



# 3

José Carlos Rosales  
Henry Fajardo  
Lisbeth García

## FECUNDACIÓN Y DESARROLLO DEL EMBRIÓN PREIMPLANTACIÓN

	Pág.
FECUNDACIÓN .....	61
ADQUISICIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL ESPERMATOZOIDE .....	61
Capacitación .....	61
Reacción acrosómica .....	61
PENETRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL <i>CUMULUS OOPHORUS</i> .....	63
PENETRACIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA .....	64
FUSIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON LA MEMBRANA DEL OOCITO .....	66
ACTIVACIÓN DEL OOCITO .....	68
EXPULSIÓN DEL SEGUNDO CUERPO POLAR .....	70
DESCONDENSACIÓN DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO EN EL OOPLASMA .....	71
HERENCIA DEL CENTROSOMA MASCULINO .....	72
FORMACIÓN DE PRONÚCLEOS Y SINGAMIA .....	73
DESARROLLO TEMPRANO DEL EMBRIÓN PREIMPLANTACIÓN .....	74
ACTIVACIÓN DEL GENOMA DEL ZIGOTO .....	77
RESUMEN .....	78
REFERENCIAS .....	79





## FECUNDACIÓN

Durante la fecundación, dos células sexuales o gametos se unen para iniciar una cascada de señales que resulta en la conversión del oocito en un embrión diploide capaz de formar un nuevo organismo, cuyas características genéticas son diferentes de las de sus padres. La reproducción sexual emergió durante la evolución de los seres vivos y se ha mantenido en la mayoría de los metazoarios (organismos multicelulares). La razón de la predilección evolutiva por la reproducción sexual no está clara; sin embargo, se cree que entre sus ventajas están el aumento de la velocidad de adaptación de las especies a las exigencias del medio ambiente y el impedir la acumulación irreversible de mutaciones perjudiciales.

## ADQUISICIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL ESPERMATOZOIDE

### Capacitación

Sólo unos miles de espermatozoides llegan al sitio de fertilización que se ubica en la ampolla tubárica. En algunos animales como el cochino, el caballo y el perro, el semen ingresa en el útero a través del canal cervical y la unión uterotubárica es la principal barrera que seleccionan los espermatozoides que ascenderán a la ampolla. Sin embargo, tanto en el hombre como en la mayoría de los mamíferos euterianos, entre los que se encuentran el ganado y los primates, el semen es depositado en la vagina, y el canal cervical constituye el sitio anatómico de selección de los espermatozoides, así como el lugar en el que se inicia su capacitación dentro del tracto genital femenino (Drobnis and Overstreet, 1992) (ver cap. 1).

La liberación progresiva de los espermatozoides que se pueden depositar en las criptas del canal cervical de la mujer puede durar varios días después del coito y explicar los embarazos que ocurren hasta 5 días después de una relación sexual (Hanson and Overstreet, 1981); esto permite sincronizar la ovulación con la presencia de espermatozoides en el oviducto. Apparentemente también se produce un pequeño reservorio en el istmo del oviducto (Smith and Yanagimachi, 1991), que podría representar un grupo muy selecto de espermatozoides que tienen mayor probabilidad de fertilizar al oocito.

### Reacción acrosómica

El acrosoma es un organelo presente en la cabeza del espermatozoide que rodea la porción anterior del núcleo y, aunque su forma y tamaño varía mucho de

especie a especie, su estructura básica es similar en todos los animales (Faecett, 1975). Consta de dos membranas: la acrosomal externa, que se encuentra por detrás de la membrana celular del espermatozoide, y la acrosomal interna, que rodea el núcleo espermático. La matriz acrosómica es la parte interna y en los mamíferos se han encontrado más de 20 enzimas hidrolíticas (Allison and Hartree, 1970) (fig. 3-1). A pesar de esta gran cantidad de enzimas, la hialuronidasa y la acrosina han sido las más estudiadas y parecen ser las más importantes (Srivastava et al., 1981; Abou-Haila and Tulsiani, 2000). La acrosina se encuentra en el interior del acrosoma en su forma inactiva, denominada proacrosina, y, como se analizará más adelante, cumple una función primordial en la relación entre en el espermatozoide y la zona pelúcida (Tesarik et al., 1988).

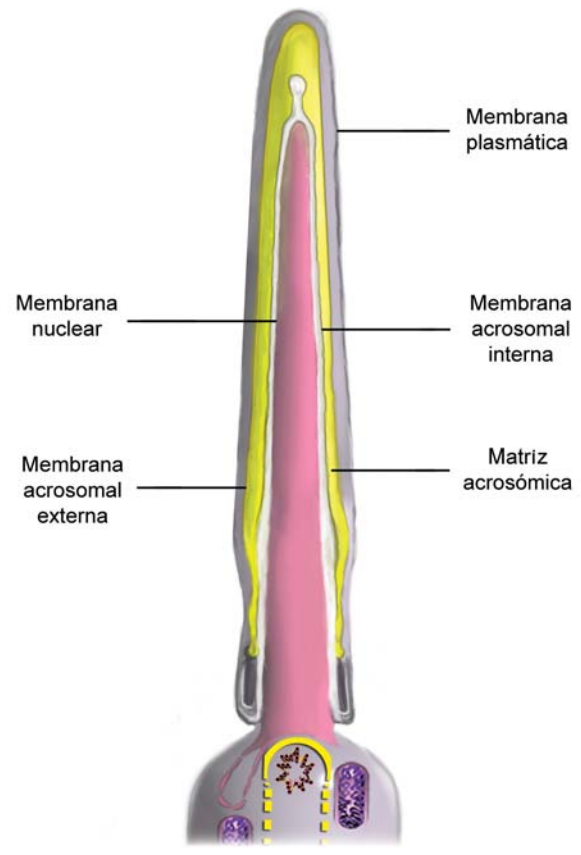


Figura 3-1.  
Estructura del acrosoma.

Algunos estudios sugieren que la acrosina y la hialuronidasa se encuentran en dos fracciones en el interior del acrosoma: una fracción libre contenida en

la matriz, y otra fracción de moléculas que se encuentran unidas a la membrana interna y permanecen allí, incluso después que ha ocurrido la reacción acrosómica (Huang and Yanagimachi, 1985).

Los huevos de muchas especies están rodeados por una cubierta glicoproteica que debe ser atravesada por el espermatozoide antes de penetrar en el oocito. En el caso de los mamíferos, está cubierta es especialmente gruesa y se denomina zona pelúcida. Sólo los espermatozoides que han llevado a cabo el proceso de exocitosis, denominado reacción acrosómica, lograrán atravesar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana del oocito. Mediante esta reacción ocurre la fusión de la membrana acrosómica externa y la membrana celular del espermatozoide, lo que genera la aparición de fenestraciones entre ambas membranas, que permiten la salida del contenido del acrosoma. Se ha señalado que los espermatozoides humanos capacitados expuestos a líquido folicular completan este proceso en aproximadamente 3 minutos (Yanagimachi, 1994).

Sin embargo, la reacción acrosómica es un proceso gradual en los espermatozoides del eyaculado y no se lleva a cabo de forma simultánea en todos ellos (Lee and Storey, 1989). Se ha demostrado que los espermatozoides en el tracto genital femenino pueden desarrollar una falsa reacción acrosómica como consecuencia de su muerte en la vagina, el útero y las trompas de Falopio y que, en un ambiente adecuado como el canal endocervical, permanecen con el acrosoma intacto incluso hasta 3 días; de hecho, la mayoría de los espermatozoides viables presentes en el útero y en las trompas presentan acrosomas intactos (Overstreet and Cooper, 1979; Smith and Yanagimachi, 1989; Bryan, 1974).

A pesar de que algunos inician tempranamente la reacción acrosómica cuando están en contacto con el *cumulus oophorus* (Cummins and Yanagimachi, 1986), la mayoría no lo hacen hasta que entran en contacto con la zona pelúcida (Crozet and Dumont, 1984; White et al., 1990). La reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida es especie-específica en el sentido de que es más eficiente en la misma especie (Uto et al., 1988).

No se han descrito todos los eventos que generan la reacción acrosómica. La glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida parece ser el principal ligando fisiológico que induce la reacción acrosómica del espermatozoide (Van Duin et al., 1994), aunque también se conocen otros como la progesterona (Blackmore et al., 1990) y el péptido atrial natriurético (Anderson et al., 1994), que

están presentes en el líquido folicular pero cuya función no se ha precisado.

No está caracterizado el receptor de la membrana del espermatozoide que se une al ZP3; sin embargo, hay varios candidatos probables entre los que destacan un receptor de ligandos que contiene manosa, cuya expresión depende del tiempo transcurrido desde la capacitación (Benoff, 1997), y un receptor tirosina-quinasa de 95 kDa, que induce cambios de pH en el citoplasma del espermatozoide (Burks et al., 1995).

Con respecto a las señales que se producen después de la unión de la ZP3 con su receptor, se han planteado varios modelos. Algunos ensayos sugieren la intervención de una proteína G (proteína captadora de nucleótidos de guanina) en la transducción de la señal (Brandelli et al., 1996). Por otro lado, se sabe que el calcio ( $Ca^{++}$ ) es necesario para la exocitosis y se ha sugerido que es importante como segundo mensajero en la reacción acrosómica (Breitbart and Spungin, 1997; Tesarik et al., 1996).

Cuando la progesterona presente en el líquido folicular es la que estimula la reacción acrosómica, el  $Ca^{++}$  ingresaría a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Brandelli et al., 1996) o mediante canales de cloro asociados a un receptor de progesterona que causarían una salida de  $Cl^-$  y un ingreso de  $Ca^{++}$  (Meizel, 1997; Blackmore et al., 1990). También se sabe que la reacción acrosómica se puede llevar a cabo sin  $Ca^{++}$  en el medio extracelular si se utilizan estimuladores del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que actúa como un segundo mensajero (De Jonge et al., 1991; Anderson et al., 1992) y activa a la proteinquinasa A (PKA) que resulta en fosforilación de proteínas y amplificación de la señal.

En estudios en los que se induce la reacción acrosómica exponiendo al espermatozoide a la zona pelúcida solubilizada, se obtiene la activación de múltiples vías de señalización celular como el AMPC dependiente, el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) dependiente, la dependiente del  $Ca^{++}$  y la dependiente de la fosfolipasa C (PLC), que culminan con la reacción acrosómica (Bielfeld et al., 1994). Existe, por tanto, la posibilidad de que múltiples vías de señalización actúen fisiológicamente durante la activación de la reacción acrosómica, lo que se ha intentado explicar justificando la presencia de múltiples ligandos capaces de inducir este proceso en las secreciones de las trompas de Falopio, el líquido folicular, el *cumulus oophorus* y la zona pelúcida.



## **PENETRACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE EN EL *CUMULUS OOPHORUS***

Antes de unirse a la membrana celular del oocito humano, el espermatozoide debe atravesar primero el *cumulus oophorus* y luego, la zona pelúcida.

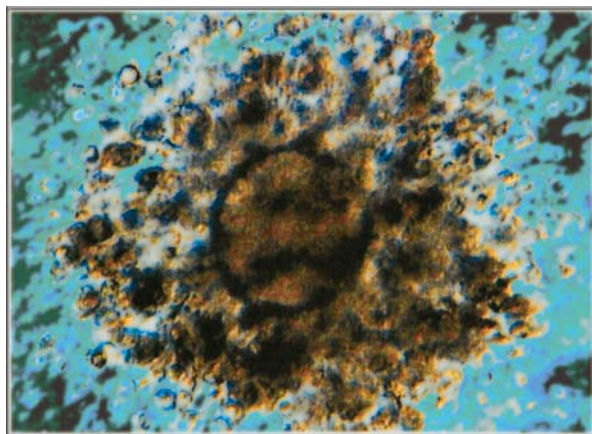
En algunos animales, el oocito se desprende del *cumulus* de células de la granulosa poco después de la ovulación, por lo que el espermatozoide sólo debe atravesar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1994) y es posible llevar a cabo una fertilización in vitro (FIV) sin la presencia del *cumulus oophorus* (Cox, 1991; Mahadevan and Trounson, 1985), lo cual sugiere que no es imprescindible para la fecundación normal. Sin embargo, el *cumulus* mejora la tasa de fertilización durante la FIV en el ratón y muchos factores presentes en su matriz modifican la motilidad del espermatozoide (Bradley and Garbers, 1983) o promueven la reacción acrosómica (Siiteri et al., 1988).

Algunas de las posibles funciones del *cumulus* son las siguientes (Yanagimachi, 1994):

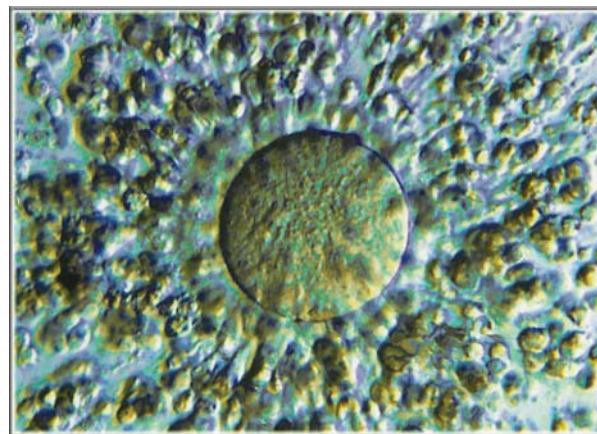
- Favorecer el encuentro del óvulo y el espermatozoide porque aumenta varias veces el volumen del oocito.

- Evitar que los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica se alejen del oocito porque los orienta hacia su región central.
- Ayudar a prolongar el tiempo durante el cual el oocito es fértil, al evitar el endurecimiento precoz de la zona pelúcida.
- Facilitar la entrada del espermatozoide en la zona pelúcida, al impedir que el oocito rote libremente dentro de ésta, lo que permite una interacción más estable entre el espermatozoide y la zona pelúcida.
- Actuar como un filtro que permite la interacción del oocito con aquellos espermatozoides capaces de penetrar el *cumulus*.

El *cumulus oophorus* está constituido por células de la granulosa y una matriz extracelular laxa compuesta principalmente por ácido hialurónico polimerizado (fig. 3-2) (Virji et al., 1990), que es secretada por las células de la granulosa durante el reinicio de la meiosis en el oocito, lo que causa una rápida expansión del *cumulus* poco antes de la ovulación (Epipig, 1982). La disposición radial de estas células en el oocito maduro ha justificado el nombre de corona radiata que se le da al grupo celular que se encuentra más cercano al oocito.



A: óvulo maduro



B: *cumulus* removido

Figura 3-2.  
*Cumulus oophorus*

Tanto los espermatozoides no capacitados como aquéllos que han completado la reacción acrosómica antes de contactar la matriz, se unen a la periferia del *cumulus* sin lograr ingresar en la zona pelúcida (Cummins and Yanagimachi, 1986; Talbot, 1985), pero solamente los espermatozoides capacitados con el acrosoma intacto son los que pueden penetrar la ma-

triz del *cumulus* (Austin, 1960). Aunque se han señalado hallazgos experimentales que sugieren que el espermatozoide humano puede penetrar el *cumulus* sin ser previamente capacitado, la rapidez con la que se produce la capacitación en ciertas condiciones in vitro hace dudar de esta hipótesis (White et al., 1990; McMaster et al., 1978). Por otro lado, puesto que el uso de

inhibidores de la hialuronidasa, como la heparina sódica, impiden la penetración del espermatozoide en el *cumulus* (Cummins and Yanagimachi, 1986), se ha propuesto que, aparte de la reacción acrosómica, ocurren pequeñas modificaciones de la membrana del espermatozoide que pueden cumplir una importante función en la penetración del *cumulus oophorus*.

Una vez que el espermatozoide comienza su penetración en el *cumulus*, cambia su patrón de movimiento, debido probablemente a la viscosidad de la matriz extracelular, para hacerse más lento y con una amplitud del desplazamiento flagelar (Drobnis et al., 1988), lo que parece indicar una considerable resistencia a su paso. Se ha propuesto un efecto adicional sobre el movimiento espermático producto de la interacción del espermatozoide con los componentes químicos del *cumulus*, como el ácido hialurónico, que ocasiona la aparición de un desplazamiento más lineal y progresivo (Tesarik et al., 1984; Tesarik et al., 1990a; Tesarik et al., 1990b;). Por tanto, el espermatozoide atraviesa el *cumulus* mediante un proceso que combina una acción mecánica con una enzimática; sin embargo, se considera que el factor más importante en el desplazamiento es el movimiento flagelar y que la hialuronidasa y otras enzimas del acrosoma no son indispensables y sólo facilitan dicho desplazamiento (Talbot, 1985; Cherr et al., 1986; Talbot et al., 1985).

Resulta interesante el hecho de que la denudación del oocito, es decir, la pérdida completa del *cumulus oophorus*, se puede verificar *in vitro* antes de la fecundación, puesto que la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida se produce posteriormente a la acción simultánea de varios espermatozoides que disgregan la matriz del *cumulus*; mientras que *in vivo*, debido al escaso número de espermatozoides que alcanzan el tercio distal de la trompa, son muy pocos los que rodean al oocito en el transcurso de la fecundación (Cummins and Yanagimachi, 1982; Shalgi and Phillips, 1988), por lo que la dispersión del *cumulus* es posterior a la fertilización.

## **PENETRACIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA**

Como se explicó en el capítulo 2, la zona pelúcida es una cobertura glicoproteica que rodea el oocito, la cual no sólo es importante durante la fertilización sino que además protege al embrión antes de la implantación, al mantener unidas las blastómeras antes de su compactación, evitando su disgregación o su implantación en lugares ectópicos (Edwards, 1964). Por tanto, se consideran anecdóticos los estudios de implan-

tación y desarrollo de embriones que provienen de oocitos carentes de zona pelúcida (Naito et al., 1992). Como se analiza más adelante, la zona cumple una importante función en el control de la interacción entre el espermatozoide y el oocito al evitar la polispermia, es decir, la fecundación de un solo oocito por más de un espermatozoide.

La zona pelúcida varía en su estructura y grosor de una especie a otra (Katz et al., 1989), aunque en la mayoría de los casos, presenta una capa densa que ocupa la mitad interna y una capa más laxa en su porción externa (Familiari et al., 1992). La interacción de la zona pelúcida con el espermatozoide es un fenómeno complejo y específico de cada especie que puede ser dividido en dos grandes procesos: la fijación primaria, en la que el espermatozoide se une a la zona pelúcida con el cromosoma intacto; y la fijación secundaria, en la que los espermatozoides se unen después de haber completado la reacción acrosómica (Mortillo and Wassarman, 1991). El hecho de que el espermatozoide obtenido del epidídimo se una de forma más laxa que el que ha sido capacitado (Inoue and Wolf, 1975), hace suponer que los sitios de unión o receptores de la zona pelúcida presentes en la membrana del espermatozoide aparecen o incrementan su número durante la capacitación.

La zona pelúcida humana, como la del ratón y el hámster, está constituida por tres familias de glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, que actúan como mediadoras de la unión con el espermatozoide porque éste presenta en su superficie moléculas afines a las glicoproteínas ZP (O'Rand et al., 1985; Moller et al., 1990; Shabanowitz and O'Rand, 1988; Jovine et al., 2002). La glicoproteína ZP3 se une con gran afinidad a la membrana del espermatozoide con el acrosoma intacto, es decir, se une a la membrana plasmática que recubre la membrana acrosomal externa, mientras que la ZP2 se une preferentemente a la membrana acrosomal interna, la cual resulta expuesta a los espermatozoides que han completado la reacción acrosómica (Mortillo and Wassarman, 1991; Wassarman, 2003; Kerr et al., 2002).

En la superficie del espermatozoide se han encontrado sitios de unión con alta y baja afinidad para la ZP3 (Thaler and Cardillo, 1996), que pueden desencadenar la reacción acrosómica mediante un mecanismo poco conocido que involucra varias proteínas transductoras de señal como la proteína G, el inositol trifosfato (IP3) y canales de calcio (Florman et al., 1984; Florman et al., 2003). La glicoproteína ZP1 no parece ser necesaria para la unión del espermatozoide a la



zona y su contribución más importante pudiera ser estructural. Se ha observado que oocitos de ratón sin ZP1 pueden ser fertilizados in vivo e in vitro (Rankin et al., 1999).

Se ha señalado que varias moléculas del espermatozoide son responsables de la unión con la zona pelúcida, entre éstas se destacan la proacrosina y la acrosina, que son enzimas presentes en el acrosoma del espermatozoide y se unen con bastante afinidad a la zona sin mediación de su actividad enzimática (Jones, 1991). Es comprensible que estas enzimas, presentes en el interior del acrosoma, se conviertan en sitios de unión del espermatozoide con la zona una vez que éste ha cumplido con la reacción acrosómica, en la llamada fijación secundaria. Lo que todavía no se entiende bien es el hecho de que también pueden actuar como sitios de unión importantes del espermatozoide con el acrosoma intacto, por lo que es muy probable que otras moléculas presentes en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, diferentes a las enzimas acrosómicas, sean las responsables de esta fijación previa a la reacción acrosómica o fijación primaria.

Uno de los modelos propuestos consiste en que el espermatozoide con acrosoma intacto se fija a la zona mediante distintas moléculas de su superficie que se unen a la glicoproteína ZP3, la cual también induce la reacción acrosómica. Después de completarse este proceso, se expone la membrana interna del acrosoma, y la proacrosina y acrosina presentes en ella se fijan a la glicoproteína ZP2 (Bleil et al., 1988; Mortillo and Wassarman, 1991).

El espermatozoide atraviesa relativamente rápido la zona pelúcida aunque se observan diferencias entre distintas especies; por ejemplo, el espermatozoide de hámster tarda de 4 a 10 minutos en cruzar la zona (Yang et al., 1972), mientras que el espermatozoide de ratón lo hace entre 15 y 26 minutos (Sato and Blandau, 1979). En mamíferos euterianos no está claro si las enzimas acrosómicas son primordiales para la penetración en la zona (fig 3-3).

Una hipótesis estrictamente mecánica señala que el espermatozoide requiere de las enzimas acrosómicas únicamente para abrir un pequeño orificio o muesca, denominada *perforatorium*, a través del cual continúa su trayecto por la zona rompiendo las uniones covalentes de las moléculas que la constituyen. Este *perforatorium* que tiene bordes definidos (Austin and Bishop, 1958), casi como un trayecto de corte, depende de la motilidad del espermatozoide y de la presencia de una punta dura en su cabeza, que queda expuesta

después de la reacción acrosómica y que está constituida por la membrana interna del acrosoma que se encuentra reforzada en su parte posterior por una capa de moléculas con enlaces disulfuro (Bedford, 1968; Bedford, 1972). Una evidencia importante que apoya esta teoría es que el uso de proteinasas, que inactivan a las enzimas acrosómicas, inhiben la fijación del espermatozoide a la zona pelúcida; sin embargo, una vez que éste se ha unido a la zona, la adición de proteinasas no impide la penetración del espermatozoide hasta el espacio perivitelino (Saling, 1981).



Figura 3-3.  
Penetración de la zona pelúcida  
por espermatozoides capacitados.

Tomado de Lennart Nilsson. *The Miracle of Life*, 1990.

Otra hipótesis más aceptada considera que la motilidad del espermatozoide es necesaria pero no suficiente para atravesar la zona pelúcida. En esta hipótesis enzimática, en un primer momento las proenzimas acrosómicas actúan como receptores para las glicoproteínas de la zona, asegurando la unión del espermatozoide y posteriormente se convierten en enzimas y degradan la zona por delante de la cabeza del espermatozoide.

Un modelo de funcionamiento de las enzimas acrosómicas es el sistema proacrosina-acrosina. Según este modelo, existe una proenzima inactiva de la acrosina, llamada proacrosina, que tiene gran afinidad de unión por la zona y que, a pesar de ocurrir la reacción acrosómica, parte de ella permanece unida a la membrana interna (Srivasta et al., 1974; Kopekny and Flechon, 1987), lo que permite que el espermatozoide permanezca interactuando con la zona.

La proacrosina liberada durante la reacción acrosómica se une a la zona por delante del espermatozoide y por autocatálisis, se activa al transformarse en alfa-acrosina (Topfer-Petersen and Cechova, 1990), que hidroliza y suaviza la zona pelúcida permitiendo al espermatozoide introducir su cabeza en la sustancia de la zona (Urch et al., 1985a; Urch et al., 1985b). La alfa-acrosina sufre otra conversión autocatalítica transformándose en beta-acrosina la cual hidroliza la zona pero no tiene capacidad de unirse a ella (Eberspaecher et al., 1991). Finalmente, la beta-acrosina se autodegrada perdiendo su capacidad catalítica.

Según este modelo, el espermatozoide avanza lentamente en un ciclo que se repite, durante el cual la proacrosina une el espermatozoide a la zona, se transforma en acrosina degradando las glicoproteínas, con lo que éste se desune de la zona momentáneamente y avanza en la sustancia suave resultante de la hidrólisis de la zona; luego se repite el ciclo nuevamente para otro desplazamiento a través de ella.

Aunque varios espermatozoides se pueden unir al complejo *cumulus*-oocito, normalmente uno sólo de ellos logra fertilizarlo. La polispermia, que es la fecundación del oocito por más de un espermatozoide, lleva a la formación de un cigoto triploide (triploidía diátrica) que se transformará en una mola parcial (Vassilakos et al., 1977; Jacobs et al., 1978) y que puede explicar 15% a 20% de los abortos espontáneos (Lage et al., 1992; McFadden et al., 1993; Jauniaux and Burton, 2005).

Se han señalado dos mecanismos con el fin de evitar la polispermia en animales:

- Bloqueo primario, que ocurre solamente en los conejos y se produce debido a una rápida despolarización de la membrana del oocito que es transitoria y previene la fusión de otro espermatozoide (Yanagimachi, 1994).
- Bloqueo secundario, que consiste en una modificación estructural de la zona pelúcida. En este mecanismo la fusión del espermatozoide con la membrana del oocito induce la llamada reacción cortical, que produce la liberación de enzimas presentes en gránulos del citoplasma del oocito hacia el espacio perivitelino; éstas actúan sobre la zona pelúcida provocando su endurecimiento e inhibiendo la unión de los espermatozoides rezagados. La excitación de dichos gránulos es producida por el influjo de calcio y su efecto sobre enzimas proteinquinas dependientes de calcio/calmodulina (Abbot and Ducibella, 2001).

El cambio estructural de la zona cortical parece deberse al clivaje proteolítico de la ZP2 y quizás a la hidrólisis de los grupos oligosacáridos de la ZP3 (Wassarman, 2005; Wassarman, 1999; Hoodbhoy and Dean, 2004). Se debe recordar que la unión del espermatozoide a la ZP está mediada por los carbohidratos de sus glicoproteínas (Kerr et al., 2004).

Se ha propuesto que la zona pelúcida es una barrera para la fecundación entre especies animales diferentes. Sin embargo, esto no es totalmente cierto puesto que determinadas especies evolutivamente cercanas se pueden fecundar (Bedford, 1981). Hay variaciones entre mamíferos con respecto a este punto y mientras el espermatozoide de ratón es relativamente «promiscuo» en su capacidad de unión a oocitos de otras especies, el espermatozoide humano es muy especie-específico (Bedford, 1977).

### FUSIÓN DEL ESPERMATOZOIDE CON LA MEMBRANA DEL OOCITO

Una vez que el espermatozoide traspasa la zona pelúcida, llega rápidamente al espacio perivitelino y establece contacto con la membrana del oocito (oolema).

En todos los animales, la fusión con el oolema comienza en la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994); sin embargo, en los mamíferos euterianos esto no ocurre así y, a pesar de que éste es el primer lugar de contacto con el oolema, el espermatozoide del mamífero literalmente se acuesta sobre la membrana ovular y la región o segmento ecuatorial de la cabeza es el lugar que inicia la fusión (fig. 3-4) (Phillips and Shalgi, 1982; Shalgi and Phillips, 1980; Ward and Coffey, 1989).

Posteriormente a este punto de inicio, la fusión de las membranas continúa hacia la región posterior de la cabeza y la pieza intermedia para luego incorporar la cola dentro del oocito (Hirao and Hiraoka, 1987). La membrana acrosomal interna nunca se llega a fusionar con el oolema porque la parte anterior de la cabeza del espermatozoide ingresa en el oocito mediante un mecanismo similar a la fagocitosis. Por otro lado, los espermatozoides que no han completado la reacción acrosómica, mediante la cual se expone la membrana interna del acrosoma, son incapaces de fusionarse con el oocito (Yanagimachi, 1984). Se ha propuesto que la reacción acrosómica modifica en alguna forma la región ecuatorial del espermatozoide activando proteínas fusogénicas o removiendo barreras moleculares que impiden la aposición de las membranas (Takano et al., 1993; Diaz-Perez and Meizel, 1992).



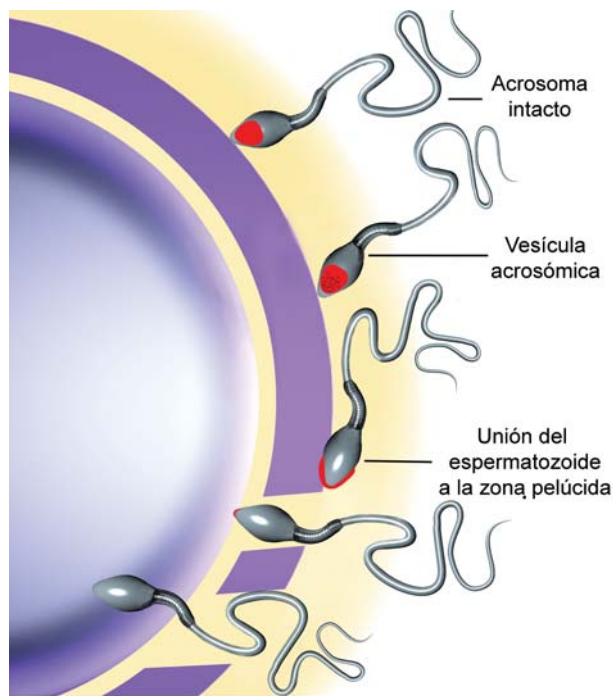


Figura 3-4.  
Unión del espermatozoide con el oolema.

Entre las proteínas responsables de esta fusión se han señalado (Kaki and Kudo, 2004) las siguientes:

- La epididimaria DE/«cysteine-rich secretory protein 1» (CRISP1), descubierta inicialmente en el epidídimo de rata y luego en la superficie del espermatozoide que ha pasado por el epidídimo. Esta proteína se ubica en la región dorsal del acrosoma y, luego de la reacción acrosómica, migra hacia el segmento ecuatorial (Cohen et al., 2000).
- La familia de proteínas ADAM encontrada en el espermatozoide, que incluye la fertilina  $\alpha$  (ADAM 1), la fertilina  $\beta$  (ADAM 2) y la ciritestina (ADAM 3) (Nishimura et al., 2001; Takahashi et al., 2001; Takahashi et al., 2000) y se unen a sus receptores putativos en el oocito.
- Las integrinas (Chen et al., 1999; Almeida et al., 1995), aunque en algunos estudios se ha demostrado que estas últimas no son indispensables para la fusión (He et al., 2003).
- La proteína transmembrana CD9, que parece tener un papel muy importante, como lo demuestran estudios en ratones con deficiencia de la pro-

teína CD9, en los que no se produce fusión del espermatozoide con el oocito (Kaki et al., 2000; Zhu et al., 2002).

El espermatozoide se puede fusionar en cualquier lugar de la superficie del oocito excepto en una pequeña área sobre el huso meiótico, que representa el lugar de extrusión del primer cuerpo polar (Johnson et al., 1975; Ebensperger et al., 1984). Dicha área está desprovista de las microvellosidades que recubren toda la superficie del oocito (Ebensperger et al., 1984), lo que hace suponer que en éstas se deben encontrar los receptores para el espermatozoide. Una vez que entra el espermatozoide, se libera de la cola, y la cabeza con su carga genética busca el pronúcleo del óvulo con el fin de que se unan las cargas genéticas (fig. 3-5).

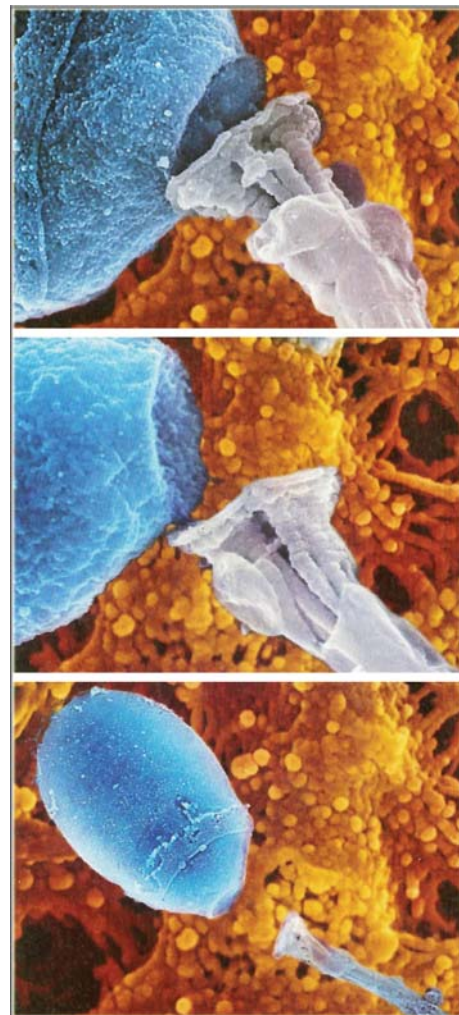


Figura 3-5.  
Desprendimiento de la cola del espermatozoide dentro del citoplasma del óvulo.

Tomado de Lennart Nilsson. *The Miracle of Life*, 1990.

Una vez que se ha producido la fusión con el oocito, los organelos del espermatozoide entran en el ooplasma pero la mayoría se degeneran; un ejemplo son las mitocondrias, que se replican y desprenden de la pieza media después de la fusión, pero permanecen agregadas en el citoplasma del oocito (Sutovsky et al., 1996), para posteriormente ser destruidas selectivamente mediante su fusión con proteosomas (Sutovsky et al., 2000; Alcivar et al., 1989; Hiraoka and Hirao, 1988; Szollosi, 1965). En consecuencia, sólo se heredan las mitocondrias de origen materno.

En la mayoría de los mamíferos, el centriolo del espermatozoide es el responsable de la organización, dentro del ooplasma, del áster, que es una estructura microtubular necesaria para el desplazamiento de los pronúcleos (Simerly et al., 1995). Una excepción la constituye el ratón, en el que la migración de los pronúcleos depende exclusivamente de los centros maternos de organización microtubular (Schatten, 1994).

Poco después de la fusión oocito-espermatozoide la teca perinuclear, que rodea el núcleo del espermatozoide y está constituida por al menos seis proteínas (Sutovsky et al., 1997), es removida, se rompe la envoltura nuclear y la cromatina del espermatozoide se descondensa (Terada et al., 2000).

## ACTIVACIÓN DEL OOCITO

Es el conjunto de señales iniciadas por la fusión del óvulo y el espermatozoide que transforman el oocito en embrión. Algunas ocurren pocos segundos o minutos después de la fusión de los gametos, mientras que otras pueden aparecer en el curso de varias horas (Williams, 2002).

Uno de los eventos más tempranos de la activación del oocito es el aumento del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, que sucede en todas las especies estudiadas hasta el presente y que puede ocurrir en la forma de una meseta única o en forma de picos repetitivos que se inician en el mismo lugar de la penetración del espermatozoide (Santella et al., 2004; Dignonnet et al., 1997; Stricker, 1999). Poco después, el incremento del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular se propaga en forma de oleada en todo el oocito (Deguchi et al., 2000).

En los animales invertebrados, la primera respuesta del huevo al espermatozoide es un súbito cambio en el potencial de membrana ( $V_m$ ), denominado el potencial de fertilización o activación, y su principal función es producir un bloqueo rápido para evitar la polispermia durante los primeros minutos después de

la fertilización (Gould and Stephano, 2003). No se conocen por completo los mecanismos responsables de la formación de este potencial de fertilización en invertebrados (Wilding et al., 1998); sin embargo, se sabe que esta despolarización súbita del potencial de membrana activa canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje que conducen a una súbita elevación inicial del  $\text{Ca}^{++}$  en la corteza, llamado el «flash» cortical (Santella et al., 2004).

Entre los vertebrados, sólo las ranas presentan un bloqueo eléctrico a la polispermia, pero a diferencia de los invertebrados, la despolarización no precede al influjo de  $\text{Ca}^{++}$ , sino que estimula el inositol 1,4,5-trifosfato que a su vez produce un influjo de  $\text{Cl}^-$  responsable del cambio en el potencial de membrana. En los mamíferos, la respuesta electrofisiológica del oocito al espermatozoide consiste en hiperpolarizaciones periódicas de la membrana causadas por la activación de canales de potasio ( $\text{K}^+$ ) dependientes de  $\text{Ca}^{++}$ . Dichas hiperpolarizaciones no tienen nada que ver con el control de la polispermia (Stricker, 1999).

En mamíferos, el incremento de  $\text{Ca}^{++}$  posterior a la fusión espermatozoide-oocito se produce rápidamente en cuestión de minutos. El  $\text{Ca}^{++}$  aumenta desde un nivel basal de 50-100 nmol/l a un pico de 600-1000 nmol/l, dependiendo de la especie (Miyazaki et al., 1993). Esta elevación inicial puede persistir por varios minutos, como en el ratón (Kline and Kline, 1992), o se puede producir en varios incrementos de alta frecuencia, como en el hámster (Miyazaki et al., 1992). Después de esta elevación inicial, se producen oscilaciones repetitivas de  $\text{Ca}^{++}$  con una periodicidad de entre 2 y 30 minutos, que continúan por períodos variables de hasta varias horas, y finalizan en el momento de la formación de los pronúcleos (Jones et al., 1995). Estas oscilaciones no se encuentran en la mayoría de los animales inferiores y son indispensables para la activación del oocito de mamífero y la formación de los pronúcleos (Kline and Kline, 1992).

Para explicar cómo el espermatozoide induce las oscilaciones en el oocito, que generan su activación, se han planteado varias teorías. Una de ellas señala que el espermatozoide actúa como una bomba capaz de introducir  $\text{Ca}^{++}$  en el interior del oocito a través de un transporte activo (Swann and Parrington, 1999). Una modificación posterior de esta teoría, que recibió mayor aceptación, consideró al espermatozoide como un puente o conductor pasivo para el ingreso de  $\text{Ca}^{++}$  en el interior del oocito. Sin embargo, debido a que la activación del oocito se puede realizar en medios de cultivo sin  $\text{Ca}^{++}$  se descartaron ambas teorías.



La posibilidad de inducir las oleadas de  $\text{Ca}^{++}$  a través de la unión entre ligandos presentes en la superficie del espermatozoide y receptores en la membrana del oocito fue planteada basada en los estudios de fecundación en equinodermos (que incluye la estrella, el erizo marino y el pepino de mar) en los cuales el espermatozoide estimula un receptor de la membrana del huevo que está asociado a una proteinquinasa, que a su vez estimula a una fosfolipasa  $\text{C}\gamma$  (Carroll et al., 1997; Giust et al., 2000). En mamíferos, aunque es posible inducir las oleadas de  $\text{Ca}^{++}$  al estimular receptores de la membrana plasmática (Williams et al., 1992; Moore et al., 1993), el bloqueo mediante el uso de anticuerpos contra dichos receptores no impide la activación del oocito en presencia del espermatozoide (Williams et al., 1989).

Por todo lo anterior, la teoría de mayor aceptación hoy en día plantea que el espermatozoide tiene una molécula en su interior denominada factor espermático, que es el responsable de la activación del oocito (Homa and Swann, 1994). Se ha propuesto denominar a este factor oscilógeno, pues debe inducir en el oocito la aparición de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{++}$  características de la fertilización. Existen evidencias de que dicho factor espermático no es especie-específico y tampoco phylum-específico, ya que extractos solubles espermáticos de animales no mamíferos, como aves o anfibios, inducen oscilaciones de  $\text{Ca}^{++}$  al inyectarse en oocitos de ratón (Dale et al., 1999; Howell et al., 2003).

Existen varios candidatos para ser el factor espermático, pero en la mayoría de los casos, no cumplen con todos los requerimientos necesarios para su confirmación definitiva, por lo que se analizarán los dos con mayores probabilidades:

- PT32, «perinuclear theca protein 32 kDa». Es una proteína de la teca que cuando se microinyecta en oocitos porcinos, induce su activación (Sutovsky et al., 2001), por tanto no sería un factor soluble en el citoplasma como se creía anteriormente; sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar esta teoría (Kimura et al., 1998; Perry et al., 2000).
- Fosfolipasa  $\text{C}\zeta$  (PLC $\zeta$ ). Es una proteína espermática de 74 kDa de la familia de la fosfolipasa C (PLC) (Saunders et al., 2002) que se ha encontrado recientemente y se debe considerar como una nueva isoforma de PLC exclusiva del espermatozoide. Esta molécula es capaz de producir oscilaciones de  $\text{Ca}^{++}$  en el oocito idénticas a las que se registran durante la fertilización (Kouchil et al., 2004). El uso de anticuerpos en contra de la PLC $\zeta$  inhibe la ferti-

lización in vitro de mamíferos. Más sorprendente aún es el hecho de que la microinyección de PLC $\zeta$  es capaz de activar el oocito de mamífero, incluyendo el humano, provocar su transformación en embrión, e incluso su desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Saunders et al., 2002; Rogers et al., 2004). Recientemente se ha encontrado la presencia de la PLC $\zeta$  en animales no mamíferos como las aves, lo que sugiere que puede ser un mecanismo de activación del oocito común a todos los vertebrados (Coward et al., 2005).

Para que el factor espermático desencadene las oscilaciones del  $\text{Ca}^{++}$  se requiere del segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), que se produce por la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) debido a la acción de la enzima PLC. El  $\text{IP}_3$  actúa sobre su receptor, el  $\text{IP}_3\text{R}$ , que está presente en la membrana de los organelos que contienen las reservas internas de  $\text{Ca}^{++}$  de la célula, como el retículo endoplasmático, y provocan la liberación de éste en el citoplasma (Miyazaki et al., 1992; Schuster et al., 2002; Xu et al., 1994).

Cuando el  $\text{Ca}^{++}$  alcanza una concentración crítica, el  $\text{IP}_3\text{R}$ , que es un canal, se cierra y el ión reingresa en el reservorio por acción de las ATPasas de  $\text{Ca}^{++}$  presentes en la membrana del retículo endoplasmático (Lechleiter et al., 1998). Además de producirse  $\text{IP}_3$ , la hidrólisis del  $\text{PIP}_2$  también produce sn-1,2 diacilglicerol (DAG), que es otro segundo mensajero cuya concentración se eleva después de la fertilización del oocito, pero su mecanismo de acción aún no se comprende bien (Eckberg and Szuts, 1993).

El incremento del  $\text{Ca}^{++}$  genera todos los eventos posteriores a la fusión del espermatozoide con el oocito. Se dice que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{++}$  son un evento suficiente y necesario en el proceso de activación (Santilla et al., 2004). Una vez activado, el oocito reinicia la meiosis II, lo que ocurre en el momento en el que la cromatina del espermatozoide se descondensa en su citoplasma (Williams, 2002). Como se mencionó en el capítulo 2, el oocito sufre un segundo bloqueo durante la meiosis en el estadio de metafase II y al culminar la meiosis, expulsa el segundo cuerpo polar y se transforma en una célula haploide.

Es importante recordar que en la mayoría de las especies, el oocito no completa su meiosis si no es fertilizado. Existen, sin embargo, algunas excepciones como en el caso del oocito de rata no fertilizado que comúnmente expulsa espontáneamente el segundo cuerpo polar después de 5 horas de cultivo pero sin

formar pronúcleos (Keefer and Schuetz, 1982), y el oocito del hámster dorado que se puede activar espontáneamente al envejecer, formar pronúcleos sin expulsar el cuerpo polar y aun alcanzar el estadio de dos células (Yanagimachi and Chang, 1961).

La activación del oocito no fertilizado se denomina partenogénesis (del griego *parthenos*, que significa virgen). Un ejemplo interesante de partenogénesis espontánea es el teratoma ovárico humano que resulta de la activación de oocitos en el ovario (Linder et al., 1975). La partenogénesis puede también ser inducida in vitro mediante estímulos físicos y mecánicos, la mayoría de los cuales conduce a un incremento del  $Ca^{++}$  intracelular (Yanagimachi, 1994).

El oocito maduro permanece en metafase II antes de la fertilización debido a la actividad del factor promotor de maduración (MPF) (Verlhac et al., 1993) que está constituido por dos subunidades, la quinasa p34cdc2 y la ciclina B1 y es el responsable de inducir en el oocito primario la ruptura de la envoltura nuclear, condensación de cromatina y ensamblaje del huso meiótico (Williams, 2002). Durante el segundo bloqueo del oocito en metafase II, el MPF permanece activo debido a la presencia del factor citostático que evita la degradación de la ciclina B1 y está constituido por las proteínas MOS (Colledge et al., 1994) y Emi 1 (Reimann and Jackson, 2002).

Después de la fusión oocito-espermatozoide, la elevación del  $Ca^{++}$  intracelular conduce a la inactivación del MPF, debido a la degradación de la ciclina B1 (Lorca et al., 1993), y a la inactivación del factor citostático, por la degradación de la proteína MOS (Nishizawa et al., 1993). Otra proteinquinasa importante en la regulación de la meiosis del oocito es la proteinquinasa activada por mitógeno (MAP quinasa), que impide la reorganización de la envoltura nuclear y mantiene a la cromatina condensada durante la transición de meiosis I a meiosis II. Como es muy importante permitir la formación de envoltura nuclear a fin de formar los pronúcleos masculino y femenino, la MAP quinasa se debe desactivar poco después de la fusión espermatozoide-oocito. Esta inhibición de la MAP quinasa es más tardía que la inactivación del MPF a fin de permitir finalizar la meiosis II y expulsar el segundo cuerpo polar (Moos et al., 1995).

El  $Ca^{++}$  liberado durante la fertilización actúa sobre diversos efectores a fin de promover los cambios que transformarán el oocito fertilizado en embrión. La señalización del  $Ca^{++}$  en el oocito no se comprende bien en oocitos de mamífero, y la mayoría de los estudios

se han realizado en el sapo *Xenopus laevis* (Williams, 2002).

Una de las moléculas efectoras es la calmodulina, que es una proteína que se activa al unirse al  $Ca^{++}$  y que a su vez, activa proteinquinasas dependientes de calmodulina (CaMK) y fosfatasas. En oocitos de *Xenopus*, esta molécula regula de forma indirecta la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $IP_3$ , debido a que activa la CaMK II que a su vez ejerce dos efectos: fosforila al receptor de  $IP_3$ , inhibiendo la liberación de  $Ca^{++}$  desde los reservorios intracelulares (Matifat et al., 2001), y activa la enzima que convierte el  $IP_3$  en su forma inactiva  $IP_4$  (Hague et al., 1999). Se ha señalado que en oocitos de mamífero, la inhibición experimental de la CaMKII bloquea la exocitosis de los gránulos corticales y retrasa la formación del segundo cuerpo polar (Tatone et al., 2002; Abbot and Ducibella., 2001). Esta enzima también podría inactivar el MPF al favorecer indirectamente la degradación de la ciclina B (Lorca et al., 1993).

La segunda proteína es la calpaína, la cual se ubica en la región que rodea al huso meiótico del oocito de mamífero (Malcov et al., 1997) y parece controlar el ensamblaje y desincorporación de los microtúbulos del huso (Billger et al., 1988), además de regular proteínas nucleares (Mellgren, 1991); sin embargo, su función precisa no está clara aún.

La proteinquinasa dependiente de  $Ca^{++}$  (PKC), se activa durante la fertilización (Gallicano et al., 1997) y parece estar relacionada con la extrusión del segundo cuerpo polar y la reacción cortical (Abbott and Ducibella, 2001). Finalmente, una fosfatasa de serina y treonina, dependiente de  $Ca^{++}$  y calmodulina, llamada calcineurina, puede estar implicada en el control de la transcripción del genoma del cigoto (Crabtree, 2001).

## EXPULSIÓN DEL SEGUNDO CUERPO POLAR

La activación del oocito conlleva a la formación del segundo cuerpo polar para culminar la segunda división meiótica (fig. 3-6). En este momento el oocito se transforma en una célula haploide debido a que la mitad de sus cromosomas son expulsados en el interior del cuerpo polar. Como en otros casos de división celular, este proceso requiere la acción de los microfilamentos de actina (Le Guen et al., 1989), los cuales se encuentran en la periferia del citoplasma del oocito, en especial en la región cercana al huso meiótico. Estos microfilamentos se encargan de mantener el huso en la periferia del oocito y determinan el eje de divi-



sión celular para la extrusión de los cuerpos polares (Maro et al., 1986). Como se comentó en el capítulo 2, los cuerpos polares poseen muy escasa cantidad de citoplasma debido a la citocinesis asimétrica.



Figura 3-6.  
Liberación del segundo cuerpo polar.

### DESCONDENSACIÓN DEL NÚCLEO ESPERMÁTICO EN EL OOPLASMA

El ADN del espermatozoide de mamífero es el que presenta la mayor condensación o compactación entre todos los animales eucarióticos (Ward and Coffey, 1991) (ver cap. 3). En la espermatogénesis, durante la transformación de espermátide a espermatozoide, se lleva a cabo la compactación de la cromatina, para lo cual se sustituyen las histonas que acompañan a la cromatina por proteínas de transición y, finalmente, por protaminas, que son proteínas ricas en arginina, serina y cisteína (Balhorn et al., 1997; Kistler et al., 1973).

Este reemplazo secuencial de proteínas coincide con la represión de la actividad transcripcional en el núcleo espermático (Ward and Coffey, 1991). Otra modificación exclusiva del núcleo espermático de mamíferos euterianos es la transformación de los grupos sulfhidrilo de la protamina (-SH) en puentes disulfuro (-S-S-), durante la maduración en el epidídimo (Bedford and Calvin, 1974; Calvin and Bedford, 1971), lo que parece conferir al núcleo una resistencia excepcional a la ruptura mecánica o química (Yanagida et al., 1991

Katayose et al., 1992); y le otorga una rigidez que podría facilitar el paso de la cabeza del espermatozoide a través de la zona pelúcida.

El primer cambio visible que ocurre en el núcleo espermático luego de la fusión con el oocito, es la ruptura de la envoltura nuclear, la cual se inicia en el segmento ecuatorial y prosigue hacia adelante y hacia atrás. Este proceso parece estar relacionado con la fosforilación de unas proteínas constituyentes de la envoltura nuclear llamadas lamininas, debido a la acción de una proteinquinasa C (PKC) citosólica (Schatten et al., 1985; Collas, 1998).

La duración de la descondensación de la cromatina espermática varía en cada especie; por ejemplo, en el hámster dorado se inicia a los 20 minutos de la fusión espermatozoide-oocito y se completa en los siguientes 40 minutos (Yanagimachi and Noda, 1970). Mientras que en el humano, se produce después de una hora de haber realizado la inseminación in vitro (Tesarik and Kopecny, 1989a), y es seguida por una recondensación parcial en los 60 minutos siguientes. Entre 120 y 170 minutos después de la inseminación in vitro, se inicia la formación de los pronúcleos (Lassalle and Testart, 1991). Los mecanismos responsables de este proceso no son especie-específicos y el espermatozoide humano se puede desarrollar hasta la etapa de pronúcleo masculino en el interior de oocitos de hámster (Yanagimachi and Noda, 1970) o de rana (Ohsumi et al., 1986).

No se conoce con exactitud la naturaleza del factor que provoca la descondensación del núcleo espermático, pero se sabe que se encuentra sólo en el citoplasma del oocito. En algunas especies como el conejo y el ratón, sólo el oocito maduro tiene la capacidad para realizarla (Berrios and Bedford, 1976; Szollosi et al., 1990) mientras que en el hámster, el oocito en estadio de vesícula germinal (VG) es capaz de inducir la ruptura del núcleo espermático (Usui and Yanagimachi, 1976). En los mamíferos euterianos, en los cuales se encuentran enlaces disulfuro entre sus proteínas nucleares, el primer paso para la descondensación de la cromatina consiste en la reducción de dichos enlaces por acción del glutatión reducido, que es un tripéptido que actúa como cofactor en algunas reacciones redox, el cual abunda en el citoplasma del oocito maduro (Perreault et al., 1988).

Después de esta reacción, se produce el intercambio de protamina por histona en la cromatina espermática que permite la descondensación. Aparentemente, la protamina abandona la cromatina porque es atraída por una proteína presente en el ooplasma,

denominada nucleoplasmina, que interviene en el ensamblaje de los nucleosomas a partir del ADN e histonas y es liberada en grandes cantidades en el ooplasma (citoplasma del oocito) por la ruptura de la vesícula germinal (Ohsumi and Katagiri, 1991); este hecho también explica la incapacidad de inducir descondensación de cromatina en oocitos inmaduros de algunas especies. Una vez que la protamina es extraída de la cromatina, la fracción libre se une a la histona, la cual es abundante en el citoplasma (Philpott and Leno, 1992). Si bien la activación del oocito no es absolutamente necesaria para la descondensación del núcleo espermático, sí lo es para la formación del pronúcleo masculino (Wright and Longo, 1988; Clarke and Masui, 1987).

## HERENCIA DEL CENTROSOMA MASCULINO

Los cromosomas de la célula somática se duplican y se separan durante cada mitosis, mientras que cada gameto contiene la mitad del complemento diploide, es decir, es haploide. Durante la fertilización la fusión de los pronúcleos conduce a la formación de un embrión diploide y a esta fusión se la denomina singamia. La estructura microtubular que organiza a los cromosomas durante la división celular se denomina huso mitótico, el cual es generado por el centrosoma, que es el mayor centro organizador de microtúbulos presente en todas las células animales. A partir de él, los nuevos microtúbulos crecen hacia la periferia formando una pequeña estructura con forma de estrella conocida como áster (Bornens et al., 1990). La nucleación o desarrollo de los microtúbulos a partir del centrosoma posee una polaridad determinada.

Durante la interfase del desarrollo celular, el centrosoma con frecuencia se localiza a un lado del núcleo, cerca de la superficie de la membrana nuclear externa y en el interior presenta un par de estructuras cilíndricas perpendiculares entre sí (en una configuración con forma de L), denominadas centriolos, que presentan un patrón característico de nueve tripletes de microtúbulos similar al que presenta el axonema de los cilios y flagelos, pero sin el par de microtúbulos centrales que este último presenta en su centro.

Tanto en interfase como en metafase, rodeando cada par de centriolos, se encuentra una región del citoplasma que se tiñe oscuro cuando se observa con un microscopio electrónico, denominada material pericentriolar o matriz centrosomal. Ésta es la parte del centrosoma encargada de la regulación de su función y de polimerización de microtúbulos durante las dis-

tintas fases del ciclo de la célula. La composición proteica de la matriz centrosomal sólo se conoce parcialmente (Kalt and Schiwa, 1993) e incluye una forma especial de tubulina llamada gamma-tubulina, la cual puede iniciar la formación del microtúbulo (Oakley et al., 1990), y proteínas reguladoras como la centrina y la pericentrina (Salisbury et al., 1984; Moudjou et al., 1991).

El cigoto de mamífero presenta centriolos en los polos del huso mitótico (Le Guen and Crozet, 1989; Sathananthan et al., 1991), los cuales se han observado en embriones desde el estadio de una sola célula hasta el de blastocisto. Si ambos gametos, oocito y espermatozoide, presentaran sus centrosomas activos, el cigoto entraría en la primera división celular con dos grupos de centrosomas y cuatro centriolos, lo que resultaría en la generación de husos mitóticos anormales multipolares que provocarían aneuploidías y mosaicismos en las blastómeras (Sluder et al., 1989). Por tanto, el centrosoma de uno de los gametos es inhibido y, en la mayoría de las especies animales, desde el erizo marino hasta el ser humano, es el espermatozoide quien aporta el centrosoma funcional al cigoto (Longo, 1963; Szollosi and Hunter, 1973; Crozet, 1990; Long et al., 1993; Schatten, 1994; Palermo et al., 1994). Una excepción a esta regla parecen constituir la el ratón y la rata, pues sus oocitos pueden generar centros de organización de microtúbulos similares al centrosoma espermático (Schatten et al., 1986) y, aún más, el espermatozoide de rata no tiene centriolos (Woolley and Fawcett, 1973).

Los oocitos humanos maduros aparentemente carecen de centriolos y de otros elementos del centrosoma (Sathananthan et al., 1991; Sathananthan et al., 1996). El huso meiótico responsable de la metafase II del oocito de mamífero está localizado en la periferia y es anastral, es decir, carece de centriolos y ásteres (Navara et al., 1994). No se sabe con exactitud cuándo se inactiva el centrosoma del oocito; algunos proponen que las estructuras del centriolo se pierden durante la maduración de la oogonia. Sin embargo, debe persistir alguna estructura capaz de organizar microtúbulos en el gameto femenino ya que el oocito activado partenogénicamente es capaz de clivaje embrionario (Ozil, 1990).

A diferencia del gameto femenino, el espermatozoide humano posee dos centriolos distintos (Sathananthan et al., 1996). El proximal, que está localizado dentro de la pieza intermedia cerca de la placa basal de la cabeza del espermatozoide, y el centriolo distal, que es perpendicular al proximal y está alineado



do con el eje del flagelo; se cree que el centriolo distal da origen al axonema del flagelo durante la espermatogénesis. Después de la fusión de los gametos humanos, la cola del espermatozoide es incorporada dentro del ooplasma y la región centriolar, y permanece en contacto con el núcleo espermático durante la descondensación (Van Blerkom and Davis, 1995). Esta estrecha relación se mantiene durante la formación del pronúcleo masculino. El áster se forma durante la descondensación del núcleo espermático y se cree que, posteriormente, traslada el pronúcleo femenino hacia el centro del cigoto. El centriolo espermático se duplica durante el estadio de pronúcleos y, en el momento de la singamia, se encuentran uno o dos centriolos ubicados en los polos del primer huso mitótico del embrión (Sathananthan et al., 1991; Sathananthan et al., 1996; Simerly et al., 1995).

Se ha señalado que con el uso de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en el tratamiento de la infertilidad masculina, se podrían introducir en el oocito espermatozoides con centrosomas

anormales, particularmente en casos de astenozoospermia. Una posibilidad para el tratamiento de estos casos podría ser la inyección conjunta del espermatozoide del paciente con colas espermáticas aisladas de un donante (Palermo et al., 1997).

### FORMACIÓN DE PRONÚCLEOS Y SINGAMIA

La formación de los pronúcleos en el oocito humano comienza entre los 120 y 170 minutos después de la inseminación in vitro (Lassalle and Testart, 1991), generalmente a las 12 horas son visibles en el cigoto (Tesarik and Kopečný, 1989a), y entre 4 y 8 horas más tarde se pueden observar unidos en su centro (fig. 3-7). Los cigotos masculino y femenino aparecen simultáneamente y, en algunas especies, (Lasalle and Testart, 1991) como el ratón y la rata (Austin, 1952), el pronúcleo masculino es mayor que el femenino, mientras que en otras, como el hámster y el humano, son de igual tamaño (Austin, 1956).

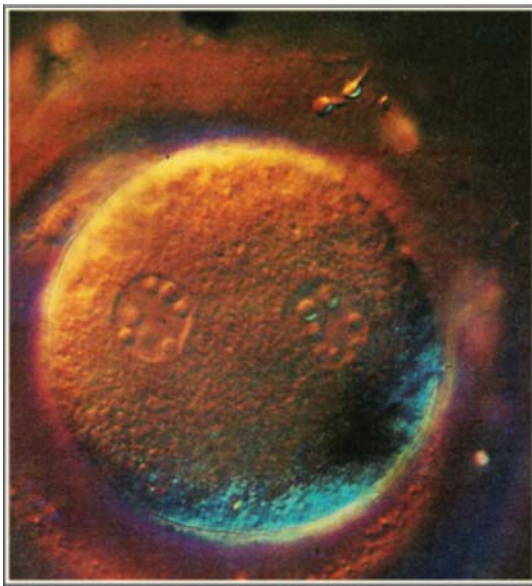


Figura 3-7.  
Proceso de unión de los pronúcleos (singamia).

Tomado de Lennart Nilsson. *The Miracle of Life*, 1990.

En el cigoto humano, no existe una forma precisa de diferenciar cuál es el pronúcleo de origen materno o paterno (Gordon et al., 1989), pues aunque se ha señalado que el femenino está usualmente localizado más cerca del segundo cuerpo polar, esto no siempre se cumple. En el interior de ambos pronúcleos son visibles gránulos densos que tienen la función de formar los nucléolos del embrión y se denominan cuerpos pre-

cursores nucleolares. Éstos no sólo son diferentes entre distintas especies con respecto a su tamaño y morfología, sino que además presentan composición molecular desigual (Flechon and Kopečný, 1998). En los cigotos humanos se le ha dado importancia a la descripción morfológica de estos precursores nucleolares con el fin de evaluar el potencial de desarrollo del embrión (Tesarik and Greco, 1999).

Cada pronúcleo posee una cromátide única de cada cromosoma; con el fin de otorgar un complemento a cada una de las dos blastómeras que provienen de la primera mitosis del embrión, se debe realizar la replicación del ADN en la que cada cromosoma estará constituido por dos cromátides unidas por sus centrómeros (la llamada fase S del ciclo celular). La síntesis o replicación del ADN se produce en el cigoto dentro de cada pronúcleo y ocurre casi simultáneamente en el femenino y el masculino. En el ratón este proceso comienza 8 horas después de la fertilización cuando ya es visible un nucléolo en el pronúcleo y se completa en las siguientes 8 horas (Krishna and Generoso, 1977); mientras que en el humano, la síntesis de ADN se inicia aproximadamente a las 12 horas de la fertilización (Tesarik and Kopecny, 1989b).

Los procesos que controlan la formación de pronúcleos en el cigoto son los mismos que originan la reconstitución nuclear después de la mitosis de células somáticas (Collas, 1998). Se constituyen por la fusión de vesículas citoplasmáticas, inicialmente a la cromatina y luego entre sí (Vigers and Lohka, 1991; Wilson and Newport, 1988). El citoesqueleto del oocito y el áster espermático permiten que los pronúcleos masculino y femenino migren desde la periferia hacia el centro del oocito fertilizado para luego fusionarse, proceso que se denomina singamia (Longo, 1963; Pickering et al., 1988).

## DESARROLLO TEMPRANO DEL EMBRIÓN PREIMPLANTACIÓN

El cigoto, con su nuevo potencial genético, comenzará el desarrollo hacia un organismo multicelular; los eventos iniciales en este proceso son el clivaje y la gastrulación. En el primero, se producen rápidas divisiones celulares que distribuyen el enorme citoplasma del oocito fertilizado entre numerosas células hijas nucleadas.

La gastrulación en el embrión humano se produce después de la implantación y consiste en el dramático desplazamiento de células de acuerdo a su respectivo destino para formar las capas del disco germinativo trilaminar (Gilbert, 1997).

Después de la fertilización, el cigoto se divide por mitosis en varias células más pequeñas denominadas blastómeras (Sandler, 2000). El clivaje en los cigotos de mamífero es uno de los más lentos del reino animal y se produce de 12 a 24 horas después de la fertilización. Otra característica típica de mamíferos es la orientación única de las blastómeras entre sí: en el primer

clivaje es meridional, como en muchos embriones no mamíferos; sin embargo, en el segundo, una de las blastómeras se divide meridionalmente pero la otra lo hace en sentido ecuatorial, lo que se denomina clivaje rotacional (Gulyas, 1975) (fig. 3-8).

A diferencia de los mamíferos, el clivaje en equinodermos y anfibios es radial, es decir, la primera división y la segunda son meridionales y, posteriormente es ecuatorial. Aunque el clivaje de los nemátodos es rotacional como en los mamíferos, no se desarrolla hasta blastocisto, que es una estructura característica de los mamíferos.

Este proceso es al principio sincrónico con la aparición de 2, 4, 6, 8, células, etc., aunque, a medida que aumenta el número de blastómeras, puede desaparecer esta sincronización sin afectar el potencial del embrión y muchos poseen un número impar de células, fenómeno que es muy frecuente en embriones de mamífero.

El mecanismo de mitosis en el embrión es similar al que se verifica en las células somáticas; sin embargo, en estas últimas, la multiplicación solamente se reinicia cuando las células hijas alcanzan el tamaño de la que la originó. Por el contrario, durante el clivaje se producen blastómeras cuyo volumen es la mitad del de la célula madre.

La inducción de la mitosis en el cigoto se debe al efecto del factor promotor de mitosis, «mitosis promoting factor»: MPF, el cual regula el ciclo bifásico de las blastómeras tempranas (Gerhart et al., 1984). En efecto, las blastómeras presentan un ciclo de división celular que consta de dos pasos: la fase de síntesis (S) y la de mitosis (M); debido a que está abolido el período de crecimiento entre divisiones celulares, es decir, las fases G1 y G2 del ciclo celular. Por esta razón, el tamaño de la blastómera en las divisiones tempranas es cada vez menor.

La actividad del MPF también presenta un comportamiento bifásico: es alta durante la fase S e indetectable durante la mitosis (Newport and Kirschner, 1984). Como se mencionó en el capítulo 2, el MPF consta de dos subunidades: la ciclina B y la quinasa dependiente de ciclina, «cyclin-dependent kinase»: cdc. La mayor subunidad es la ciclina B y es la que demuestra una variación periódica en su actividad durante el ciclo celular, acumulándose durante la fase S y disminuyendo una vez que la célula se encuentra en mitosis (Evans et al., 1983; Swenson et al., 1986; Minshull et al., 1989).



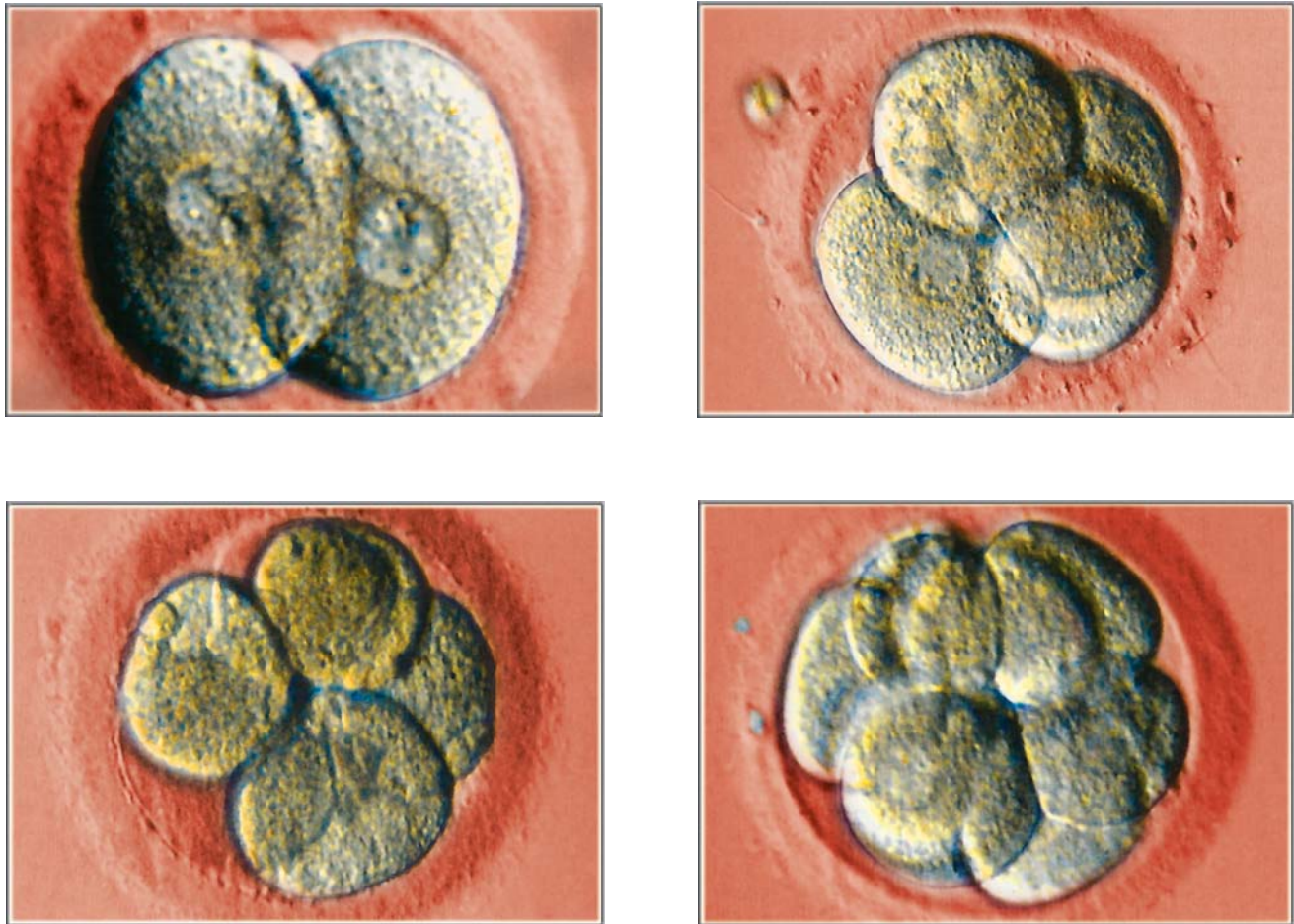


Figura 3-8.  
División del embrión en 2, 4, 6 y 8 células.

En las primeras etapas del desarrollo del embrión preimplantación, las blastómeras son totipotenciales, es decir, que cada una es capaz de desarrollar cualquier tejido embrionario o extraembrionario del *conceptus*. A medida que el clivaje progresa, aparecen diferencias y especializaciones en las blastómeras, que producen las llamadas líneas celulares, las cuales originarán más adelante un tejido o grupo de tejidos específico (Edwards and Beard, 1997).

En mamíferos, durante el período de clivaje, el cigoto permanece pocos días en el oviducto, mientras los cilios y el peristaltismo de la trompa lo empujan hacia el útero. Aproximadamente en la tercera división celular, cuando el embrión tiene de 6 a 8 células, comienza el proceso de compactación que genera la formación de una mórula de 16 a 32 células. En el humano, esto coincide con el cuarto día del desarrollo embrionario y con su paso hacia la cavidad uterina.

Es posible dividir al embrión preimplantación en un período precompactación que se verifica en el oviducto y en un período postcompactación, el cual ocurre en la cavidad uterina, comienza con la mórula y termina con el estadio de blastocisto (fig. 3-9). Durante el período precompactación, hasta que el embrión adquiere 6 a 8 células, las blastómeras están bien delimitadas unas de otras, presentan forma esférica y se mantienen unidas gracias a la zona pelúcida. Durante la compactación, que se verifica en el cuarto día del desarrollo embrionario humano, las blastómeras establecen unión y aplanamiento entre sí hasta el punto en que no es posible diferenciar una de otra.

La mórula posee de 16 a 32 células, algunas de las cuales se comienzan a ubicar en el interior del embrión, aisladas totalmente del espacio perivitelino por capas de células externas, y darán origen a la masa celular interna del blastocisto (Pedersen et al., 1986). Se ha

demostrado que el fenómeno de compactación se acompaña de la polarización del citoplasma y de la membrana celular de la blastómera. Cada célula del embrión compactado presenta microvellosidades densas en la superficie libre de contacto y ausencia de éstas en las zonas de contacto con las blastómeras veci-

nas (Nikas et al., 1996), así como polarización en el citoplasma. La comunicación intercelular se verifica a través de uniones estrechas que comienzan a aparecer en el embrión de 8 células, pero no están bien desarrolladas hasta el estadio de blastocisto temprano (Dale et al., 1991).

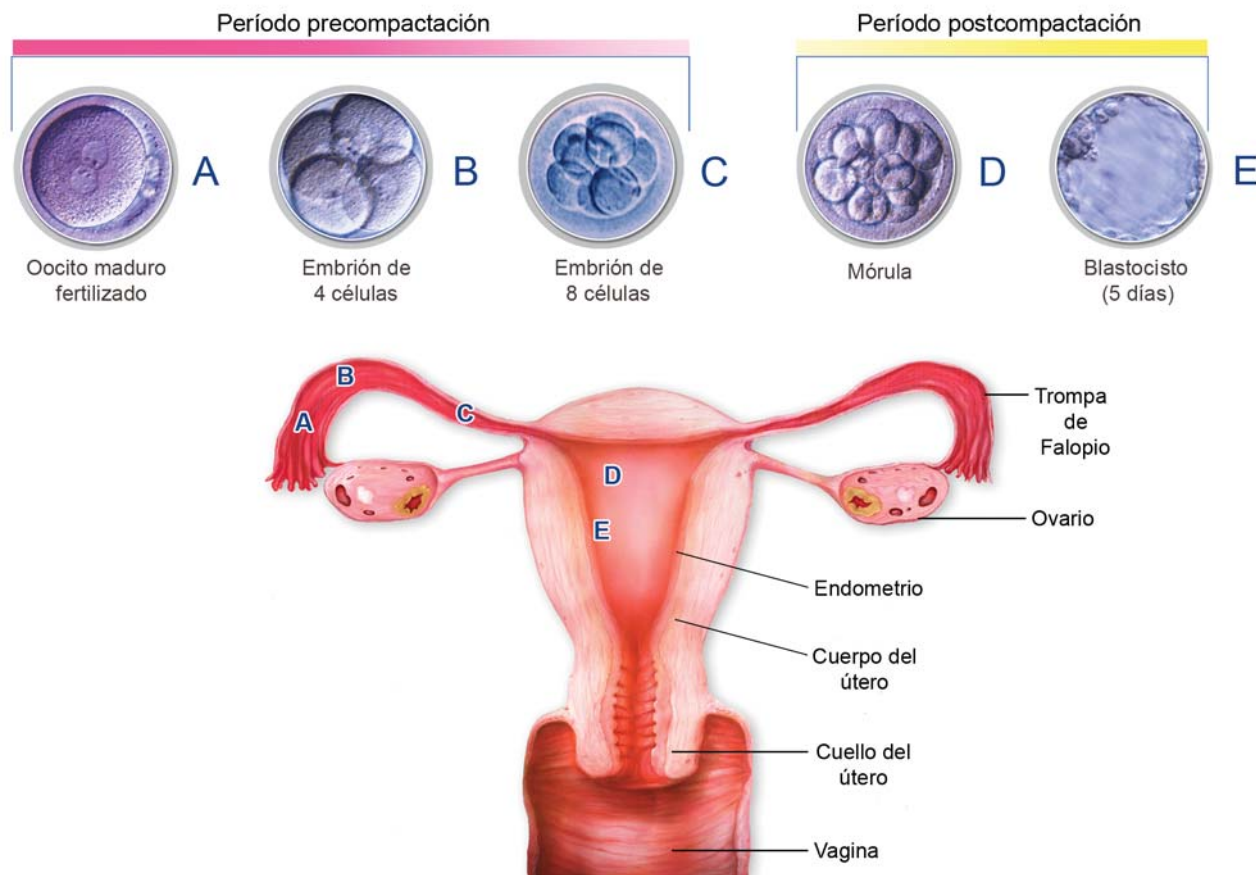


Figura 3-9.  
Estadios de crecimiento del embrión.

Se desconocen los factores que activan la compactación, aunque existen evidencias experimentales que sugieren que puede estar involucrada en las modificaciones postransduccionales de algunas proteínas como la E-caderina. Ésta se encuentra en el oocito y en todos los estadios del desarrollo preimplantación, distribuida uniformemente en la superficie de las blastómeras, pero durante la compactación se acumula en las regiones de contacto intercelular (Elder and Dale, 2000).

En el humano, en el cuarto o quinto día aparece el blastocisto temprano, que resulta de la cavitación de la mórula debido al incremento en la actividad de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa, la cual conduce a un transporte de sodio hacia el interior del embrión seguido del paso de agua por ósmosis (Borland, 1997, Wiley, 1984).

La forma del blastocisto varía de especie a especie pero, en general, está constituido principalmente por una capa celular externa denominada trofoblasto que rodea a una cavidad llamada blastocele en cuyo interior, adosado a la pared interna del trofoblasto, se desarrolla un cúmulo de células que darán origen al embrión y se denominan embrioblasto o masa celular interna (Dyce et al., 1987). La presencia del embrioblasto en el interior del blastocele permite que la masa de células que dará origen al embrión propiamente dicho se desarrollen en un ambiente líquido específico con la presencia de proteínas que influyen en el crecimiento y diferenciación celular (Tanaka et al., 1998). Las células del trofoblasto darán origen a la placenta y a los tejidos extraembrionarios.



Es interesante el hecho de la presencia de mosaicismos cromosómicos en las células trofoectodérmicas en muchos animales con complementos cromosómicos 2n, 4n y 8n. Se ha propuesto que la presencia de células tetraploides y multiploides se podría deber a que replican ADN, pero no se llegan a dividir y son de gran tamaño, cuya significación es un misterio. En el humano, esto se puede relacionar con la formación del sincitiotrofoblasto.

Al final del quinto o principio del sexto día, se produce la expansión del blastocisto por acumulación activa de líquido en el blastocele. La eclosión o ruptura de la zona pelúcida, que se analiza en el capítulo 4, es un proceso mixto enzimático y mecánico del embrión que le permite abandonarla. Se cree que para que ocurra es necesaria la intervención de una proteasa similar a la tripsina, denominada estripsina, que está presente en las células del trofoblasto y rompe la matriz de la zona pelúcida (Perona and Wassarman, 1986). El endometrio también podría contribuir mediante la presencia de enzimas proteolíticas, pero no se conocen con exactitud las bases moleculares de la eclosión.

La apoptosis, o muerte celular programada, interviene en la regulación del tipo y número de células del embrión, se produce por primera vez en el blastocisto, predominantemente en la masa celular interna (Hardy, 1997), y parece ser un mecanismo importante en su desarrollo.

### ACTIVACIÓN DEL GENOMA DEL ZIGOTO

La implantación y el desarrollo exitoso del embrión dependen de la capacidad que tenga de iniciar y regular la expresión de la nueva información genética heredada del padre y la madre. En la mayoría de las especies animales no mamíferos, las primeras divisiones celulares del embrión están completamente controladas por proteínas y ARN mensajero (ARNm) almacenado en el oocito (Gilbert, 1997).

Debido a que durante el clivaje temprano el volumen de cada célula no sufre incrementos porque se encuentra abolido el período de crecimiento entre las divisiones celulares, se produce una disminución progresiva de la proporción entre el volumen del citoplasma y el del núcleo, que, en animales inferiores como el *Xenopus* o *Drosophila*, permite la activación de ciertos genes del embrión que nunca se expresan antes de la duodécima división y que se ha denominado transición mesoblastular (Newport and Kirschner, 1982; Edgar et al., 1986).

En los mamíferos, el genoma del cigoto transmitido por mitosis a todas las nuevas células, tampoco funciona en los embriones tempranos, pero se activa más precozmente que en los invertebrados y por mecanismos diferentes. El genoma nuevo se debe activar a fin de sustituir el ARN mensajero (ARNm) y las proteínas derivadas del oocito por las derivadas exclusivamente del embrión. Esta transición desde la activación del genoma oocitario materno al genoma del embrión, se conoce como la activación del genoma del cigoto (Schultz, 1993) e involucra tres pasos sucesivos (Nothias et al., 1995):

- La detención de la transcripción de los genes maternos y la depleción del ARNm materno.
- El inicio de la transcripción de los genes del embrión y la aparición de ARNm de origen embrionario con la aparición de proteínas embrionarias.
- El desarrollo de una estructura funcional del nucleosoma denominada la región organizadora nuclear, «nuclear organizing region»: NOR.

La activación del genoma del cigoto se produce en distintos momentos del desarrollo embrionario de acuerdo a la especie, como se señala en la tabla 3-1.

Tabla 3-1.  
Momento de la activación del genoma embrionario en distintos animales.

Animal	Estadio celular (células)
Conejo	1-2
Ratón	2
Vaca	4-8
Humano	4
Mosca <i>Drosophila</i>	4.000
Sapo <i>Xenopus</i>	5.000

(Elder and Dale, 2000).

En la mayoría de los casos, la activación principal del genoma está precedida por una activación temprana con mínima actividad transcripcional (Nothias et al., 1995). Por ejemplo, en el ratón, la activación del genoma durante el estadio de dos células está precedida de poca actividad transcripcional en el estadio de una célula. En el humano, se ha detectado la presencia de transcritos muy tempranos de dos cromosomas de origen paterno presentes en el cromosoma Y, el ZFY y el SRY, los cuales aparecen durante el estadio de

pronúcleos, 20-24 horas después de la inseminación in vitro (Ao et al., 1994), a pesar de que la activación del genoma embrionario ocurre principalmente en el estadio de cuatro células.

En mamíferos, este proceso parece depender del tiempo transcurrido desde la fusión del espermatozoide con el oocito y no del ciclo celular. Esto ha generado la hipótesis del reloj del cigoto, según la cual se retrasa la activación del nuevo genoma embrionario hasta que los genomas maternos y paternos se han replicado y han sido remodelados, a fin de cambiar las características propias del período postmeiosis. Esto asegura que los genes del embrión no se expresen hasta el momento apropiado del desarrollo embrionario. Aparentemente, la represión inicial del genoma del embrión se debe a cambios en la estructura de la cromatina (Adenot et al., 1997) y no a modificaciones atribuibles al aparato de transcripción; de tal forma que la estructura de la cromatina sería la responsable del reloj de activación del cigoto (Nothias et al., 1995).

Los genes heredados por el embrión deben ser modificados a fin de asegurar un apropiado funcionamiento del genoma. Estas modificaciones, que se conocen con el nombre de programación epigenética, involucran cambios bioquímicos sin alterar la secuencia del gen y son muy importantes en el embrión preimplantación porque controlan el crecimiento y desarrollo embrionario (De Rycke et al., 2002). El «imprinting» genético es un tipo de modificación epigenética mediante la cual un gen es inactivado permanentemente (Surani et al., 1986).

En el embrión usualmente se expresan dos copias o alelos, uno de origen materno y otro de origen paterno; sin embargo, en algunas ocasiones, es necesario que uno sólo se exprese, para lo cual el otro alelo debe ser inactivado. Un ejemplo lo constituye el gen que codifica al factor de crecimiento 2 similar a la insulina, «insulin-like growth factor-2»: IGF2; en este caso sólo se debe expresar el alelo de origen paterno y se debe inactivar al alelo de origen materno. Si ambos se expresan por un «imprinting» inadecuado, existe un alto riesgo de la aparición de un tumor de origen embrionario denominado nefroblastoma o tumor de Wilm's (Niemitz and Feinberg, 2004). En humanos se han identificado unos 80 genes que requieren «imprinting» y existen evidencias que sostienen que este proceso comienza durante la gametogénesis y también se produce en el cigoto (Sapienza et al., 1987).

Las anomalías de los cambios epigenéticos se han relacionado con alteraciones del crecimiento fetal

y malformaciones congénitas, como el síndrome de Beckwith-Wiedemann (DeBaun et al., 2003), el síndrome de Angelman (Orstavik et al., 2003) y el retinoblastoma (Moll et al., 2003). Aunque la incidencia de enfermedades relacionadas con alteraciones del «imprinting» en la población general es menor de 1%, se ha planteado la posibilidad de que las técnicas de reproducción asistida puedan favorecer su aparición debido a la inducción de estrés celular en el embrión (Niemitz and Feinberg, 2004). En la actualidad, se trabaja activamente en el conocimiento del genoma del embrión, lo que permitirá discernir los mecanismos que controlan la expresión de genes embrionarios (Adjaye et al., 1998).

## RESUMEN

Durante la fecundación, dos células sexuales o gametos se unen para iniciar una cascada de señales que resulta en la conversión del oocito en un embrión diploide capaz de formar un nuevo organismo.

Tanto en el hombre como en la mayoría de los mamíferos euterianos, el semen es depositado en la vagina, y el canal cervical constituye el sitio anatómico de selección de los espermatozoides, así como el lugar en el que se inicia su capacitación dentro del tracto genital femenino. Sólo los espermatozoides que han llevado a cabo el proceso de exocitosis, denominado reacción acrosómica, lograrán atravesar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana del oocito. Mediante esta reacción, ocurre la unión entre la membrana acrosómica externa y la membrana celular del espermatozoide, lo que genera la aparición de fenestraciones entre ambas que permiten la salida del contenido del acrosoma; éste es un proceso gradual en los espermatozoides del eyaculado y no se lleva a cabo de forma simultánea en todos.

El *cumulus oophorus* está constituido por células de la granulosa y una matriz extracelular laxa que está compuesta principalmente por ácido hialurónico polimerizado y que es secretada por las células de la granulosa durante el reinicio de la meiosis en el oocito. Su función es la de favorecer la entrada de los espermatozoides de mejor calidad dentro del oocito, lo cual se logra mediante un proceso que combina una acción mecánica y una enzimática.



La zona pelúcida varía en su estructura y su grosor de una especie a otra aunque, en la mayoría de los casos, presenta una capa densa que ocupa la mitad interna y una capa más laxa en su porción externa. La interacción de ésta y el espermatozoide es un fenómeno complejo y específico de cada especie que puede ser dividido en dos grandes procesos: la fijación primaria, en la que el espermatozoide se une a la zona pelúcida con el cromosoma intacto; y la fijación secundaria, en la que los espermatozoides se unen después de haber completado la reacción acrosómica.

El primer lugar de contacto del espermatozoide con el oolema es la membrana acrosomal; sin embargo, éste se acuesta sobre la membrana ovular y la región o segmento ecuatorial de la cabeza es el lugar que inicia la fusión. Posteriormente a este punto de inicio, continúa hacia la región posterior de la cabeza y la pieza intermedia para luego incorporar la cola dentro del oocito.

La activación del oocito es el conjunto de señales iniciadas por la fusión del óvulo y el espermatozoide que lo transforman en embrión. Algunas ocurren pocos segundos o minutos después de la fusión de los gametos, mientras que otras pueden aparecer en el curso de horas y uno de los eventos más tempranos de este proceso es el aumento del calcio intracelular. Esta activación conlleva la formación del segundo cuerpo polar para culminar la segunda división meiótica. En ese momento, el oocito se transforma en una célula haploide debido a que la mitad de sus cromosomas son expulsados en el interior del cuerpo polar.

El primer cambio visible que ocurre en el núcleo espermático luego de la fusión con el oocito, es la ruptura de la envoltura nuclear, la cual se inicia en el segmento ecuatorial y prosigue hacia adelante y hacia atrás, para completar la descondensación de la cromatina, que es indispensable para la formación del pronúcleo masculino. La formación de los pronúcleos en el oocito humano comienza entre los 120 y 170 minutos después de la inseminación in vitro, generalmente a las 12 horas son visibles en el cigoto y entre 4 y 8 horas más tarde se pueden observar unidos en su centro.

El cigoto, con su nuevo potencial genético, comenzará el desarrollo hacia un organismo multicelular y los eventos iniciales en este proceso son el clivaje, mediante el cual se producen rápidas divisiones celulares que distribuyen el enorme citoplasma del

oocito fertilizado entre numerosas células hijas nucleadas, y la gastrulación, que consiste en el dramático desplazamiento de células de acuerdo a su respectivo destino para formar las capas del disco germinativo trilaminar.

Es posible dividir el embrión preimplantación en un período precompactación que se verifica en el oviducto y un período postcompactación, el cual ocurre en la cavidad uterina, comienza con la mórula y termina con el estadio de blastocisto.

La implantación y el desarrollo exitoso del embrión dependen de la capacidad que tenga de iniciar y regular la expresión de la nueva información genética heredada del padre y de la madre. El genoma nuevo se debe activar a fin de sustituir el ARN mensajero (ARNm) y las proteínas derivadas del oocito por las derivadas exclusivamente del embrión. Esta transición desde la activación del genoma oocitario materno al genoma del embrión se conoce como la activación del genoma del cigoto.

## REFERENCIAS

- ABBOTT A, DUCIBELLA T (2001). Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci*; 6:D792-D806.
- ABOU-HAILA A, TULSIANI D (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. *Arch Biochem Biophys*; 379(2):173-182.
- ADENOT P, MERCIER Y, RENARD J, THOMPSON E (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*; 124:4615-4625.
- ADJAYE J, DANIELS R, MONK M (1998). The construction of cDNA libraries from human single preimplantation embryos and their use in the study of gene expression during development. *J Assist Reprod Genet*; 15(5):344-348.
- ALCIVAR A, HAKE L, MILLETTE C, TRASLER J, HECHT N (1989). Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Dev Biol*; 135(2):263-271.
- ALLISON A, HARTREE E (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fertil*; 21(3):501-515.
- ALMEIDA E, HUOVILA A, SUTHERLAND A, STEPHENS L, CALARCO P, SHAW L, MERCURIO A, SONNENBERG A, PRIMAKOFF P, MYLES D, WHITE J (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*; 81(7):1095-1104.
- ANDERSON R JR, FEATHERGILL K, DE JONGE C, MACK S, ZANAVELD L (1992). Facilitative effect of pulse addition

- of dibutyryl cAMP on the acrosome reaction of noncapacitated human spermatozoa. *J Androl*; 13(5):398-408.
- ANDERSON R, FEATHERGILL K, DRISDEL R, RAWLINS R, MACK S, ZANEVELD L (1994). Atrial natriuretic peptide (ANP) as a stimulus of the human acrosome reaction and a component of ovarian follicular fluid: correlation of follicular ANP content with in vitro fertilization outcome. *J Androl*; 15:61-70.
- AO A, ERICKSON R, WINSTON R, HANDYSIDE A (1994). Transcription of paternal Y-linked genes in the human zygote as early as the pronucleate stage. *Zygote*; 2(4):281-287.
- AUSTIN C (1952). The development of pronuclei in the rat egg, with particular reference to quantitative relations. *Aust J Sci Res*; 5:354-365.
- AUSTIN C (1956). Ovulation, fertilization and early cleavage in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J R Microsc Soc*; 75(3):141-154.
- AUSTIN C (1960). Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *J Reprod Fertil*; 1:310-311.
- AUSTIN C, BISHOP M (1958). Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc R Soc Lond (Biol)*; 149:241-248.
- BALHORN R, GLEDHILL B, WYROBEK A (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry*; 16:4074-4080.
- BEDFORD J (1968). Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. *Am J Anat*; 123(2):329-358.
- BEDFORD J (1972). An electron microscopy study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. *Am J Anat*; 133:213-254.
- BEDFORD J (1977). Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anatomical Record*; 188:477-488.
- Bedford J (1981). Why mammalian gametes don't mix. *Nature*; 291(5813):286-288.
- BEDFORD J, CALVIN H (1974). The occurrence and possible functional significance of -S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool*; 188(2):137-155.
- BENOFF S (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod*; 3(7):599-637.
- BERRIOS M, BEDFORD J (1979). Oocyte maturation: aberrant post-fusion responses of the rabbit primary oocyte to penetrating spermatozoa. *J Cell Sci*; 39:1-12.
- BIELFELD P, ZANEVELD L, DE JONGE C (1994). The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases. *Fertil Steril*; 61(3):536-541.
- BILLGER M, WALLIN M, KARLSSON J (1988). Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell Calcium*; 9:33-44.
- BLACKMORE P, BEEBE S, DANFORTH D, ALEXANDER N (1990). Progesterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem*; 265:1376-1380.
- BLEIL J, GREVE J, WASSARMAN P (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol*; 128:376-385.
- BORLAND R (1977). Transport processes in the mammalian blastocyst. *Dev Mammals*; 1:31-67.
- BORNENS M, BAILLY F, KERYER G (1990). The centrosome: recent advances on structure and functions. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*; 11:86-114.
- BRADLEY M, GARBERS D (1983). The stimulation of bovine caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus-egg complexes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*; 115:777-787.
- BRANDELLI A, MIRANDA P, TEZON J (1996). Voltage-dependent calcium channels and Gi regulatory protein mediate the human sperm acrosomal exocytosis induced by N-acetylglucosaminyl/mannosyl neoglycoproteins. *J Androl*; 17:522-529.
- BREITBART H, SPUNGIN B (1997). The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*; 3:195-202.
- BRYAN JH (1974). Capacitation in the mouse: the response of murine acrosomes to the environment of the female reproductive tract. *Biol Reprod*; 10(4):414-421.
- BURKS D, CARBALLADA R, MOORE H, SALING P (1995). Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science*; 269:83-86.
- CALVIN H, BEDFORD J (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil*; 13:S1365-S1375.
- CARROLL D, RAMARAO C, MEHLMANN L, ROCHE S, TERASAKI M, JAFFE L (1997). Calcium release at fertilization in starfish eggs is mediated by phospholipase C $\gamma$ . *J Cell Biol*; 138:1303-1311.
- CHEN M, TUNG K, COONROD S, TAKAHASHI Y, BIGLER D, CHANG A, YAMASHITA Y, KINCADE P, HERR J, WHITE J (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin  $\alpha 6 \beta 1$ : implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96(21):11830-11835.
- CHERR G, LAMBEN H, MEIZEL S, KAU D (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zonae pelluzidae. *Dev Biol*; 114:119-131.



- CLARKE H, MASUI Y (1987). Dose-dependent relationship between oocyte cytoplasmic volume and transformation of sperm nuclei to metaphase chromosomes. *J Cell Biol*; 104:831-840.
- COHEN D, ELLERMAN D, CUASNICU P (2000). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod*; 63:462-468.
- COLLAS P (1998). Cytoplasmic control of nuclear assembly. *Reprod Fertil Dev*; 10(7-8):581-592.
- COLLEDGE W, CARLTON M, UDY G, EVANS M (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*; 370(6484):65-68.
- COWARD K, PONTING C, CHANG H, HIBBITT O, SAVOLAINEN P, JONES K, PARRINGTON J (2005). Phospholipase Czeta, the trigger of egg activation in mammals, is present in a non-mammalian species. *Reproduction*; 130(2):157-163.
- COX J (1991). Effect of the cumulus on in vitro fertilization of in vitro matured cow and sheep oocytes. *Theriogenologia*; 35:1914.
- CRABTREE G (2001). Calcium, calcineurin and the control of transcription. *J Biol Chem*; 276(4):2313-2316.
- CROZET N (1990). Behaviour of the sperm centriole during sheep oocyte fertilization. *Eur J Cell Biol*; 53(2):326-332.
- CROZET N, DUMONT M (1984). The site of the acrosome reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. *Gamete Res*; 10:97-105.
- CUMMINS J, YANAGIMACHI R (1982). Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete Res*; 5:239-256.
- CUMMINS J, YANAGIMACHI R (1986). Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res*; 15:187-212.
- DALE B, MARINO M, WILDING M (1999). Sperm-induced calcium oscillations: soluble factor, factors o receptors? *Mol Hum Reprod*; 1:1-4.
- DALE B, SANTELLA L, TOSTI E (1991). Gap junctional permeability in early and cleavage arrested ascidian embryos. *Development*; 112:153-160.
- DE JONGE C, HAN H, MACK S, ZANEVELD L (1991). Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J Androl*; 12:62-70.
- DE RYCKE M, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A (2002). Epigenetics risks related to assisted reproductive technologies. *Hum Reprod*; 17(10):2487-2494.
- DEBAUN M, NIEMITZ E, FEINBERG A (2003). Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet*; 72:156-160.
- DEGUCHI R, SHIRAKAWA H, ODA S, MOHRI T, MIYAZAKI S (2000). Spatiotemporal analysis of Ca<sup>2+</sup> waves in relation to the sperm entry site and animal-vegetal axis during Ca<sup>2+</sup> oscillations in fertilized mouse eggs. *Dev Biol*; 218:299-313.
- DIAZ-PEREZ E, MEIZEL S (1992). Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. *Mol Reprod Dev*; 31(2):122-130.
- DIGONNET C, ALDON D, LEDUC N, DUMAS C, ROUGIER M (1997). First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization. *Development*; 124(15):2867-2874.
- DROBNIS E, OVERSTREET J (1992). Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. In: MILLIGAN S (ed.). *Oxford Review of Reproductive Biology*. New York: Oxford University Press.
- DROBNIS E, YUDIN A, CHERR G, KATZ D (1988). Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res*; 21:367-383.
- DYCE J, GEORGE H, GOODALL H, FLEMING T (1987). Do trophoblast and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? *Development*; 100(4):685-698.
- EBENSPERGER C, BARROS C (1984). Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *Gamete Res*; 9:387-397.
- EBERSPAECHER U, GERWIEN J, HABENICHT U, SCHLEUNING W, DONNER P (1991). Activation and subsequent degradation of proacrosin is mediated by zona pellucida glycoproteins, negatively charged polysaccharides and DNA. *Mol Reprod Dev*; 30:164-170.
- ECKBERG W, SZUTS E (1993). Diacylglycerol content of Chaetopterus oocytes during maturation and fertilization. *Dev Biol*; 159:732-735.
- EDGAR B, KIEHLE C, SCHUBIGER G (1986). Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early Drosophila development. *Cell*; 44:365-372.
- EDWARDS R (1964). Cleavage of one-and two-celled rabbit eggs in vitro after removal of zona pellucida. *J Reprod Fertil*; 30:413-415.
- EDWARDS R, BEARD H (1997). Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol Hum Reprod*; 3:863-905.
- ELDER K, DALE B (2000). First stages of development. In: ELDER K, DALE B (eds.). *In Vitro Fertilization*. Cambridge: Cambridge University Press.
- EPPIG J (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol*; 89:268-272.



- EVANS T, ROSENTHAL E, YOUNGBLOM J, DISTEL D, HUNT T (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*; 33:389-396.
- FAMILIARI G, NOTTOLA S, MACCHIARELLI G, MICARA G, ARAGONA C, MOTTA P (1992). Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol Reprod Dev*; 32:51-61.
- FAWCETT D (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*; 44:394-436.
- FLECHON J, KOPECNY V (1998). The nature of the «nucleolus precursor body» in early implantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote*; 6:183-191.
- FLORMAN H, BECHTOL K, WASSARMAN P (1984). Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol*; 106:243-255.
- FLORMAN H, KIRKMAN-BROWN J, BROWN J, JUNGnickel M, SUTTON K (2003). The acrosome reaction: An example of egg-activated signal transduction in sperm. *Chem Tracts-Biochem Mol Biol*; 16:126-133.
- GALLICANO G, MCGAUGHEY R, CAPCO D (1997). Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. *Mol Reprod Dev*; 46:587-601.
- GERHART J, WU M, KIRSCHNER M (1984). Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol*; 98:1247-1255.
- GILBERT S (1997). The early development of vertebrates: fish, birds and mammals. In: *Developmental Biology*. Massachusetts: Sinauer Associates Publishers.
- GIUSTI A, XU W, HINKLE B, TERASAKI M, JAFFE L (2000). Evidence that fertilization activates starfish eggs by sequential activation of a Src-like kinase and phospholipase Cgamma. *J Biol Chem*; 275:16788-16794.
- GORDON J, NAVOT D, GRUNFELD L, LAUFER N, GARRISI G (1989). Successful microsurgical removal of a pronucleus from trippronuclear human zygotes. *Fertil Steril*; 52:367-372.
- GOULD M, STEPHANO J (2003). Polyspermy prevention in marine invertebrates. *Microsc Res Tech*; 61:379-388.
- GULYAS B (1975). A reexamination of the cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: rotation of the blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. *J Exp Zool*; 193:235-248.
- HAGUE F, MATIFAT F, BRULE G, COLLIN T (1999). The inositol (1,4,5)-trisphosphate 3-kinase of *Xenopus* oocyte is activated by CaMKII and involved in the regulation of InsP3-mediated Ca<sup>2+</sup> release. *FEBS Lett*; 449:70-74.
- HANSON F, OVERSTREET J (1981). The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. *Am J Obstet Gynecol*; 140:173-178.
- HARDY K (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*; 3:919-925.
- HE Z, BRAKEBUSCH C, FASSLER R, KREIDBERG J, PRIMAKOFF P, MYLES D (2003). None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol*; 254:226-237.
- HIRAO Y, HIRAOKA J (1987). Surface architecture of sperm tail entry into the hamster oocyte. *Dev Growth*; 29:123-132.
- HIRAOKA J, HIRAO Y (1988). Fate of sperm tail components alter incorporation into hamster egg. *Gamete Res*; 19:369-380.
- HOMA S, SWANN K (1994). A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod*; 9:2356-2361.
- HOODBOY T, DEAN J (2004). Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*; 127:417-422.
- HOWELL K, SKIPWITH A, GALIONE A, ECKBERG W (2003). Phospholipase C-dependent Ca<sup>2+</sup> release by worm and mammal sperm factors. *Biochem Biophys Res Commun*; 307:47-51.
- HUANG T JR, YANAGIMACHI R (1985). Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am J Anat*; 174:249-268.
- INOUE M, WOLF D (1975). Sperm binding characteristics of the murine zona pellucida. *Biol Reprod*; 13:340-346.
- JACOBS P, ANGELL R, BUCHANAN I, HASSOLD T, MATSUYAMA A, MANUEL B (1978). The origin of human triploids. *Ann Hum Genet*; 42:49-57.
- JAUNIAUX E, BURTON G (2005). Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss. *Placenta*; 26(2-3):114-123.
- JOHNSON M, EAGER D, MUGGLETON-HARRIS A, GRAVE H (1975). Mosaicism in organization concanavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature*; 257(5524):321-322.
- JONES K, CARROLL J, MERRIMAN J, WHITTINGHAM D, KONO T (1995). Repetitive sperm-induced Ca<sup>2+</sup> transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development*; 121:3259-3266.
- JONES R (1991). Interaction of zona pellucida glycoproteins, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development*; 111:1155-1163.
- JOVINE L, LITSCHER E, WASSARMAN P (2002). Egg zona pellucida, egg vitelline envelope, and related extracellular glycoproteins. *Adv Dev Biol Biochem*; 12:31-54.





- KAJI K, KUDO A (2004). The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction*; 127:423-429.
- KAJI K, ODA S, SHIKANO T, OHNUKI T, UEMATSU Y, SAKAGAMI J, TADA N, MIYAZAKI S, KUDO A (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Gen*; 24(3):279-282.
- KALT A, SCHLIWA M (1993). Molecular components of the centrosome. *Trends Cell Biology*; 3:118-128.
- KATAYOSE H, MATSUDA J, YANAGIMACHI R (1992). The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol Reprod*; 47:277-284.
- KATZ D, DROBNIS E, OVERSTREET J (1989). Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res*; 22(4):443-469.
- Keefer C, Schuetz A (1982). Spontaneous activation of ovulated rat oocytes during in vitro culture. *J Exp Zool*; 224:371-377.
- KERR C, HANNA W, SHAPER J, WRIGHT W (2002). Characterization of zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 binding sites on acrosome-intact mouse sperm. *Biol Reprod*; 66:1585-1595.
- KERR C, HANNA W, SHAPER J, WRIGHT W (2004). Lewis X-containing glycans are specific and competitive inhibitors of the binding of ZP3 to complementary sites on capacitated, acrosome-intact mouse sperm. *Biol Reprod*; 71:770-777.
- KIMURA Y, YANAGIMACHI R, KURETAKE S, BORTKIEWICZ H, PERRY A, YANAGIMACHI H (1998). Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod*; 58:1407-1415.
- KISTLER W, GEROCH M, WILLIAMS-ASHMAN H (1973). Proteins from mammalian testes: isolation and properties of small basic proteins from rat testes and epididymal spermatozoa. *J Biol Chem*; 248(13):4532-4543.
- KLINE D, KLINE J (1992). Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol*; 149:80-89.
- KOPECNY V, FLECHON J (1987). Ultrastructural localization of labeled acrosomal glycoproteins during in vivo fertilization in the rabbit. *Gamete Res*; 17:35-42.
- KOUCHI Z, FUKAMI K, SHIKANO T, ODA S, NAKAMURA Y, TAKENAWA T, MIYAZAKI S (2004). Recombinant Phospholipase C-zeta has high Ca<sup>2+</sup> sensitivity and induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem*; 279:10408-10412.
- KRISHNA M, GENEROSO W (1977). Timing of sperm penetration, pronuclear formation, pronuclear DNA synthesis, and first cleavage in naturally ovulated mouse eggs. *J Exp Zool*; 202:245-252.
- LAGE J, MARK S, ROBERTS D, GOLDSTEIN D, BERNSTEIN M, BERKOWITZ R (1992). A flow cytometric study of 137 fresh hydropic placentas: correlation between types of hydatidiform moles and nuclear DNA ploidy. *Obstet Gynecol*; 79(3):403-410.
- LASALLE B, TESTART J (1991). Sequential transformations of human sperm nucleus in human egg. *J Reprod Fertil*; 91(2):393-402.
- LE GUEN P, CROZET N (1989). Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. *Eur J Cell Biol*; 48:239-249.
- LE GUEN P, CROZET N, HUNEAU D, GALL L (1989). Distribution and role of microfilaments during early events of sheep fertilization. *Gamete Res*; 22:411-425.
- LECHLEITER J, JOHN L, CAMACHO P (1998). Ca<sup>2+</sup> wave dispersion and spiral wave entrainment in *Xenopus laevis* oocytes overexpressing Ca<sup>2+</sup> ATPases. *Biophys Chem*; 72:123-129.
- LEE M, STOREY B (1989). Endpoint of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> permeability: population and single cell kinetics. *Gamete Res*; 24:303-326.
- LINDER D, MCCAW B, HECHT F (1975). Parthenogenic origin of benign ovarian teratomas. *New Engl J Med*; 292:63-66.
- LONG C, PINTO-CORREIA C, PONCE DE LEON F, BOLAND M, ROCHE J, ROBL J (1993). Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes. *Mol Reprod Dev*; 36:23-32.
- LONGO F (1963). Sperm aster in rabbit zygotes: its structure and function. *J Cell Biol*; 69:539-547.
- LORCA T, CRUZALEGUI F, FESQUET D, CAVADORE J, MERY J, MEANS A, DOREE M (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*; 366(6452):270-273.
- MAHADEVAN M, TROUNSON A (1985). Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertil Steril*; 43:263-267.
- MALCOV M, BEN-YOSEF D, GLASER T, SHALGI R (1997). Changes in calpain during meiosis in the rat egg. *Mol Reprod Dev*; 48:119-126.
- MARO B, JOHNSON M, WEBB M, FLACH G (1986). Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *Embryol Exp Morphol*; 92:11-32.
- MATIFAT F, HAGUE F, BRULE G, COLLIN T (2001). Regulation of InsP3-mediated Ca<sup>2+</sup> release by CaMKII in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*; 441(6):796-801.
- MCFADDEN D, KWONG L, YAM I, LANGLOIS S (1993). Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Hum Genet*; 92(5):465-469.



- McMASTER R, YANAGIMACHI R, LOPATA A (1978). Penetration of human eggs by human spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*; 19:212-216.
- MEIZEL S (1997). Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biol Reprod*; 56:569-574.
- MELLGREN R (1991). Proteolysis of nuclear proteins by mu-calpain and m-calpain. *J Biol Chem*; 266(21):13920-13924
- MINSHULL J, BLOW J, HUNT T (1989). Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell*; 56:947-956.
- MIYAZAKI S, SHIRAKAWA H, NAKADA K, HONDA Y (1993). Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $Ca^{2+}$  release channel in  $Ca^{2+}$  waves and  $Ca^{2+}$  oscillations at fertilization in mammalian eggs. *Dev Biol*; 158:62-78.
- MIYAZAKI S, YUZAKI M, NAKADA K, SHIRAKAWA H, NAKANISHI S, NAKADE S, MIKOSHIBA K (1992). Block of  $Ca^{2+}$  wave and  $Ca^{2+}$  oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*; 257:251-255.
- MOLL A, IMHOF S, CRUYBERG J, SCHOUTEN-VAN MEETEREN A, BOERS M, VAN LEEUWEN F (2003). Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilization. *Lancet*; 361:309-310.
- MOLLER C, BLEIL J, KINLOCH R, WASSARMAN P (1990). Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol*; 137:276-286.
- MOORE G, KOPF G, SCHULTZ R (1993). Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Dev Biol*; 159:669-678.
- MOOS J, VISCONTI P, MOORE G, SCHULTZ R, KOPF G (1995). Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod*; 53:692-699.
- MORTILLO S, WASSARMAN P (1991). Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development*; 113:141-149.
- MOUDJOU M, PAINTRAND M, VIGUES B, BORNENS M (1991). A human centrosomal protein is immunologically related to basal body-associated proteins from lower eucaryotes and is involved in the nucleation of microtubules. *J Cell Biol*; 115:129-140.
- NAITO K, TOYODA Y, YANAGIMACHI R (1992). Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae. *Hum Reprod*; 7:281-285.
- NAVARA C, FIRST N, SCHATTEN G (1994). Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev Biol*; 162:29-40.
- NEWPORT J, KIRSCHNER M (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. *Cell*; 30:675-686.
- NEWPORT J, KIRSCHNER M (1984). Regulation of the cell cycle during *Xenopus laevis* development. *Cell*; 37:731-742.
- NIEMITZ E, FEINBERG A (2004). Epigenetics and assisted reproductive technology: A call for investigation. *Am J Human Genet*; 74:599-609.
- NIKAS G, AO A, WINSTON R, HANDYSIDE A (1996). Compactation and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol Reprod*; 55:32-37.
- NISHIMURA H, CHO C, BRANCIFORTE D, MYLES D, PRIMAKOFF P (2001). Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol*; 233:204-213.
- NISHIZAWA M, FURUNO N, OKAZAKI K, TANAKA H, OGAWA Y, SAGATA N (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *EMBO J*; 12(10):4021-4027.
- NOTHIAS J, MAJUMDER S, KANEKO K, DEPAMPHILIS M (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem*; 270:2077-2080.
- O'RAND M, MATTHEWS J, WELCH J, FISHER S (1985). Identification of zona binding proteins of rabbit, pig, human and mouse spermatozoa on nitrocellulose blots. *J Exp Zool*; 235:423-428.
- OAKLEY B, OAKLEY C, YOON Y, JUNG M (1990).  $\gamma$ -Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell*; 61:1289-1301.
- OHSUMI K, KATAGIRI C (1991). Characterization of the ooplasmic factor inducing decondensation of and protamine removal from toad sperm nuclei: involvement of nucleoplasm. *Dev Biol*; 148:295-305.
- OHSUMI K, KATAGIRI C, YANAGIMACHI R (1986). Development of pronuclei from human spermatozoa injected micro-surgically into frog (*Xenopus*) eggs. *J Exp Zool*; 237:319-325.
- ORSTAVIK K, EIKLID K, VAN DER HAGEN C, SPETALEN S, KIERULF K, SKJELDAL O, BUITING K (2003). Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet*; 72:218-219.
- OVERSTREET J, COOPER G (1979). The time and location of the acrosome reaction during sperm transport in the female rabbit. *J Exp Zool*; 209:97-104.



- OZIL J (1990). The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electric stimulation. *Development*; 109:117-127.
- PALERMO G, COLOMBERO L, ROSENWAKS Z (1997). The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod*; 2:19-27.
- PALERMO G, MUNNÉ S, COHEN J (1994). The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod*; 9:1220-1225.
- PEDERSEN R, WU K, BALAKIER H (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: cell lineage analysis by microinjection. *Dev Biol*; 117:581-595.
- PERONA R, WASSARMAN P (1986). Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. *Dev Biol*; 114:42-52.
- PERREAULT S, BARBEE R, SLOTT V (1988). Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*; 125:181-186.
- PERRY A, WAKAYAMA T, COOKE I, YANAGIMACHI R (2000). Mammalian oocyte activation by the synergistic action of discrete sperm head components: induction of calcium transients and involvement of proteolysis. *Dev Biol*; 217:386-393.
- PHILLIPS D, SHALGI R (1982). Sperm penetration into rat ova fertilized in vivo. *J Exp Zool*; 221:373-378.
- PHILPOTT A, LENO G (1992). Nucleoplasmic remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*; 69(5):759-767.
- PICKERING S, JOHNSON M, BRAUDE P, HOULISTON E (1988). Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod*; 3:978-989.
- RANKIN T, TALBOT P, LEE E, DEAN J (1999). Abnormal zona pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*; 126:3847-3855.
- REIMANN J, JACKSON P (2002). Emi 1 is required for cytoskeletal arrest in vertebrate eggs. *Nature*; 416(6883):850-854.
- ROGERS N, HOBSON E, PICKERING S, LAI F, FRAUDE P, SWANN K (2004). Phospholipase C $\zeta$  causes Ca<sup>2+</sup> oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*; 128:697-702.
- SALING P (1981). Involvement of trypsin-like activity in binding of mouse spermatozoa to zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78(10):6231-6235.
- SALISBURY J, BARON A, SUREK B, MELKONIAN M (1984). Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium modulated contractile organelle. *J Cell Biol*; 99:962-970.
- SANDLER T (2000). Primera semana de desarrollo: de la ovulación a la implantación (30-47). En: SANDLER T (ed.). *Langman Embriología Médica*. Madrid: Editorial Panamericana.
- SANTELLA L, LIM D, MOCCIA F (2004). Calcium and fertilization: the beginning of life. *TRENDS in Biochemical Sciences*; 29(11):400-407.
- SAPIENZA C, PETERSON A, ROSSANT J, BALLING R (1987). Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete origin. *Nature*; 328:251-254.
- SATHANANTHAN A, KOLA I, OSBORNE J, TROUNSON A, NG S, BONGSO A, RATNAM S (1991). Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88(11):4806-4810.
- SATHANANTHAN A, RATNAM S, NG S, TARIN J, GIANAROLI L, TROUNSON A (1996). The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod*; 11(2):345-356.
- SATO K, BLANDAU R (1979). Time and process of sperm penetration into cumulus-free mouse eggs fertilized in vitro. *Gamete Res*; 2:295-304.
- SAUNDERS C, LARMAN M, PARRINGTON J, COX L, BLAYNEY L, SWANN K, LAI F (2002). PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*; 129:3533-3544.
- SCHATTEN G (1994). The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol*; 165(2):299-335.
- SCHATTEN G, MAUL G, SCHATTEN H, CHALY N, SIMERLY C, BALCZON R, BROWN D (1985). Nuclear lamins and peripheral nuclear antigens during fertilization and embryogenesis in mice and sea urchins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82:4727-4731.
- SCHATTEN G, SIMERLY C, SCHATTEN H (1986). Microtubules in mouse oocytes, zygotes and embryos during fertilization and early development: unusual configurations and arrest of mammalian fertilization with microtubule inhibitors. *Ann N Y Acad Sci*; 466:945-948.
- SCHULTZ R (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*; 15(8):531-538.
- SCHUSTER S, MARHL M, HOFER T (2002). Modelling of simple and complex calcium oscillations. *Eur J Biochem*; 269(5):1333-1355.
- SHABANOWITZ R, O'RAND M (1988). Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil*; 82:151-161.
- SHALGI R, PHILLIPS D (1980). Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J Ultrastruct Res*; 71:154-161.
- SHALGI R, PHILLIPS D (1988). Motility of rat spermatozoa at the site of fertilization. *Biol Reprod*; 39:1207-1213.
- SIITERI J, DANDEKAR P, MEIZEL S (1988). Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with

- the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J Exp Zool*; 246:71-80.
- SIMERLY C, WU G, ZORAN S, ORD T, RAWLINS R, JONES J, NAVARA C, GERRITY M, RINEHART J, BINOR Z, ASCH R, SCHATTEN G (1995). The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat Med*; 1:47-52.
- SLUDER G, MILLER F, LEWIS K, DAVIDSON E, RIEDER C (1989). Centrosome inheritance in starfish zygotes: selective loss of the maternal centrosome after fertilization. *Dev Biol*; 131:567-579.
- SMITH T, YANAGIMACHI R (1989). Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J Reprod Fert*; 86:255-261.
- SMITH T, YANAGIMACHI R (1991). Attachment and release from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fert*; 91(2):567-573.
- SRIVASTAVA P, FAROOQUI A, GOULD K (1981). Studies on hydrolytic enzymes of chimpanzee sperm. *Biol Reprod*; 25(2):363-369.
- SRIVASTAVA P, MUNNELL J, YANG C, FOLEY C (1974). Sequential release of acrosomal membrane and acrosomal enzymes of ram spermatozoa. *J Reprod Fert*; 36(2):363-372.
- STRICKER S (1999). Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol*; 211(2):157-176.
- SURANI M, BARTON S, NORRIS M (1986). Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*; 45(1):127-136.
- SUTOVSKY P, MORENO R, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, SIMERLY C, SCHATTEN G (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod*; 63(2):582-590.
- SUTOVSKY P, NAVARA C, SCHATTEN G (1996). Fate of the sperm mitochondria, and the incorporation, conversion, and disassembly of the sperm tail structures during bovine fertilization. *Biol Reprod*; 55:1195-1205.
- SUTOVSKY P, OKO R, HEWITSON L, SCHATTEN G (1997). The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol*; 188(1):75-84.
- SUTOVSKY P, WU A, TAKAHASHI D, BENMUSA A, SCHATTEN G, DOMINKO T, OKO R (2001). Oocyte activation by mammalian sperm perinuclear theca proteins PT 32 and tyrosine kinase c-Yes. *Mol Biol Cell*; 12:S114a.
- SWANN K, PARRINGTON J (1999). Mechanism of Ca<sup>2+</sup> release at fertilization in mammals. *J Exp Zool*; 285(3):267-275.
- SWENSON J, FARREL K, RUDERMAN J (1986). The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell*; 47:861-870.
- SZOLLOSI D (1965). The fate of sperm middle-piece mitochondria in the rat egg. *J Exp Zool*; 159(3):367-378.
- SZOLLOSI D, HUNTER R (1973). Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: sperm penetration and pronucleus formation. *Journal of Anatomy*; 116:181-206.
- SZOLLOSI D, SZOLLOSI M, CZOLOWSKA R, TARKOWSKI A (1990). Sperm penetration into mature mouse oocytes and nuclear changes during maturation: an EM study. *Biol Cell*; 69:53-64.
- TAKAHASHI Y, BIGLER D, ITO Y, WHITE J (2001). Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta 1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell*; 12:809-820.
- TAKAHASHI Y, YAMAKAWA N, MATSUMOTO K, TOYODA Y, FURUKAWA K, SATO E (2000). Analysis of the role of egg integrins in sperm-egg binding and fusion. *Mol Rep Dev*; 56:412-423.
- TAKANO H, YANAGIMACHI R, URCH U (1993). Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with oolemma: inhibitor studies using golden hamster. *Zygotes*; 1:79-91.
- TALBOT P (1985). Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am J Anat*; 174(3):331-346.
- TALBOT P, DICARLANTONIO G, ZAO P, PENKALA J, HAIMO L (1985). Motile cells lacking hyaluronidase can penetrate the hamster oocyte cumulus complex. *Dev Biol*; 108(2):387-398.
- TANAKA S, KUNATH T, HADJANTONAKIS A, NAGY A, ROSSANT J (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*; 282:2072-2075.
- TATONE C, DELLE MONACHE S, IORIO R, CASERTA D, DI COLA M, COLONNA R (2002). Possible role for Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization Ca<sup>2+</sup> signal in mouse oocyte activation. *Mol Hum Reprod*; 8(8):750-757.
- TERADA Y, LUETJENS C, SUTOVSKY P, SCHATTEN G (2000). Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil Steril*; 74(3):454-460.
- TESARIK J, CARRERAS A, MENDOZA C (1996). Single cell analysis of tyrosine kinase dependent and independent Ca<sup>2+</sup> fluxes in progesterone induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*; 2(4):225-232.
- TESARIK J, DRAHORAD J, PEKNICOVA J (1988). Subcellular immunochemical localization of acrosin in human



- spermatozoa during the acrosome reaction and the zona pellucida penetration. *Fertil Steril*; 50(1):133-141.
- TESARIK J, DRAHORAD J, TESTART J, MENDOZA C (1990a). Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. *Development*; 110:391-400.
- TESARIK J, GRECO E (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod*; 14:1318-1323.
- TESARIK J, KOPEČNY V, DVORAK M (1984). Selective binding of human cumulus cell-secreted glycoproteins to human spermatozoa during capacitation in vitro. *Fertil Steril*; 41(6):919-925.
- TESARIK J, KOPEČNY V (1989a). Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res*; 24:135-149.
- TESARIK J, KOPEČNY V (1989b). Nucleic acid synthesis and development of human male pronucleus. *J Reprod Fertil*; 86(2):549-558.
- TESARIK J, OLTRAS C, TESTART J (1990b). Effect of human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J Reprod Fertil*; 88:665-675.
- THALER C, CARDULLO R (1996). The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J Biol Chem*; 271(38):23289-23297.
- TOPFER-PETERSEN E, CECHOVA D (1990). Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin. *Int J Androl*; 13(3):190-196.
- URCH U, WARDRIIP N, HEDRICK J (1985a). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J Exp Zool*; 233:479-483.
- URCH U, WARDRIIP N, HEDRICK J (1985b). Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. *J Exp Zool*; 236(2):239-243.
- USUI N, YANAGIMACHI R (1976). Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. *J Ultrastruc Res*; 57(3):276-288.
- UTO N, YOSHIMATSU N, LOPATA A, YANAGIMACHI R (1988). The zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J Exp Zool*; 248:113-120.
- VAN BLERKOM J, DAVIS P (1995). Evolution of the sperm aster microinjection of isolated human sperm centrosomes into meiotically mature human oocytes. *Hum Reprod*; 10(8):2179-2182.
- VAN DUIN M, POLMAN J, DE BREET I, VAN GINNEKEN K, BUNSCHOTEN H, GROOTENHUIS A, BRINDLE J, AITKEN R (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod*; 51:607-617.
- VASSILAKOS P, RIOTTON G, KAJI T (1977). Hydatidiform mole: two entities. A morphologic and cytogenetic study with some clinical consideration. *Am J Obstet Gynecol*; 127(2):167-170.
- VERLHAC M, DE PENNART H, MARO B, COBB M, CLARKE H (1993). MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centres during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol*; 158(2):330-340.
- VIGERS G, LOHKA M (1991). A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in *Xenopus* eggs. *J Cell Biol*; 112(4):545-556.
- VIRJI N, PHILLIPS D, DUNBAR B (1990). Identification of extracellular proteins in the rat cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev*; 25(4):339-344.
- WARD W, COFFEY D (1989). Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol Reprod*; 41:361-370.
- WARD W, COFFEY D (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*; 44(4):569-574.
- WASSARMAN P (1999). Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion. *Cell*; 96(2):175-183.
- WASSARMAN P (2003). Fertilization. *Chem Tracts-Biochem Mol Biol*; 16:117-204.
- WASSARMAN P (2005). Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. *J Cell Physiol*; 204(2):388-391.
- WHITE D, PHILLIPS D, BEDFORD J (1990). Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fertil*; 90(1):71-80.
- WILDING M, RUSSO G, GALIONE A, MARINO M, DALE B (1998). ADP-ribose gates the fertilization channel in ascidian oocytes. *Am J Physiol*; 275(5 pt 1): C1277-C1283.
- WILEY L (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Dev Biol*; 105:330-342.
- WILLIAMS C (2002). Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod*; 8(4):313-321.
- WILLIAMS C, MEHLMANN L, JAFFE L, KOPF G, SCHULTZ R (1989). Evidence that G<sub>q</sub> family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev Biol*; 198(1):116-127.
- WILLIAMS C, SCHULTZ R, KOPF G (1992). Role of G proteins in mouse egg activation: Stimulatory effects of acetylcholine on the ZP<sub>2</sub> to ZP<sub>2f</sub> conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. *Dev Biol*; 151(1):288-296.

- WILSON K, NEWPORT J (1988). A trypsin-sensitive receptor on membrane vesicles is required for nuclear envelope formation in vitro. *J Cell Biol*; 107:57-68.
- WOOLLEY D, FAWCETT D (1973). The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anatomical Record*; 177(2):289-301.
- WRIGHT S, LONGO F (1988). Sperm nuclear enlargement in fertilized hamster eggs is related to meiotic maturation of the maternal chromatin. *J Exp Zool*; 247(2):155-165.
- XU Z, KOPF G, SCHULTZ R (1994). Involvement of inositol 1,4,5-triphosphate-mediated  $Ca^{2+}$  release in early and late events of mouse egg activation. *Development*; 120: 1851-1859.
- YANAGIDA K, YANAGIMACHI R, PERREAULT S, KLEINFELD R (1991). Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod*; 44(3):440-447.
- YANAGIMACHI R (1984). Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res*; 10:178-232.
- YANAGIMACHI R (1994). Mammalian fertilization. In: KNOBIL E, NEILL J (eds.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd.
- YANAGIMACHI R, CHANG M (1961). Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *J Exp Zool*; 148:185-203.
- YANAGIMACHI R, NODA Y (1970). Electron microscope studies of sperm incorporation into the hamster egg. *Am J Anat*; 128(4):429-462.
- YANG W, LIN L, WANG J, CHANG M (1972). Sperm penetration through zona pellucida and perivitelline space in hamster. *J Exp Zool*; 179(2):191-206.
- ZHU G, MILLAR B, BOUCHEIX C, RUBINSTEIN E, LIU C, HYNES R, MYLES D, PRIMAKOFF P (2002). Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development*; 129(8):1995-2002.

