

Regulación bioquímica de la reacción acrosomal en el espermatozoide de mamífero

ALEJANDRO REYES-FUENTES
MARIA EUGENIA CHAVARRIA-OLARTE

El acrosoma del espermatozoide de mamífero asemeja un lisosoma o un gránulo secretor. Estos organelos están regulados mediante la interacción de nucleótidos cíclicos, calcio, calmodulina, microtúbulos y microfilamentos, por lo que se evaluó su presencia y participación en la reacción acrosomal. Se utilizaron espermatozoides de cobayos Hartley adultos: 1. espermatozoide completos; 2. fracción enriquecida de acrosomas, 3. matriz acrosomal; 4. membranas acrosomales; 5. espermatozoides sin acrosoma; 6. cabezas; 7. flagelospiezas medias; 8. membranas plasmáticas; 9. membranas acrosomales externas. Procedimientos experimentales: I. incubación con AMPc, GMPc, progesterona y 17- β -estradiol, II. actividad de adenilil ciclasa, III. identificación de proteínas contráctiles, IV. distribución de calmodulina. Los resultados indicaron participación de nucleótidos cíclicos y hormonas esteroides en la regulación de la reacción acrosomal; actividad de adenilil ciclasa en las membranas acrosomales; 21.5 μ g de calmodulina/ 10^8 presencia de actina y tubulina en las fracciones membranales, predominando en la fracción 9. Con estos resultados se propone un modelo para la regulación de la reacción acrosomal.

CLAVES: Espermatozoide, reacción acrosomal, capacitación, exocitosis

Durante su transporte en el útero y la trompa de Falopio, los espermatozoides de mamífero experimentan una serie de cambios bioquímicos, ultraestructurales y funcionales que integran el proceso de ca-

pacitación.^{1,2} La capacitación incluye varias etapas secuenciales, que se realizan bajo estricto predominio estrogénico: la activación, que involucra un cambio en la velocidad y patrón de movimientos flagelares; la capacitación propiamente dicha, que implica un cambio en las estructuras y por lo tanto en las propiedades de las membranas plasmática y acrosomal externa, entre otras, y la reacción acrosomal. Las dos primeras fases de este proceso se llevan al cabo en el endometrio y la tercera en la región ampular de la trompa de Falopio.¹

Trabajo de ingreso del doctor Alejandro Reyes a la Academia Nacional de Medicina, presentado en sesión ordinaria el 6 de noviembre de 1985.

Ambos autores. Unidad de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional. Instituto Mexicano del Seguro Social.

En los mecanismos moleculares involucrados en la iniciación y regulación de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero, participan tanto componentes bioquímicos de la matriz acrosomal y de las membranas acrosomales, así como componentes bioquímicos y hormonales del microambiente periovariano de la trompa de Falopio.³

En esta última etapa de la capacitación se efectúa la secreción o liberación de las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma, seguidas por la fusión y vesiculación de las membranas plasmática y acrosomal externa, requisitos necesarios para que el espermatozoide penetre a través de las diferentes capas que recubren al ovocito (*cumulus oophorus*, *corona radiata*, *zona pellucida*), así como para la interacción y fertilización de la gameta femenina.

El acrosoma de los espermatozoides de mamífero ha sido comparado con un lisosoma o con un gránulo secretor, debido a su origen, estructura y expresión de función celular.⁴ Estos organelos tienen en común la exocitosis, con características particulares en cada una de las estirpes celulares.⁴

Actualmente existen evidencias de que estos procesos de secreción están regulados, tanto por nucleótidos cíclicos endógenos y exógenos, así como por hormonas esteroides, calcio y calmodulina; asimismo, el ensamble y desensamble de microtúbulos y microfilamentos facilitan este evento.⁵ En el espermatozoide de mamífero existen informes relacionados con la presencia tanto de actina como de microtúbulos en la región de la cabeza,⁶ por lo que es posible que en el acrosoma (membranas y matriz acrosomales) de estas células existan proteínas contráctiles como tubulina y actina, las cuales se ensamblan para formar microtúbulos y microfilamentos que participan en la dinámica de la reacción acrosomal. En el presente estudio se determinó cualitativa y cuantitativamente la presencia de estas proteínas en el acrosoma.

Recientemente se ha demostrado la participación de la calmodulina en la regulación de diversos sistemas enzimáticos y procesos celulares dependientes de calcio en todas las estirpes celulares estudiadas hasta ahora.⁷ El espermatozoide de mamífero no ha sido la excepción.⁸ Por lo tanto, en el presente estudio se incluyó la determinación cuantitativa y la distribución topográfica de la calmodulina en esta célula.

Por otra parte, debido a que en el microambiente periovariano de la región ampular de la trompa de Falopio existen una relación precisa progesterona-/estradiol,⁹ así como una GMPc/AMPc,¹ se determinó la participación de estos primeros y segundos mensajeros en la dinámica de la reacción acrosomal.

Finalmente, se propone que la interacción de hormonas esteroides y nucleótidos cíclicos con la membrana plasmática del espermatozoide, conjuntamente con la calmodulina, modulan la actividad de la adenilil ciclasa en esta célula, con el cambio

consecuente en la concentración intracelular de AMPc y la polimerización de proteínas contráctiles, los cuales a nivel acrosomal permiten que esta entidad se comporte, en parte, como un gránulo secretor durante la reacción acrosomal.

Material y métodos

Se utilizaron como modelo experimental cobayos Hartley, machos adultos, fértiles, los que fueron sacrificados por dislocación cervical. Los espermatozoides se obtuvieron de la cauda de epidídimo instilando 2 ml de NaCl-PO₄ 0.154M, pH 7.4, a través del conductor deferente. Las células se lavaron y concentraron por centrifugación (2x) a 300xg por 7 min, ajustando la concentración a 10⁶ células/ml.

A partir de esta suspensión celular se obtuvieron las siguientes fracciones: 1. espermatozoides completos, 2. fracción enriquecida de acrosomas, 3. matriz acrosomal, 4. membranas acrosomales, 5. espermatozoides sin acrosoma, 6. cabezas espermáticas, 7. flagelos-piezas medias, 8. membranas plasmáticas, 9. membranas acrosomales externas.

Fracción 2: los espermatozoides se homogeneizaron suavemente y se agitaron en vórtex para desprender los acrosomas. Esta fracción (membranas y matriz acrosomales) se recolectó en el sobrenadante después de centrifugar a 1000xg por 20 min a 4°C. *Fracción 3:* la fracción 2 se centrifugó a 100,000xg durante 30 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. *Fracción 4:* los acrosomas desprendidos según el procedimiento descrito se pasaron por un gradiente discontinuo de sacarosa.¹⁰ Se recolectó la interfase 0.9/1.08 M, y la fracción se concentró por centrifugación a 100,000xg durante 30 min a 4°C. *Fracción 5:* se recuperó en el precipitado del gradiente anterior. Las células se lavaron y concentraron por centrifugación a 300xg por 15 min a temperatura ambiente (2x), ajustándose a 10⁶ células/ml. *Fracciones 6 y 7:* se obtuvieron a partir de la fracción 5, según el método de Witkin y col.¹¹ *Fracciones 8 y 9:* los acrosomas se obtuvieron por el método descrito y la suspensión se estratificó sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (1.6, 1.3, 1.05 y 0.56 M), centrifugando a 164,000xg durante 90 min a 4°C. La fracción 8 se recuperó de la interfase 0.56/1.05 y la fracción 9 de la 1.05/1.3 (trabajo en prensa). Ambas fracciones se lavaron y concentraron por centrifugación a 174,000xg por 30 min a 4°C.

En las fracciones 1,3,4,8 y 9 se evaluaron actividades enzimáticas consideradas marcadoras de membranas y matriz acrosomal² y en todas las fracciones se determinaron las concentraciones de proteínas¹³ y ADN¹⁴ (Cuadro 1).

1. Regulación de la reacción acrosomal por nucleótidos cíclicos y hormonas esteroides.

Cuadro 1

	Membranas * Acrosomales	Matriz * Acrosomal	Membrana * Plasmática	Membrana Acro * somal Externa
PROTEINAS (mg/10 ⁸ esper- matozoides)	0.213 ± 0.028	1.27 ± 0.12	0.104 ± 0.031	0.119 ± 0.048
ADN (μg/10 ⁸ esper- matozoides)	No se detectó	No se detectó	No se detectó	No se detectó
ACTIVIDADES ENZIMATICAS				
Ca ⁺⁺ - ATPasa #	52.46 ± 17.7	10.9 ± 4.8	81.3 ± 31.4	41.4 ± 10.4
Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa #	72.34 ± 8.68	24.8 ± 11.4	101.3 ± 46.9	39.5 ± 21.2
Hialuronidasa π	264 ± 30	15250 ± 1283	No se determinó	No se determinó
Acrosina §	No se detectó	8.5 ± 0.5	No se determinó	No se determinó

nmolas Pi/min/mg de proteína.

π Unidades. Una unidad es la cantidad de enzima necesaria para digerir ácido hialurónico en la misma proporción que se obtiene con 1 μg de hialuronidasa estándar purificada.¹²

§ Unidades. Una unidad es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmola del éster etílico de la N-benzoil-L-argina (BAEE) por minuto.¹²

* Los datos representan el promedio ± D.E. de 6 determinaciones.

Alicuotas de 25 × 10⁸ espermatozoides de la fracción 1 se incubaron en Medio Capacitante Mínimo (MCM) durante 4h a 37°C, en 5% CO₂ + aire.⁶ A este sistema se adicionó en experimentos por separado: Ca⁺⁺ (1.25mM) y progesterona o 17-β-estradiol (5-100nM); Ca⁺⁺ (1.25mM) y AMPc o GMPc (10-100 μM); Ca⁺⁺ (1.25mM) y progesterona (25nM)-GMPc (100μM) o estradiol (nM)-AMPc (100μM).

Como control se utilizaron espermatozoides incubados en MCM y Ca⁺⁺. La reacción acrosomal se evaluó con microscopía de contraste de fase.⁶

2. Evaluación bioquímica de la actividad de adenil ciclasa.

Se utilizó la fracción 4 y la metodología descrita por Peterson y col.¹⁵ considerando: a) el efecto de Mn⁺⁺ como cofactor (2.5-10mM); b) diferentes concentraciones de sustrato (1-3mM), en condiciones basales y en presencia del cofactor; c) diferentes tiempos de incubación (10-30min); d) el efecto de la temperatura (30 y 37°C) y e) el comportamiento con respecto a pH (6.0-9.0). El AMPc formado se evaluó por radioinmunoanálisis, utilizando reactivos de Amersham.

3. Identificación de proteínas contráctiles en el acrosoma.

Para este objetivo se conjugó: a) el análisis electroforético de las fracciones 3 y 4;¹⁶ b) la inmu-

nofluorescencia con anticuerpos monoclonales para α-tubulina, β-tubulina y actina^{17,18} en espermatozoides intactos y con reacción acrosomal y c) el radioanálisis utilizando los mismos anticuerpos monoclonales, acoplados con IgG-I²⁵ (10μCi/μg de proteína),^{17,18} en las fracciones 3,4,8 y 9.

4. Evaluación de la distribución subcelular de calmodulina.

La calmodulina se extrajo de las fracciones 1,3-7 y su concentración se determinó mediante radioinmunoanálisis.¹⁹ Los anticuerpos monoclonales, la IgG-I²⁵ y los reactivos para radioinmunoanálisis de AMPc y Calmodulina se obtuvieron de Amersham; los demás reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. y Merck.

Resultados

Cuando los espermatozoides se incubaron en presencia de esteroides o nucleótidos cíclicos, las concentraciones más eficientes para regular la reacción acrosomal fueron 25 mM para progesterona, 5 nM para 17-β-estradiol y 100 μM para AMPc o GMPc. En el caso de la progesterona y el GMPc, ambos compuestos indujeron un incremento significativo (p < 0.005) en el porcentaje de células con reacción acrosomal, efecto que fue más evidente cuando se incubaron los espermatozoides con los dos com-

puestos simultáneamente. En contraste, tanto 17- β -estradiol como AMPc disminuyeron la proporción de células con reacción acrosomal ($p < 0.0005$), siendo esta inhibición mayor cuando se incubó simultáneamente con ambos compuestos. (Cuadro 2).

Por otra parte, en las membranas acrosomales se determinó la actividad de adenilil ciclasa. Las condiciones óptimas de incubación incluyeron la presencia de Mn^{++} como cofactor a concentración de 10 mM y ATP 2 mM; el tiempo óptimo de incubación fue de 15 min a 30°C, con un pH de 7.8. La actividad específica obtenida en estas condiciones fue de 4.00 nmolas de AMPc/min/mg de proteína.

Se encontraron en el espermatozoide de cobayo $21.5 \pm 3.7 \mu\text{g}$ de calmodulina/ 10^8 células. La mayor concentración de calmodulina se localizó en la fracción de cabezas de espermatozoide, seguida por la presente en la matriz acrosomal, piezas medias-flagelos y membranas acrosomales. (Cuadro 3)

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se identificaron proteínas con características de movilidad relativa y peso molecular aproximado similares a las conocidas para actina y tubulina. (Fig. 1). Asimismo, subsecuentemente se localizó a la tubulina asociada preferentemente con las membranas, principalmente en la fracción de

Cuadro 2

Regulación de la reacción acrosomal del espermatozoide de cobayo mediante esteroides y nucleótidos cíclicos

Tratamiento	% Reacción acrosomal	
	(Inducción)	(Inhibición)
CONTROL		
—	67 ± 3 (0%)	67 ± 3 (0%)
PROGESTERONA (P_4)	76 ± 4 (13%) *	—
GMPc	83 ± 2 (24%) #	—
P_4 + GMPc	90 ± 3 (34%) #	—
17- β -ESTRADIOL (E_2)	—	52 ± 2 (22%)
AMPc	—	49 ± 4 (27%)
E_2 + AMPc	40 ± 3 (40%)	

* $p < 0.005$ en relación al control. Prueba t de Student

$p < 0.0005$ en relación al control. Prueba t de Student

Cuadro 3

Distribución Subcelular de calmodulina, proteína y ADN en los espermatozoides de cobayo

	Calmodulina*	Proteínas §	ADN *
ESPERMATOZOIDE COMPLETO	25.1 ± 3.7 (100%)	2.10 ± 0.21	338.0 ± 35.1
ESPERMATOZOIDE SIN ACROSOMA	13.6 ± 4.0	0.82 ± 0.01	281.6 ± 20.9
CABEZAS	9.1 ± 2.6 (46%)	0.43 ± 0.11	282.2 ± 17.2
PIEZAS MEDIAS Y FLAGELOS	1.5 ± 0.4 (7.6%)	0.32 ± 0.09	N.D.
MEMBRANAS ACROSOMALES	0.16 ± 0.05 (0.8%)	0.213 ± 0.028	N.D.
MATRIZ ACROSOMAL	11.0 ± 1.3 (43.8%)	1.27 ± 0.12	N.D.

* $\mu\text{g}/10^8$ espermatozoides

§ $\text{mg}/10^8$ espermatozoides

N.D. = no se detectó

Los datos representan el promedio \pm D.E. de 6 determinaciones

membrana acrosomal externa, predominando la subunidad α de esta proteína (4/1 en relación con la β -tubulina (Cuadro 4). También se localizó tubulina soluble en la matriz acrosomal, con una relación α/β de 2/1. (Cuadro 4).

Por otra parte, el patrón de distribución de la fluorescencia en los espermatozoides con reacción acrosomal indicó la presencia de tubulina en la membrana acrosomal interna; sin embargo, es de llamar la atención que este patrón se observó solamente con el anticuerpo anti β /tubulina. (Fig. 2).

Los resultados de la electroforesis, (Fig. 1) así como la interacción del anticuerpo anti-actina con los espermatozoides y las membranas acrosomales (Fig. 2, Cuadro IV) indican que el acrosoma de los espermatozoides de cobayo posee un tipo de actina no muscular. Sin embargo, los resultados de inmunofluorescencia indirecta indicaron que la actina se localizó solamente a membrana acrosomal interna. (Fig. 2).

Discusión

Con base en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, varios investigadores han sugerido que en la regula-

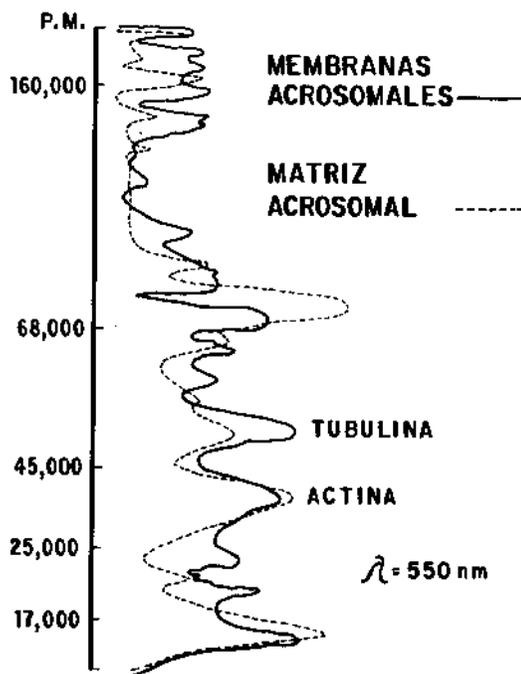


Fig. 1. Perfiles densitométricos característicos, obtenidos a 550 nm, de los geles de poliacrilamida-SDS que contenían proteínas obtenidas de membranas acrosomales y matriz acrosomal, según se describe en la sección correspondiente. En la barra vertical están colocados los marcadores de peso molecular según su comportamiento electroforético bajo las condiciones experimentales utilizadas.

ción de la reacción acrosomal participan tanto componentes propios de las estructuras acrosomales, como del microambiente con que interaccionan los espermatozoides, incluyendo péptidos del líquido folicular, del *cumulus* y de la *zona pellucida*.^{2,3,4,6,20}

En mamíferos, los nucleótidos cíclicos participan en este proceso. De acuerdo a los resultados obtenidos, (Cuadro 2), los cambios en la proporción de estos compuestos, así como la presencia de calcio parecen ser efectores de la inducción de la reacción acrosomal. El AMPc exógeno puede ejercer su efecto al unirse a receptores membranales en la región apical de la cabeza, los que parecen estar asociados con la activación de las proteínas cinasas, fosforilando componentes de esta entidad, lo que a su vez se traduce en cambios en el transporte de iones y sustratos.¹

Por otra parte, no obstante que generalmente se asume que los esteroides difunden pasivamente hacia el citosol para interaccionar con receptores citoplasmáticos, se ha demostrado que estas hormonas poseen receptores en la membrana celular y que esta interacción induce cambios en las propiedades biofísico-químicas y las funciones membranales.^{10,21} De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, es posible que durante las últimas etapas de la capacitación, la interacción específica de progesterona y 17- β -estradiol con las membranas acrosomales module la relación GMPc/AMPc intraacrosomal necesaria para que se lleve a cabo la reacción acrosomal.

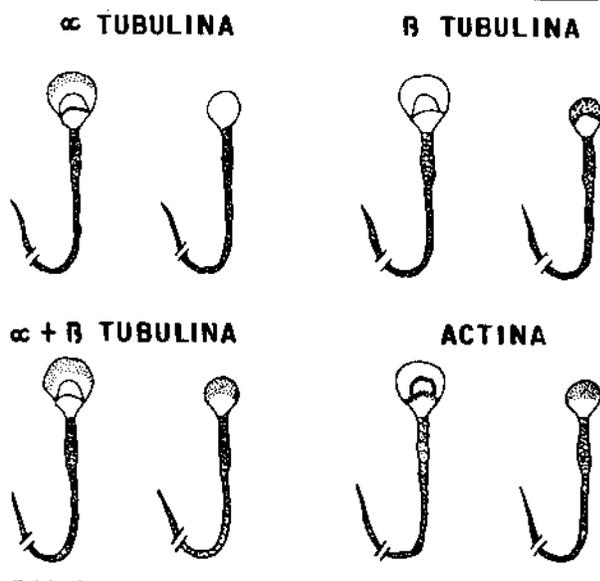


Fig. 2. Representación esquemática de los patrones de fluorescencia observados al incubar espermatozoides de cobayo en presencia de anticuerpos monoclonales anti α -tubulina, anti β -tubulina y anti actina, e IgG-Fluoresceína. El esquema se construyó a partir de las imágenes observadas en el microscopio de fluorescencia. Los esquemas corresponden a los espermatozoides antes y después de la reacción acrosomal.

Cuadro 4

Unión de los anticuerpos monoclonales para proteínas contractiles a las fracciones de acrosoma*

	Anti α -Tubulina	Anti β -Tubulina	Anti Actina
FRACCION DE MEMBRANAS			
PLASMATICA	19.5 \pm 1.8	4.8 \pm 1.1	6.0 \pm 1.6
ACROSOMAL EXTERNA	47.2 \pm 3.7	11.8 \pm 1.6	7.9 \pm 1.9
FRACCION DE MATRIZ ACROSOMAL			
	12.8 \pm 1.6	6.7 \pm 1.5	N.D.

* ng de anticuerpo unido/ μ g de proteina
Promedio \pm D.E. de 6 determinaciones
N.D. = No se detectó

Debido a que la presencia de adenilil ciclasa en las membranas acrosomales ha sido determinada tanto bioquímica (resultados de este trabajo) como histoquímicamente (manuscrito en preparación), el

efecto de la interacción esteroide-receptor-membranas pudiera llevarse a cabo a través de la regulación de la actividad de esta enzima, según lo observando) en ovocitos de *Xenopus laevis*.²² Sin embargo, la actividad de adenilil ciclasa en el acrosoma podría estar modulada también a través del complejo calcio-calmodulina, como sucede en otras estirpes celulares.⁷

Los resultados de la distribución topográfica cuantitativa de calmodulina en el espermatozoide de cobayo, apoyan substancialmente las evidencias previas de la presencia de esta proteína en estas células, obtenidas mediante inmunofluorescencia indirecta.²³

El requerimiento de calcio para que se lleve a cabo la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamífero está bien documentado.³ Por lo tanto, la calmodulina podría tener un papel modulador en este proceso, ya que está presente en la región acrosomal y se ha demostrado que regula la actividad de enzimas involucradas en este evento.²⁴

Por otra parte, tanto el complejo calcio-calmodulina como los nucleótidos cíclicos participan concertadamente en la regulación de la polimerización de la tubulina y la actina en todas las células estudiadas,^{5,7} incluyendo posiblemente al acrosoma del espermatozoide. La identificación cuali y cuantitativa de proteínas contractiles en este organelo, tanto solubles como unidas a membrana con una relación α/β tubulina similar a la comunicada en membranas,²⁵ (Cuadro 4) apoya substancialmente la participación de estructuras tubulares y microfilamentos en la reacción acrosomal, como ha sido sugerido.⁶ Estas proteínas parecen regular allá múltiples procesos, como la contracción,³ el acercamiento de las membranas para su fusión,² la fijación y transporte de las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma⁴ o la movilidad de componentes membranales como los receptores,² entre otros.

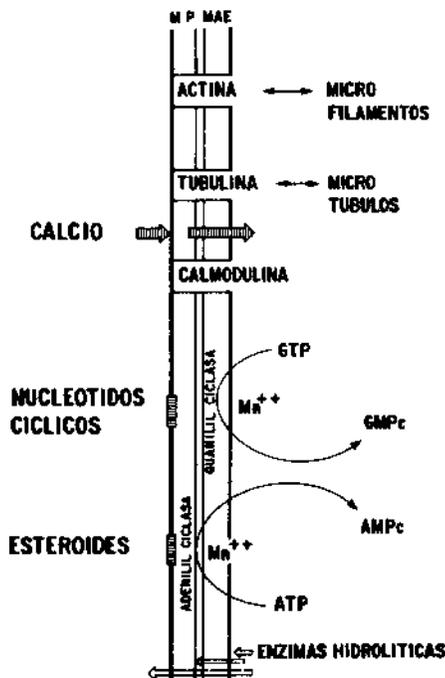


Fig. 3. Modelo esquemático desarrollado para explicar parte de los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la reacción acrosomal.

En la figura 3 se presenta un modelo esquemático que resume la discusión de los resultados obtenidos, con la finalidad de explicar la parte propuesta de los mecanismos moleculares que participan en la dinámica de la reacción acrosomal del espermatozoide de mamífero.

Agradecimientos

Se agradece al Biol. Raul Martínez Zaguilán y a la Q.F.B. Maricela Luna Muñoz su participación en los proyectos de investigación que integran este trabajo. Asimismo, se agradece a Denise D'Arcé y Lucía Ponce de León Basave su experta colaboración secretarial.

REFERENCIAS

- REYES, A.; CHAVARRÍA, M.E.; ROSADO, A.: *Interference with spermatozoa capacitation*. En: Cunningham, G.R.; Schill, W. B. y Hafez, E.S.E., eds. *Clinics in andrology*, Vol. 5: Regulation of male fertility. La Haya, Martinus Nijhoff Pub., 1980. Pág. 132.
- YANAGIMACHI, R.: *Mechanisms of fertilization in mammals*. En: Mastroianni L. Jr. y Biggers J.D., eds. *Fertilization and embryonic development in Vitro*. Nueva York, Plenum Press, 1981. Pág. 81.
- MEIZEL, S.: *The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach*. En: Johnson M.H., ed. *Development in Mammals*. Amsterdam, North Holland Press, 1978. Vol. 3:1.
- MEIZEL S.: *The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction*. *Biol. Rev.*, 1984;59:125.
- DUSTIN P.: *Secretion, exo-and endocytosis*. En: Dustin P., ed. *Microtubules*. Berlin, Springer-Verlag, 1978. Pág. 284.
- REYES, A.; CHAVARRÍA, M.E.: *Interference with acrosome reaction of spermatozoa by tubulin and actin-like protein inhibitors in guinea pigs*. *Contracept. Deliv. Syst.*, 1985; Monograph II: 256.
- MEANS, A.R.; TASH, J.S.; CHAFOULEAS, J.G.: *Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells*. *Physiol. Rev.*, 1982; 62:1.
- TASH, J.S.; MEANS, A.R.: *Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium*. *Biol. Reprod.*, 1982;26:745.
- WU, C.H.; MASTROIANNI, L. JR.; MIKHAIL, G.: *Steroid hormones in monkey oviductal fluid*. *Fertil. Steril.*, 1977; 28:1250.
- PIETRAS, R.J.; SZEGO, C.M.: *Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasm membranes*. *Biochem. J.*, 1980;191:743.
- WITKIN, S.S.; KORNGOLD, G.C.; BENDICH, A.: *Ribonuclease-sensitive DNA-synthesizing complex in human sperm heads and seminal fluid*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975; 72:3295.
- PRIMAKOFF, O.; MYLES, D.G.; BELLVE, A.R.: *Biochemical analysis of released products of mammalian acrosome reaction*. *Dev. Biol.*, 1980;80:324.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.; RANDALL, R.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193:265.
- GILES, K.W.; MYERS, A.: *An improved diphenylamine method for the estimation of desoxiribonucleic acid*. *Nature*, 1965; 206:93.
- PETERSON, R.N.; RUSSELL, L.; HOOK, L.; BUNDMAN, D.; FREUND, M.: *Characterization and localization of adenylil cyclase in membrane vesicles and intact boar and human spermatozoa*. *J. Cell Sci.*, 1980; 43:93.
- LAEMMLI, U.K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970; 227:680.
- GOZES, I.; BARNSTABLE, C.J.: *Monoclonal antibodies that recognize discrete forms of tubulin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 1982; 79: 2579.
- FAGRAEUS, A.; ORBELL, C.; NORBEG, R.; NORRBY, E.: *Monoclonal antibodies to epitopes shared by actin and vimentin obtained by paramyxovirus immunization*. *Exptl. Cell Res.*, 1983; 145: 425.
- CHAFOULEAS, J.G.; DEDMAN, J.R.; MUNJAAL, R.P.; MEANS, A.R.: *Calmodulin: development and application of a sensitive radioimmunoassay*. *J. Biol. Chem.*, 1979; 254: 10262.
- BLEIL, J.D.; WASSARMAN, P.M.: *Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zon pellucida glycoprotein*. *Dev. Biol.*, 1983; 95:317.
- HERNÁNDEZ-PÉREZ, O.; BALLESTEROS, L.M.; ROSADO, A.: *Binding of 17-β-estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa*. *Arch. Androl.*, 1979; 3: 23.
- SADLER, S.E.; MALLER, J.L.: *Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes*. *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 6368.
- JONES, H.P.; LENZ, R.W.; PALEVITZ, B.A.; CORMIER, M.J.: *Calmodulin localization in mammalian spermatozoa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980; 77: 2772.
- BREITBART, H.; DARCHAN, R.; RUBINSTEIN, S.: *Evidence for the presence of ATP-dependent calcium pump and ATPase activities in bull sperm head membranes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984; 122:479.
- GOZES, I.; LITTAUER, U.Z.: *The α-subunit of tubulin is preferentially associated with brain presynaptic membrane*. *FEBS Lett.*, 1979; 99: 86.