y adhesión entre el espermatozoide y el ovocito**

A nivel espermático, el primer hallazgo sobre las desintegrinas como moléculas implicadas en la adhesión al ovocito fue la proteína *PH-30* o fertilina, capaz de inhibir la fusión en un alto porcentaje.<sup>70</sup> El anticuerpo anti *PH-30* inmunoprecipitaba una proteína formada por un heterodímero con dos subunidades, fertilina  $\alpha$  *ADAM1* y fertilina  $\beta$  *ADAM2*.

Estas dos subunidades se han identificado en diferentes especies de mamíferos, como el ratón, aunque algunas especies pueden no expresar la subunidad  $\alpha$  de la fertilina. Según algunos autores,<sup>71</sup> los espermatozoides humanos no expresan una proteína fertilina  $\alpha$  funcional, lo cual pone en duda su función propuesta en la fecundación. Estos autores cuestionan la existencia del complejo fertilina  $\alpha$ - $\beta$  en humanos, ya que no han sido capaces de identificarlo en macacos.

Mediante ensayos en los que se utilizaron secuencias de péptidos de la fertilina  $\beta$  de hámster se observó una importante reducción de la fusión entre espermatozoides y ovocitos,<sup>72</sup> por lo que se le ha atribuido una función en el mecanismo de fusión. Para profundizar en el estudio del mecanismo de unión y fusión de gametos se han obtenido ratones *knock-out* con ausencia de fertilina  $\beta$ , *ADAM3* o ambas. Los espermatozoides de cada una de las líneas de ratones mostraron una dramática reducción en la unión a ovocitos sin ZP en torno al 90%.<sup>73</sup> Sin embargo, se observó que estos ratones *knock-out* para fertilina  $\beta$  o *ADAM3*, presentaban una reducción en la expresión de otras desintegrinas y que se podrían afectar otras proteínas no identificadas y responsables de la unión del espermatozoide. Recientemente<sup>74</sup> se ha observado también que los ratones *knock-out* para *ADAM1* son fértiles, pero poseen una severa reducción de la expresión de *ADAM2* en la superficie de los espermatozoides.

### **Moléculas implicadas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito**

Solamente unas pocas proteínas espermáticas que son candidatas a tener un papel en la fusión espermatozoide-ovocito se han estudiado con detalle. Es-

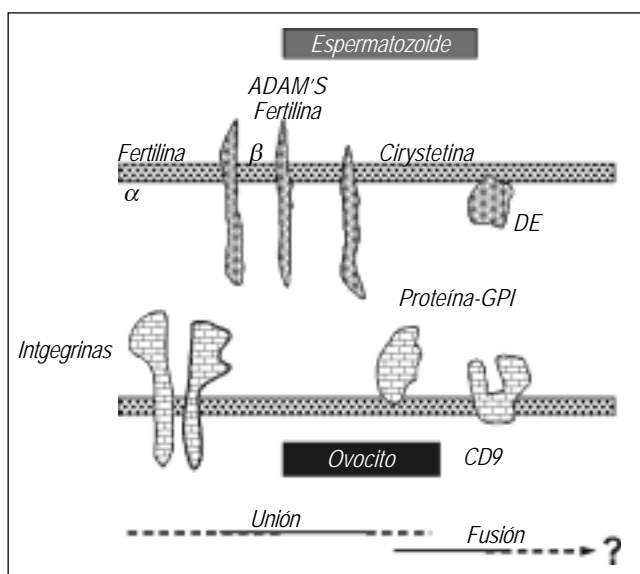
tudios en el ratón atribuyen un papel en la fusión a la proteína *DE* o *CRISP1* y *CRISP2*<sup>75</sup> y *equatorina*<sup>76</sup>. Además, estos ensayos también indican que fertilina  $\beta$  y *ADAM3* son necesarias para la fusión, aunque cuando se utilizaron ratones *knock-out* para estas dos moléculas se observó solamente una ligera inhibición de la fusión.<sup>73</sup>

En cuanto al ovocito, la molécula *CD9* es uno de los miembros de la familia de las tetraspaninas que se encuentra distribuido por toda la superficie del oolema, con la excepción de la región más cercana a la placa metafásica en el caso de roedores, donde raramente se produce la fusión.<sup>77</sup> Kaji *et al.* demostraron que los espermatozoides eran capaces de unirse a ovocitos de ratón deficientes en *CD9* de modo similar al tipo salvaje, pero que sin embargo raramente se producía la fusión *in vivo* e *in vitro*. Además, recientemente<sup>78</sup> se ha demostrado que la molécula *CD9* controla la formación de áreas que contienen otras tetraspaninas e integrinas, las cuales están involucradas en la fusión de gametos en la especie humana y murina.

El mecanismo de acción en el proceso de fusión de *CD9* no se conoce en detalle, pero se postula que actúa en colaboración con otras proteínas de superficie del oolema. Algunos estudios sugieren que *CD9* funciona a través de un gran pliegue o bucle (*EC2*) y que una secuencia determinada de aminoácidos a ese nivel interviene en la fusión.<sup>79</sup> Algunos autores<sup>66</sup> afirman que además del *CD9* como molécula esencial en este proceso, participan también alguna(s) de las denominadas proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol). Hasta el momento, no ha sido definitivamente identificada cuál de ellas es importante para la fecundación, pero se ha demostrado que alguna, como la *CD55*, no es esencial para la fusión de gametos.

A nivel espermático se ha descrito la existencia de una familia de proteínas denominadas *Izumo* que son responsables de la fusión del espermatozoide en ratón.<sup>62</sup> Ratones con una delección del gen *Izumo* producen espermatozoides con motilidad, migración y reacción acrosómica con parámetros dentro de la normalidad, pero *in vivo* no produjeron descendencia mientras que *in vitro* se observó penetración de la ZP, permaneciendo los espermatozoides en el espacio perivitelino, sin que se produjera la fusión con el oolema. Utilizando la técnica de ICSI se obtuvo descendencia en niveles similares al grupo control.

En la figura 3 se representan algunas de las moléculas implicadas en la unión y/o fusión de los espermatozoides al ovocito. A nivel del ovocito las integrinas parecen tener alguna función en la



**Figura 3.** Representación de las moléculas implicadas en el proceso de unión y fusión espermatozoide-ovocito (Modificado de Kaji y Kudo, 2004).

unión, actuando como receptores de las proteínas espermáticas ADAM, mientras que en la fusión participa el CD9 en cooperación con proteínas GPI. A nivel del espermatozoide, las proteínas de la familia ADAM participan en el proceso de unión, mientras que las implicadas en el proceso de fusión son proteínas tipo Izumo<sup>62</sup> y proteínas epididimales tipo CRISP.<sup>75</sup>

## CONCLUSIONES

En conclusión podemos afirmar que durante los últimos 30 años se han identificado algunas de las moléculas que participan en el proceso de interacción ovocito-espermatozoide; sin embargo, dicho proceso aún no se conoce en su totalidad. Debido a que los eventos implicados tienen una importancia mayúscula para el diagnóstico de problemas de infertilidad y desarrollo de nuevos métodos de tratamiento o regulación de la reproducción, las investigaciones en este campo en los próximos años serán cruciales para la solución de los problemas indicados.

## REFERENCIAS

1. Miller DJ, Shi X, Burkin H. Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 37-73.
2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506-12.
3. Zhu JL, Basso O, Obel C, Bille C, Olsen J. Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort. *BMJ* 2006; 333: 679.
4. Austin CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 1952; 170: 326.
5. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 697-8.
6. Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil* 2007; (Suppl. 65): 245-59.
7. Meyers SA, Rosenberger AE. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod* 1999; 61: 444-51.
8. Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *PNAS* 2005; 102: 18028-33.
9. Rankin T, Dean J. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 2000; 5: 114-21.
10. Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J. Human sperm do not bind to rat zona pellucida despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem* 2005; 280: 12721-31.
11. Vieira A, Miller DJ. Gamete interaction: is it species-specific? *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 1422-9. Review.
12. Dell A, Morris HR, Easton RL, Patankar M, Clark GF. The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 196-205.
13. Wassarman PM. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol* 2005; 204: 388-91.
14. Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(14): 1805-23. Review.
15. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 2004; 19:1580-6.
16. Jimenez-Movilla M, Aviles M, Gomez-Torres MJ, Fernandez-Colom PJ, et al. Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Hum Reprod* 2004; 19: 1842-55.
17. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD (eds.). *Physiology of Reproduction*. 2a. Ed. New York: Raven Press; 1994, p. 189-317.
18. Rath D, Topfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, von Witzendorff D, et al. Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs. *Soc Reprod Fertil* 2006; (Suppl. 62): 317-30.
19. Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N, Shalgi R. When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 252: 107-14.
20. Sinowatz F, Wessa E, Neumuller C, Palma G. On the species Specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. *Reprod Dom Anim* 2003; 38: 141-6.
21. Canovas S, Coy P, Gomez E. First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *J Androl* 2007; 28: 273-81.
22. Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 2003; 5: 33-43.
23. Dean J. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* 2004; 26: 29-38.

24. Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M. Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem* 2001; 268: 3587-94.
25. Miller DJ, Macek MB, Shur BD. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 1992; 357: 589-93.
26. Yonezawa N, Amari S, Takahashi K, Ikeda K, Imai FL, Kanai S, et al. Participation of the nonreducing terminal beta-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 222-7.
27. Amari S, Yonezawa N, Mitsui S, Katsumata T, Hamano S, et al. Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 221-6.
28. Velasquez JG, Canovas S, Barajas P, Marcos J, Jimenez-Movilla M, et al. Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 617-28.
29. Clark GF, Dell A. Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* 2006; 281: 13853-6. Review.
30. Yu Y, Xu W, Yi YJ, Sutovsky P, Oko R. The extracellular protein coat of the inner acrosomal membrane is involved in zona pellucida binding and penetration during fertilization: characterization of its most prominent polypeptide (IAM38). *Dev Biol* 2006; 290: 32-43.
31. Gaboriau D, Howes EA, Clark J, Jones R. Binding of sperm proacrosin/beta-acrosin to zona pellucida glycoproteins is sulfate and stereodependent. Synthesis of a novel fertilization inhibitor. *Dev Biol* 2007; 306: 646-57.
32. Shur BD, Rodeheffer C, Ensslin MA, Lyng R, Raymond A. Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 137-48.
33. Zitta K, Wertheimer EV, Miranda PV. Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 557-63.
34. Rodeheffer C, Shur BD. Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development* 2004; 131: 503-12.
35. Ensslin MA, Shur BD. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 2003; 114: 405-17.
36. Ensslin MA, Lyng R, Raymond A, Copland S, Shur BD. Novel gamete receptors that facilitate sperm adhesion to the egg coat. *Soc Reprod Fertil* 2007; (Suppl. 63): 367-83.
37. Ensslin M, Vogel T, Calvete JJ, Thole HH, et al. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol Reprod* 1998; 58: 1057-64.
38. Mayorga LS, Tomes CN, Belmonte SA. Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 2007; 59: 286-92.
39. Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Cell Physiol* 2005; 202: 663-71.
40. Neild DN, Gadella BM, Agüero A, Stout TA, Colenbrander B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 2005; 89: 47-56.
41. Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 2007; 134: 933-43.
42. Kim KS, Gerton GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev Biol* 2003; 264: 141-52.
43. Darszon A, Beltrán C, Felix R, Nishigaki T, Treviño CL. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 2001; 240: 1-14. Review.
44. Publicover S, Harper CV, Barratt C. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in sperm—making the most of what you've got. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 235-42. Review.
45. Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, et al. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006; 131: 977-88.
46. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca<sup>2+</sup> entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 1571-84.
47. De Blas G, Michaut M, Treviño CL, Tomes CN, Yunes R, Darszon A, Mayorga LS. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 49326-31.
48. Witte TS, Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2007; 102: 181-93.
49. Florman H, Ducibella T. Mammalian fertilization. In: Neill JD (ed.). Knobil and Neill's: Physiology of reproduction. 3a. Ed. Amsterdam: Elsevier; 2006, p. 55-112.
50. Tao J, Wu Y, Chen J, Zhu H, Li S. Effects of urocortin on T-type calcium currents in mouse spermatogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 743-8.
51. Xiao H, Zhang XC, Zhang L, Dai XQ, et al. Fenvalerate modifies T-type Ca<sup>2+</sup> channels in mouse spermatogenic cells. *Reprod Toxicol* 2006; 21: 48-53.
52. Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis. *Rev Reprod* 1997; 2: 165-74.
53. Roldan ER, Shi QX. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 2007; 12: 89-104. Review.
54. Putney JW. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990; 11: 611-24.
55. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 499-502.
56. Roldan ER, Murase T, Shi QX. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 1994; 266: 1578-81.
57. Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 2005; 129: 263-8.
58. Tomes CN. Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc Reprod Fertil* 2007; (Suppl. 65): 275-291. Review.
59. Tomes CN, Michaut M, De Blas G, Visconti P, Matti U, Mayorga LS. SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev Biol* 2002; 243: 326-38.
60. Evans JP. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Human Reproduction Update* 2002; 8: 297-311.
61. Primakoff P, Myles DG. Cell-cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS Lett* 2007; 581: 2174-80.
62. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434: 234-8.
63. Pate BJ, White KL, Chen D, Aston KI, et al. A novel approach to identify bovine sperm membrane proteins that interact with receptors on the vitelline membrane of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2007; 75: 641-9.
64. Kaji K, Kudo A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 2004; 127: 423-9.

65. Rubinstein E, Ziyat A, Prenant M, Wrobel E, et al. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol* 2006; 290: 351-8.
66. Talbot P, Shur BD, Myles DG. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 2003; 68:1-9.
67. Jahn R, Grubmuller H. Membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(4): 488-95.
68. Yanagimachi R. Sperm-egg fusion. *Curr Top Membr Transp* 1988; 32: 3-43.
69. Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, et al. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol* 2007; 304: 317-25.
70. Green DP. Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum Reprod* 1993; 8: 91-6.
71. Jury JA, Frayne J, Hall L. The human fertilin alpha gene is non-functional: implications for its proposed role in fertilization. *Biochem J* 1997; 321: 577-81.
72. Myles DG, Kimmel LH, Blobel CP, White JM, Primakoff P. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *PNAS USA* 1994; 91: 4195-8.
73. Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 2001; 233: 204-13.
74. Kim E, Yamashita M, Nakanishi T, Park KE, et al. Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J Biol Chem* 2006; 281: 5634-9.
75. Da Ros V, Busso D, Cohen DJ, Maldera J, Goldweic N, Cuasnicu PS. Molecular mechanisms involved in gamete interaction: evidence for the participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in sperm-egg fusion. *Soc Reprod Fertil* 2007; (Suppl 65): 353-6.
76. Toshimori K, Saxena DK, Tanii I, Yoshinaga K. An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm-oocyte fusion in mice. *Biol Reprod* 1998; 59: 22-9.
77. Kaji K, Oda S, Miyazaki S, Kudo A. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol* 2002; 247: 327-34.
78. Ziyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, et al. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci* 2006; 3: 416-24.
79. Zhu X, Evans JP. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, alpha(4)/alpha(9) integrins, alpha(6) integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. *Biol Reprod* 2002; 66: 1193-202.

*Reimpresos:*

**Dr. Sebastián Cánovas-Bernabé**

Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria.  
30071 Campus de Espinardo.  
Murcia. España  
Tel.: +3496 836-4789  
Fax: +3496 836-4147  
Correo electrónico: scber@um.es

*Recibido el 14 de noviembre de 2007.*

*Aceptado el 11 de agosto de 2008.*