

REVISIONES

La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes

María José del Río^a, Ana Godoy^b, Alejandra Toro^b, Renán Orellana^b, Manuel E. Cortés^b, Ricardo D. Moreno^b y Pilar Vigil^b

^aFacultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago.

^bUnidad de Reproducción y Desarrollo. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile.

RESUMEN

El acrosoma es una vesícula secretora localizada en la cabeza del espermatozoide. La reacción del acrosoma consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa.

En el proceso de la espermatogénesis, el espermatozoide experimenta, en una secuencia definida, varias etapas de maduración antes de adquirir la capacidad de fecundar. Dentro de éstas se encuentra la capacitación, que es una serie de eventos moleculares que ocurren en el espermatozoide después de la maduración en el epidídimo y que confiere al espermatozoide la habilidad para sufrir la reacción del acrosoma. En el espermatozoide reaccionado, la membrana plasmática del segmento ecuatorial y postecuatorial adquiere capacidad fusogénica. El presente trabajo revisa las bases fisiológicas y los distintos eventos moleculares que llevan a la reacción del acrosoma y las consecuencias de éstas dentro del proceso de la fecundación.

Palabras clave: Espermatozoide. Capacitación. Reacción del acrosoma.

ABSTRACT

Acrosome reaction of the spermatozoa: recent advances

The acrosome is a secretory vesicle located in the head of the spermatozoa. The acrosome reaction consists in the fusion of the sperm plasma membrane with the outer acrosomal membrane. During spermatogenesis, the spermatozoa experience, in a defined sequence, several processes of maturation before acquiring the fertilising ability. One of these is sperm capacitation, which involves several molecular events that happen in the spermatozoa, after maturation in the epididymis. Capacitated spermatozoa undergo the acrosome reaction after which the plasma membrane over the equatorial and post equatorial region acquires the fusogenic capacity.

The present review analyses the physiological bases and molecular events that occur during capacitation and allow spermatozoa to undergo the acrosome reaction during the process of fertilisation.

Key words: Spermatozoa. Capacitation. Acrosome reaction.

INTRODUCCIÓN

En una secuencia definida, el espermatozoide experimenta varias etapas de maduración antes de adquirir la capacidad de fecundar al ovocito¹. La maduración epididimaria es la primera etapa de esta secuencia, seguida por lo que se conoce como capacitación, que

ocurre de forma concomitante con la hiperactivación. El espermatozoide se considera capacitado cuando está apto para experimentar la reacción del acrosoma (RA).

La maduración epididimaria del espermatozoide está relacionada con la activación de la cascada de fosforilación de tirosina inducida por adenosina monofosfato cíclico (AMPc), cascada que recientemente se ha asociado con la expresión de funciones espermáticas dependientes del proceso de capacitación, como el movimiento hiperactivado y la exocitosis acrosomal². Los espermatozoides presentes en el semen han sufri-

Correspondencia: Dra. Pilar Vigil.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Pontificia Universidad Católica de Chile.
Alameda Bernardo O'Higgins, 340. Santiago. Chile.
Correo electrónico: pvigil@bio.puc.cl

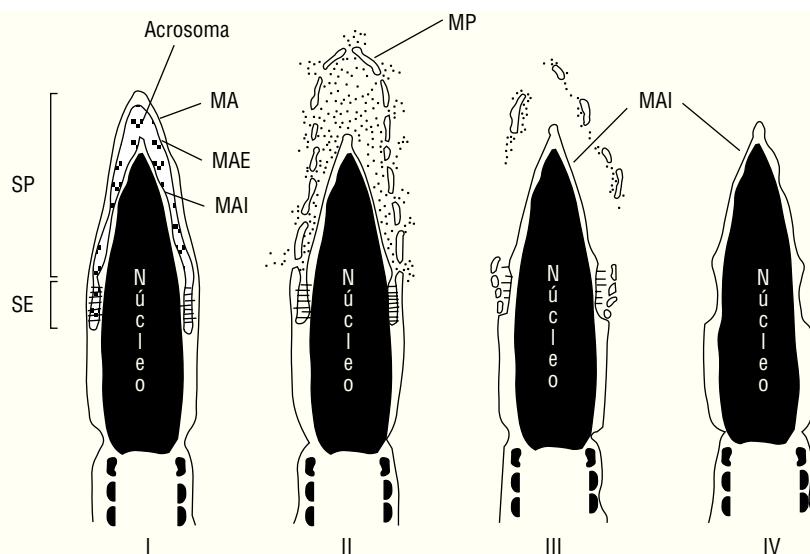


Figura 1. Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano. I. Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado). II. Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma. III. Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV. Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal y ecuatorial. La membrana acrosómica interna (MAI) se continúa con la membrana plasmática del segmento postecuatorial.

do el proceso de maduración mencionado anteriormente, son motiles y se encuentran condicionados por los componentes del fluido seminal, sin embargo, aún no son capaces de fecundar³.

Durante su migración por el tracto genital femenino, o durante períodos de incubación *in vitro* en medios de cultivo adecuados, los espermatozoides experimentan una serie de cambios bioquímicos y biofísicos, llamados en conjunto capacitación, que les preparan para la RA y, en consecuencia, para fecundar al ovocito^{3,4}.

¿QUÉ ES LA REACCIÓN DEL ACROSOMA?

El acrosoma es un organelo con forma de capucha, ubicado en la región apical del espermatozoide, sobre el segmento anterior del núcleo, cuyo contenido incluye una mezcla única de enzimas, tales como acrosina y otras enzimas presentes en el lisosoma, peroxisoma e incluso en el citoplasma⁵⁻¹⁰. Cada espermatozoide está dotado de un único acrosoma, cuya forma y tamaño varía ampliamente entre las especies¹⁰. La formación de este organelo, a partir del aparato de Golgi, es un proceso altamente sincronizado y bastante lento en comparación con la biogénesis de otras vesículas secretoras y, en mamíferos, está asociada con la diferenciación de espermátidas durante la espermatogénesis⁸. Generalmente, se acepta que la formación del acrosoma comienza con la espermatogénesis, pero en humanos, monos rhesus y ratones, la síntesis de muchas enzimas específicas del acrosoma, como proacrosina y acrogranina, comienza cuando el espermatozito se encuentra en paquiteno⁸.

La RA es un evento exocítico, que involucra generalmente la fusión y fenestración de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del segmento principal del acrosoma. Con posterioridad a la reacción del segmento principal del acrosoma, el segmento ecuatorial puede reaccionar¹¹. La RA en el segmento ecuatorial también involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa. Este proceso se puede producir durante el contacto del espermatozoide con la matriz extracelular del ovocito o con la zona pelúcida^{9,12} y desencadena una serie de eventos como: *a*) liberación de las enzimas acrosomales que favorecen el paso a través de la zona pelúcida¹¹; *b*) exposición de la membrana acrosómica interna como el nuevo dominio de membrana en la superficie celular^{9,11,13}; *c*) adquisición en el caso de la reacción del segmento principal del acrosoma, de la capacidad fusogénica de la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial del espermatozoide. En el caso de la RA del segmento ecuatorial se ha demostrado que la membrana plasmática postecuatorial adquiere la capacidad fusogénica^{1,9}. Sólo la membrana plasmática de espermatozoides que han experimentado la RA es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (fig. 1).

REQUERIMIENTOS PARA LA REACCIÓN DEL ACROSOMA

Capacitación e hiperactivación

Para poder fecundar al ovocito, el espermatozoide debe experimentar una fase final de desarrollo post-eyaculación llamada capacitación¹⁴. Este proceso con-

siste en una serie de modificaciones, entre las que se encuentran⁴: aumento en la fluididad de la membrana; disminución del contenido de colesterol plasmático¹⁵; aumento en la concentración de calcio intracelular y de AMPc^{16,17}; fosforilación de residuos de tirosinas en proteínas flagelares, y cambio en los patrones de movimiento y motilidad quimiotáctil del espermatozoide. Los cambios mencionados anteriormente parecen estar compartimentalizados; por ejemplo, la fosforilación de proteínas ocurre principalmente en el flagelo y conduce a cambios en el patrón de motilidad espermática. Estas modificaciones en la motilidad, que constituyen el proceso de hiperactivación, se traducen en un aumento en el desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide y el cambio desde un movimiento rectilíneo, que predomina en espermatozoides maduros no capacitados, a uno curvilíneo. De esta manera, el espermatozoide adquiere un movimiento asimétrico y amplio del flagelo, que lo llevará a moverse en círculos para liberarse de las criptas oviductales, avanzar y alcanzar el ámpula, donde ocurrirá la fecundación.

Los mecanismos moleculares involucrados en las funciones espermáticas no se han dilucidado con claridad. Sin embargo, hay cierta evidencia del rol del AMPc, tanto como promotor de la hiperactivación de la motilidad modulada por especies reactivas de oxígeno como inductor indirecto de la RA¹⁸.

Requerimientos iónicos

Hay requerimientos iónicos específicos para la promoción y soporte tanto de la capacitación como de la RA³. Algunos de estos compuestos son:

– Calcio: este ión es necesario para la capacitación, la hiperactivación y la RA^{14,19-22}. Se ha observado que la serotonina, que en otros sistemas celulares se asocia a un aumento de la permeabilidad para el Ca²⁺, es capaz de estimular la reacción del acrosoma^{23,24}. Este hecho, junto a la presencia de calmodulina en la cabeza del espermatozoide²⁵ reforzaría la idea de la necesidad de Ca²⁺ para la RA.

– Potasio²⁶, sodio²⁷ y cloruro²⁸: se ha demostrado que durante la capacitación hay la modulación de estos iones.

– Cinc: podría jugar un rol importante en la desestabilización de la membrana plasmática durante la capacitación²⁹.

– Bicarbonato: regula la actividad de la adenilato ciclase y el metabolismo de AMPc³⁰, necesarios para la fosforilación de tirosinas de las proteínas durante la capacitación. Este compuesto además podría ser el responsable del aumento de pH intracelular que se observa en la capacitación^{31,32}.

Disminución del contenido de colesterol

Durante la capacitación ocurren modificaciones en la distribución y composición de los lípidos y fosfolípidos de la membrana plasmática, que conducen a cambios en la composición y aumento en su fluididad³³. Una de estas transformaciones es la eliminación de colesterol, que permitirá la entrada de Ca²⁺ extracelular y una disminución de la razón colesterol/fosfolípido en la membrana plasmática, prerrequisitos para que ocurra la fusión de las membranas en la RA^{34,35}.

Requerimientos enzimáticos

Aparte de la acción del Ca²⁺, se requiere la participación de ciertas enzimas hidrolíticas en la RA. La activación de estas enzimas acrosomales ocurriría a través de un aumento del pH intracrosomal durante la capacitación^{34,36}.

La inhibición de la RA en espermatozoides de hámster, utilizando inhibidores de la tripsina de baja masa molecular, como la benzamidina, apoya la teoría de la participación de enzimas hidrolíticas durante esta reacción³⁷. Sin embargo, en el cobayo los inhibidores de la tripsina no impiden la formación de vesículas de las membranas durante la RA, sino que impiden la dispersión del contenido intraacrosomal³⁸. Por otra parte, en espermatozoides humanos se ha sugerido la participación de una enzima tipo tripsina en el mecanismo a través del cual el espermatozoide humano realiza la RA inducida por la zona pelúcida o por el fluido folicular³⁹. Estas diferencias han llevado a sospechar el hecho de que, según la especie, se pueden encontrar distintos mecanismos de participación de estas enzimas en la RA³⁸.

Otra enzima característica de este proceso es la acrosina, que participaría en la unión inicial de la zona pelúcida y el espermatozoide y en los eventos bioquímicos tempranos de RA³⁹.

pH

Si bien se encuentran bien establecidos los requerimientos iónicos y la necesidad de un promotor de la disminución del contenido de colesterol, como la albúmina, para el desarrollo de la RA *in vitro*, la influencia de otros componentes del medio en el cual se realizan las incubaciones es poco conocida. Recientemente, se demostró que la capacidad de reacción ante estimulantes de la RA *in vitro* es sensible a cambios en el pH extracelular. A pH bajos (6,7-7,0), se observó una inhibición de la respuesta acrosomal y del aumento del pH intracelular que ocurre durante la capacita-

ción. Esta carencia en el incremento de pH podría explicar la inhibición de la RA esperada¹⁴.

Complexina I

La regulación de la exocitosis suele estar controlada por el complejo SNARE, que incluye 3 proteínas que promueven la fusión de membrana. La complexinas I y II están altamente relacionadas con proteínas citosólicas que se unen al complejo SNARE y regulan la exocitosis neuronal. Si bien el espermatozoide tiene una exocitosis regulada, la liberación de una única gran vesícula hace a este proceso diferente del observado en la exocitosis neuronal. La fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa ocurre en múltiples puntos. El mecanismo a través del cual se activa esta fusión y la manera en que ocurre la sincronización de la formación y progreso de estos puntos de fusión, permanece difuso. Recientemente, se ha demostrado que las complexinas I y II, detectadas en espermatozoides maduros con el acrosoma intacto, no se encuentran después de la exocitosis acrosomal. Aunque espermatozoides deficientes en complexina I son capaces de responder a ionóforos de calcio, no pueden reaccionar en presencia de proteínas de la zona pelúcida y tienen una capacidad fertilizante reducida *in vitro*. Se postula que esta complexina desarrollaría funciones importantes en el proceso de exocitosis, constituyendo uno de los requerimientos específicos para la ocurrencia de la RA¹⁰.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA OCURRENCIA DE LA REACCIÓN DEL ACROSOMA

Hay factores fisiológicos y no fisiológicos que afectan la ocurrencia de la RA⁴⁰; algunos de ellos son:

Progesterona

La progesterona estimula la RA *in vitro* además de inducir naturalmente este proceso^{11,41,42}. Esta hormona tendría efectos sobre la RA de carácter dependiente de la dosis mediados por la activación de un receptor de membrana espermático^{3,11,12,43}. Se ha demostrado que la disminución de colesterol de la membrana plasmática durante la capacitación determina la capacidad de respuesta de espermatozoides humanos a progesterona³⁴. En el fluido folicular preovulatorio inmediato se encuentran altas concentraciones de progesterona. Esto haría que en condiciones fisiológicas en el momento de la ovulación se liberen altas concentraciones de progesterona hacia la trompa de Falopio, lo cual induciría la RA, para así asegurar una fecundación exitosa.

Estradiol

Investigaciones recientes han mostrado que hormonas como el estradiol podrían actuar, a través de una vía rápida/no genómica, en varios tipos celulares, incluyendo el espermatozoide^{12,44}. Este proceso se desarrollaría a través de 2 subtipos de receptores de membrana: α y β , y un influxo de calcio podría mediar el efecto no genómico^{44,45}. Se ha demostrado que el estradiol presente en altas concentraciones en el moco cervical durante el período fértil de la mujer podría ejercer un rol inhibitorio sobre la RA en humanos. Ello prevendría una ocurrencia prematura de la RA durante el paso del espermatozoide por el cuello uterino. Esto, junto con el rol estimulador de progesterona sobre la RA, indicaría que las concentraciones de hormonas esteroidales a lo largo del ciclo menstrual estarían ejerciendo un rol en la fisiología espermática¹¹.

Ácido gamma-aminobutírico

El ácido gamma-aminobutírico (GABA), molécula cuya participación en el sistema nervioso se conoce ampliamente, también se encuentra presente en tejidos periféricos, como el útero humano, oviductos y ovarios⁴⁶. Además se han registrado altas concentraciones de este ligando en el plasma seminal humano⁴⁷. Hay evidencia de receptores de GABA en sitios específicos de la superficie de espermatozoides humanos⁴⁸.

En espermatozoides, GABA se ha caracterizado como inductor de la RA, donde su efecto describe una curva unimodal⁴⁹. En ratones se ha demostrado que este comportamiento se debe a la activación temprana (a bajas concentraciones) de los receptores de GABAa (inductores), por el contrario en altos valores del ligando se activan los receptores de GABAb (inhibidores), generando un control balanceado del proceso a través de la activación coordinada de ambos receptores⁵⁰.

La relación de GABA con los efectos de la progesterona ha sugerido que el receptor del ácido mediaría la respuesta de la progesterona.

La acción conjunta de GABA y progesterona se ha interpretado como una sumatoria de los valores independientes de cada ligando, aludiendo a mecanismos de acción separados⁴⁹. Sin embargo, la acción de GABA en la RA no está claramente establecida a la fecha.

Proteína ZP3

ZP3 es una glucoproteína de la zona pelúcida, responsable tanto de la inducción de la RA como del reconocimiento entre el espermatozoide capacitado con el acrosoma intacto y el ovocito^{3,9,13,39,43}. La exocitosis

inducida por ZP3 del contenido acrosomal procede a través de 2 vías de señalización espermáticas⁵¹. En la primera, la unión de ZP3 a GalT y a otros receptores potenciales resulta en la activación de una proteína de unión a GTP heterotrimérica y de fosfolipasa C, lo cual eleva la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. Actualmente se postula que ZP3 estimularía la producción de fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato en la membrana del espermatozoide, evento que sería parte del inicio de esta vía de transducción de señal⁹. En la segunda vía, la unión de ZP3 a los mismos receptores estimularía un ingreso transiente de Ca^{2+} a través de los canales tipo T. En una fase posterior de señalización, estos eventos iniciales inducidos por ZP3 producen una entrada adicional de Ca^{2+} a través de los canales para Ca^{2+} de la familia Trp, lo que resulta en un aumento sostenido de la concentración del Ca^{2+} citoplasmático, que desencadena la RA^{9,51,52}.

Ionóforo A23187

El ionóforo A23187 se ha utilizado ampliamente como inductor de la reacción, pero es potencialmente citotóxico y las concentraciones utilizadas se deben escoger cuidadosamente de acuerdo con las condiciones de incubación³. Este ionóforo de Ca^{2+} acelera el curso de la reacción en espermatozoides de especies como cobayo, hámster y humanos^{53,54}, corroborando el requerimiento de este ión para el desarrollo de la RA.

Agentes fusogénicos

Agentes fusogénicos como la lisofosfatidilcolina^{55,56}, en presencia de Ca^{2+} son capaces de acelerar la RA. Sin embargo, en espermatozoides de bovino se ha demostrado que este efecto es dependiente del pH extracelular, ya que a $\text{pH} < 7,2$ no se desarrolla la exocitosis acrosomal esperada¹⁴.

Otros

Hay otros componentes que ejercerían un rol inhibitorio sobre la RA. Entre estos se han identificado:

- Interleucina-6⁵⁷.
- Clatrina: proteína seminal bovina que modularía el transporte de calcio⁵⁸.
- Cinc: presente en el semen en altas concentraciones³.

CONCLUSIONES

En resumen, la RA, que involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica

externa y la consiguiente liberación del contenido acrosomal, ocurre una vez que el espermatozoide se encuentra capacitado. In vivo, las condiciones vendrían dadas para que durante el período fértil las altas concentraciones de estradiol presentes en el moco cervical inhiban la RA. Posteriormente, el espermatozoide en su recorrido por el tracto genital femenino estaría expuesto a inductores de la RA, como altas concentraciones de progesterona provenientes del fluido folicular y que estarían presentes en la trompa de Falopio. Otras moléculas que estimularían la RA serían proteínas presentes en la cubierta ovocitaria, como ZP3.

Actualmente también se han identificado moléculas, como GABA, que estarían presentes en el útero y también tendrían un rol en la RA. Esto, junto a la acción no genómica que las hormonas esteroidales estarían ejerciendo sobre el espermatozoide, plantea un desafío para futuras líneas de investigación en la fisiología reproductiva.

Bibliografía

1. Vigil P. Gamete membrane fusion in hamster spermatozoa with reacted equatorial segment. *Gamete Res.* 1989;23:203-13.
2. Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH, Baker MA. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl.* 2007;9:554-64.
3. De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:175-94.
4. Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod.* 1983; 28:108-20.
5. McRorie RA, Williams WL. Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann Rev Biochem.* 1974;43:777-803.
6. Fawcett DW. The mammalian spermatozoa. *Dev Biol.* 1975;44:394-436.
7. Castellani-Ceresa L, Berruti G, Colombo R. Immunocytochemical localization of acrosin in boar spermatozoa. *J Exp Zool.* 1983;227:297-304.
8. Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:1430-4.
9. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lémos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca^{2+} into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.* 2001;3:499-502.
10. Zhao L, Burklin HR, Shi X, Li L, Reim K, Miller DJ. Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev Biol.* 2007;309:236-44.
11. Vigil P, Toro A, Godoy A. Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia.* 2007;39:1-6.
12. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa: mechanisms of signal transduction and clinical implications. *Front Biosci.* 1998;3: D1051-9.
13. Nolan JP, Hammerstedt RH. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* 1997;11:670-82.
14. Cross NL. Effect of pH on the development of acrosomal responsiveness of human sperm. *Andrologia.* 2007;39:55-9.
15. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod.* 1985;32:145-53.
16. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 1995;121:1139-50.

17. Visconti PE, Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998;59:1-6.
18. De Jonge CJ, Han HL, Mack SR, Zaneveld LJ. Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J Androl.* 1991;12:62-70.
19. Barros C. Capacitation of mammalian spermatozoa. En: Coutinho E, Fuchs F, editors. *Physiology and Genetics of Reproduction*. Part B. New York: Plenum Press; 1974. p. 3-24.
20. Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res.* 1974;89:161-74.
21. Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res.* 1982;5:323-44.
22. Strehler EE, Filoteo AG, Penniston JT, Caride AJ. Plasma-membrane Ca^{++} pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:919-22.
23. Meizel S, Turner K. Serotonin or its agonist 5-methoxytryptamine can stimulate hamster sperm acrosome reactions in a more direct manner than catecholamines. *J Exp Zool.* 1983; 226:171-4.
24. Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat.* 1985;174:285-302.
25. Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ. Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77:2772-6.
26. Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 1995;171:554-63.
27. Hyne RV, Edwards KP, Lopata A, Smith JD. Changes in guinea pig sperm intracellular sodium and potassium content during capacitation and treatment with monovalent ionophores. *Gamete Res.* 1985;12:65-73.
28. Fraser LR. Mechanisms regulating capacitation and the acrosome reaction. En: Fenichel P, Parinaud J, editors. *Human sperm acrosome reaction*. Colloque/INSERM John Libbey Eurotext Ltd. Montrouge, France. 1995;236:17-33.
29. Andrews JC, Nolan JP, Hammerstedt RH, Bavister BD. Role of zinc during hamster sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1994;51:1238-47.
30. Visconti PE, Muschietti JP, Flawia MM, Tezon JG. Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1054:231-6.
31. Uguiz C, Vredenburgh WL, Parrish JJ. Heparin-induced capacitation but not intracellular alkalinization of bovine sperm is inhibited by Rp-adenosine 3'5'-cyclic monophosphorothioate. *Biol Reprod.* 1994;51:1031-9.
32. Zeng Y, Oberdorf JA, Florman HM. pH regulation in mouse sperm: identification of Na^+ -, Cl^- -, and HCO_3^- -dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol.* 1996;173:510-20.
33. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 1994;2:371-2.
34. Cross NL, Razy-Faulkner P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod.* 1997;56:1169-74.
35. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998;59:7-11.
36. Parrish RF, Polakoski KL. Mammalian sperm proacrosin-acrosin system. *Int J Biochem.* 1979;10:391-5.
37. Lui CW, Meizel S. Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction. *J Exp Zool.* 1979;207:173-85.
38. Perreault SD, Zirkin BR, Rogers BJ. Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod.* 1982;26:343-52.
39. Llanos M, Vigil P, Salgado AM, Morales P. Inhibition of the acrosome reaction by trypsin inhibitors and prevention of penetration of spermatozoa through the human zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 1993;97:173-8.
40. Hoshi M, Matsui T, Nishiyama I, Amano T, Okita Y. Physiological inducers of the acrosome reaction. *Cell Differ Dev.* 1988;25 Suppl:19-24.
41. Roldan ER, Murase T, Shi QX. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science.* 1994; 266:1578-81.
42. Murase T, Roldan ER. Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the sequence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem J.* 1996;320:1017-23.
43. Morales P, Llanos M, Gutiérrez G, Kohen P, Vigil P, Vantman D. The acrosome reaction inducing activity of individual human follicular fluid samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum Reprod.* 1992;7:646-51.
44. Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi E. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids.* 2004;69:553-9.
45. Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, et al. Estrogen receptor ($\text{ER}\alpha$) and $\text{ER}\beta$ are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:1443-1.
46. Erdő SL, Villányi P, László A. Gestational changes of GABA levels and GABA binding in the human uterus. *Life Sci.* 1989;44:2009-14.
47. Leader A, Minuk GY, Mortimer D. Seminal plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in normospermic men. *Clin Invest Med.* 1992;15:346-8.
48. Aanesen A, Fried G, Andersson E, Gottlieb C. Evidence for gamma-aminobutyric acid specific binding sites on human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1995;10:1885-90.
49. Shi QX, Yuan YY, Roldan ER. Gamma-aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:677-83.
50. Hu JH, He XB, Wu Q, Yan YC, Koide SS. Biphasic effect of GABA on rat sperm acrosome reaction: involvement of GABA(A) and GABA(B) receptors. *Arch Androl.* 2002;48: 369-78.
51. Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science.* 2002;296:2183-5.
52. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 2000;11:1571-84.
53. Talbot P, Chacon R. Detection of modifications in the tail of capacitated guinea pig sperm using lectins. *J Exp Zool.* 1981; 216:435-44.
54. Nagae T, Yanagimachi R, Srivastava PN, Yanagimachi H. Acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1986; 45:701-7.
55. Fleming AD, Yanagimachi R. Effects on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res.* 1981;4:253-73.
56. Ohzu E, Yanagimachi R. Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysocleithin. *J Exp Zool.* 1982;224: 259-63.
57. Carver-Ward JA, Einspanier M, Quinn P, Lydic M, Brody SA. Effects of cytokines on the human sperm acrosome reaction: a possible explanation for infertility caused by hostile cervical mucus. *Fertil Steril.* 1997;68 Suppl:S186.
58. Clark EN, Corron ME, Florman HM. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *J Biol Chem.* 1993;268:5309-16.