

Visión Comparada de la Fecundación en Metazoos

Alicia G. Molinero¹

¹Licenciatura en Ciencias Biológicas

RESUMEN

¿Existen similitudes en cuanto a la reproducción entre la gran diversidad de metazoos? En concreto, ¿existen similitudes a nivel de la capacitación del espermatozoide, la composición de las membranas oocitarias, la unión espermática, la reacción acrosómica, la fusión gamética, la activación oocitaria o en la formación del cigoto? En este trabajo se intenta realizar una labor divulgativa del trabajo realizado por J.J. Tarín titulado "*Fertilization in protozoa and metazoan animals: a comparative overview*". También se realizará una breve reseña histórica del descubrimiento de procesos como los "determinantes" de Weismann, que contribuyeron a iniciar el estudio de la fecundación en metazoos.

ABSTRACT

Are there any similarities in reproduction among the great diversity of metazoans? Specifically, are there similarities in the sperm capacitation, the composition of oocytarian membranes, sperm binding, the acrosome reaction, the gamete fusion, oocyte activation or the formation of the zygote? This paper attempts an informative work of the work of JJ Tarín titled "Fertilization in protozoa and metazoan animals: a comparative overview." There will also be a brief history of the discovery process as "determinants" of Weismann, who helped initiate the study of fertilization in metazoan.

INTRODUCCIÓN

Típicamente los estudios de diferenciación celular durante la embriogénesis están basados en oocitos de *Xenopus laevis*, por eso es interesante exponer una visión comparada con respecto a otros grupos de metazoos, tanto vertebrados como invertebrados y analizar sus similitudes y diferencias tanto a nivel celular como a nivel molecular.

En el estudio de la embriología se obtuvieron las primeras evidencias de diferenciación celular. En 1887 Laurent Chabry —por aquel entonces estudiante de ciencias naturales— demostró por primera vez la especificación celular autónoma mientras trataba de explicar algunas anomalías que se originaban durante el desarrollo embrionario. A partir de cigotos de tunicados, fue eliminando diferentes células en estadio de blástula, los resultados concluyeron que todas las células se desarrollaban de forma independiente a las células vecinas, cada blastómero formaba un conjunto de células del organismo adulto. Además, observó que manteniendo en cultivo las células aisladas, desarrollaban las estructuras correspondientes a las que darían lugar en el organismo adulto (cf. Fischer, 1990). En 1880 August Weismann propuso la presencia de unas moléculas (denominadas "determinantes") en el núcleo del cigoto, y que durante la fecundación, éstas se repartirían entre las células hijas; por tanto, el destino de estas estaría predeterminado por los compuestos "determinantes" (cf. Fischer, 1990). Más tarde, en 1888, Wilhelm Roux demostró la hipótesis de Weismann,

destruyendo uno de las dos blastómeros que se forman tras la primera división del cigoto; el resultado era el desarrollo de la mitad de una larva de rana. Efectivamente, cada célula se desarrollaba independientemente del resto, sus destinos estaban marcados por sus "determinantes" nucleares (cf. Fischer, 1990). Más tarde, Hans Driesch observó algo contradictorio cuando, además de destruir el blastómero, de ese cigoto en estadio de dos células que trabajó Roux, lo eliminaba del embrión. Estos organismos seguían un patrón de desarrollo regulativo, y no en mosaico como ocurría en los embriones de Roux, ya que cuando eliminaba el blastómero que había destruido en el estadio de 2 células, este blastómero sí desarrollaba una larva normal, pero de menor tamaño (cf. Fischer, 1990). La diferencia entre ambos ensayos, fue que Roux dejó los restos del blastómero destruido junto con al otro blastómero, y de alguna manera, las otras células "notaban" la presencia y no "regulaban". Por tanto, los experimentos de Driesch, fueron las primeras evidencias de especificación condicional, en la que las interacciones entre células vecinas las moléculas solubles secretadas por las células (morfógenos) restringen sus destinos.

En 1908, Alexander A. Maksimov, plantea por primera vez el término de célula madre, es uno de los principios más importantes del desarrollo condicional. Las células madre son células con capacidad de dividirse indefinidamente y originar cualquier tipo celular ("totipotencia"). Cuando estas se dividen pueden originar células que se dirigen a una diferenciación más o menos especializada, o a otras células madre que mantenga esa línea (Konstantinov, 2000).

Para poder realizar un estudio comparado de la fecundación, es conveniente comenzar por una definición operativa de la misma. La fecundación “*es el conjunto de procesos celulares y moleculares que resultan en la unión de dos células germinales o núcleos germinales para dar lugar un nuevo organismo con una única dotación génica*” (Tarín & Cano, 1999). La fecundación es el punto de partida de la embriogénesis en todos los organismos, pero en función del grupo está se puede clasificar en diferentes tipos: interna, externa, isogámica, anisogámica, ovogámica, etc.

En este trabajo se busca exponer brevemente las diferentes fases que tienen lugar en el proceso de fecundación en diferentes grupos de metazoos haciendo, por tanto, un análisis comparativo. En concreto se analizará la capacitación del espermatozoide, la composición de las membranas oocitarias, la unión espermática, la reacción acrosómica, la fusión gamética, la activación oocitaria y algunos mecanismos vinculados a esta última, la formación del cigoto.

DISCUSIÓN

Ambiente de la fecundación: capacitación del espermatozoide

La capacitación es un conjunto de cambios bioquímicos que conllevan una serie de cambios funcionales que le aportan al espermatozoide la capacidad de fecundar el oocito (Bedford, 1970). En algunos organismos, con fecundación interna, estos cambios tienen lugar en el interior del tracto reproductivo de la hembra. La capacitación es la suma de un conjunto de eventos rápidos, como la adquisición de la motilidad y de eventos lentos, como la capacidad para realizar la reacción cromosómica. Además hay que incluir los cambios morfológicos que

ocurren de forma concomitante, como es la preparación de la vesícula acrosómica y cambios en la cola. Este fenómeno tiene lugar en todos los mamíferos eutéricos (en monotremas no) y quizás en otros grupos de metazoos como los plathelminths o los pisciformes con formas de cuidado parental vivíparas (como algunos escualos).

La capacitación en los espermatozoides de mamíferos euterios responde a cambios reversibles en la membrana y se hace evidente por una motilidad hiperactiva, caracterizada por amplios movimientos del flagelo. Estos cambios se asocian a vías de transducción de señales dependiente de HCO_3^- . Los estudios sugieren que el transporte de esta molécula está mediado al menos por un cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC), esto se basa en que el transporte de HCO_3^- hacia el espermatozoide es electrogénico, dependiente de Na^+ , lo que aumenta el pH. Este pH se mantiene gracias a que ese potencial quimioeléctrico está bloqueado por estilbenos. La función de este ión es, probablemente, regular el metabolismo de cAMP, que es sintetizado por sAC. Uno de los puntos de acción del cAMP es la PKA, que una vez activada proteínas que se dirigen hacia diferentes rutas de señalización. El papel del colesterol en estas vías de señalización se desconoce. El BSA es un sustrato esencial en los experimentos de capacitación *in vitro* (Olivera *et al.*, 2006). Además, el proceso de capacitación suele ir acompañado de una hiperpolarización de la membrana del espermatozoide, por la salida de iones K^+ . (Fig. 2)

Se plantea que este proceso ha evolucionado porque desestabiliza la estructura de la superficie del espermatozoide. Esta “capsula” es “impuesta” durante el almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo (o su análogo evolutivo en otros filos).

Un ejemplo de los cambios que sufre el espermatozoide en su lugar de almacenamiento es el “factor estabilizante” de la vesícula acrosómica que actúa durante el

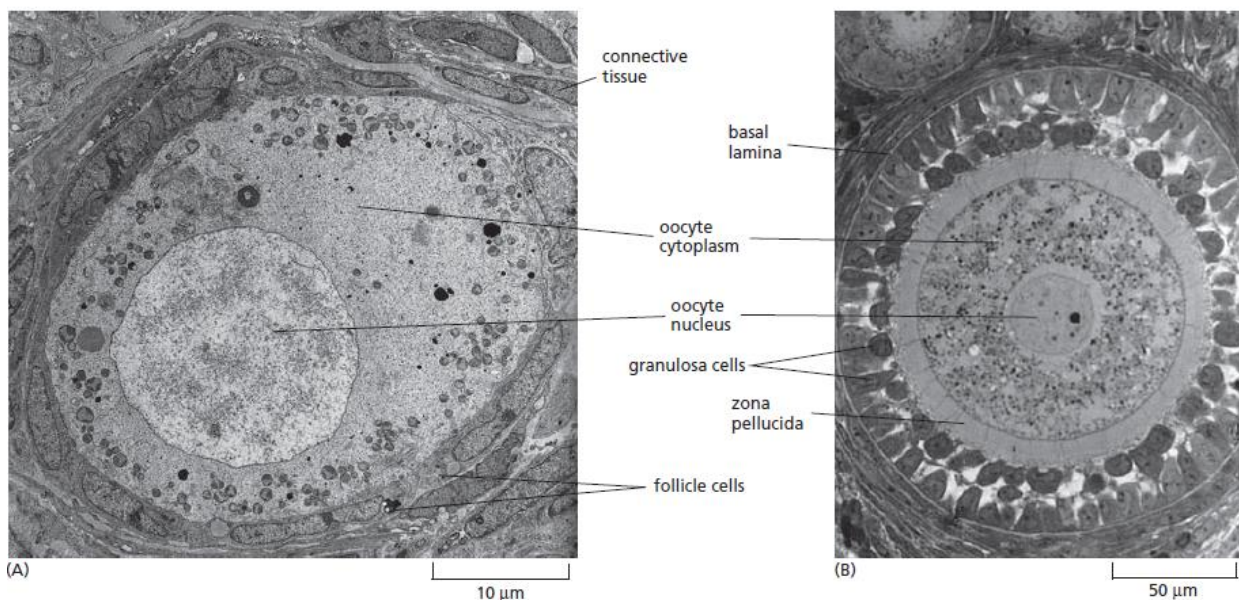


Fig. 1. Micrografía de Microscopía electrónica de transmisión correspondiente a la estructura interna de un oocito. Sección sagital (A) y sección transversal (B).

paso del espermatozoide a través de éste. Por tanto, esta cápsula, no sería una adaptación al paso del mismo por el tracto reproductor femenino (Reinhardt, 2007).

Esta hipótesis se sostiene ya que los espermatozoides de las aves, que también presentan una fecundación interna, no requieren un proceso previo de capacitación, pero sin embargo permanecen muy poco tiempo en el epidídimo; su longitud es significativamente menor a la de los mamíferos (Dollander & Fenart, 1986).

Composición de las membranas oocitarias

Los mamíferos eutéricos presentan una capa denominada zona pelúcida, constituida por glicoproteínas sulfatadas, que rodea a la membrana plasmática. Es segregada tanto por el oocito (Fig. 1) como por las células foliculares. Estas glicoproteínas se denominan ZP1, ZP2 y ZP3. ZP1 es una proteína estructural que entrelaza los filamentos formados por las otras dos glicoproteínas; ZP2 media la unión del espermatozoide, manteniéndolo unido a la membrana del oocito mientras tiene lugar la reacción acrosómica y ZP3 representa la unión específica entre el oocito y el espermatozoide mediada por la acción de la enzima galactosil transferasa y en la cual interviene una proteína denominada fertilina. Durante la fecundación, la membrana plasmática que queda por encima de la vacuola acrosómica del espermatozoide empieza a unirse a ZP3, lo que induce la reacción acrosómica. Tras estos cambios, el espermatozoide ya puede penetrar a través de la zona pelúcida, avanzando por medios físicos. Esto contrasta con los grupos de mamíferos subterios, donde el avance es favorecido por las funciones líticas de la reacción acrosómica (Tarín, 2000) Podemos distinguir, pues: I) tras la eyaculación los niveles de HCO₃⁻ en los alrededores del espermatozoide aumenta significativamente, II) el HCO₃⁻ entra en el espermatozoide a través de un cotransportador Na⁺/ HCO₃⁻ y III) el aumento de la concentración de HCO₃⁻ aumenta Sac y consecuentemente PKA.

Las glicoproteínas que constituyen la zona pelúcida de marsupiales, aves, anfibios y peces teleósteos comparten un gran porcentaje de homologías con las de los mamíferos eutéricos. La zona pelúcida de marsupiales está constituida por tres glicoproteínas ácidas que presentan un 50 % de homología con las de los mamíferos ZP1, ZP2 y ZP3. En las aves estudiadas (gallinas), una de las capas perivitelinas internas, denominada IPVL1 (o GP1), presenta un 41 % de las secuencias de aminoácidos idénticas a las de ZP3 de mamíferos. En el modelo de anfibios estudiado, *Xenopus laevis*, se ha observado que las glicoproteínas gp41 y gp69/64 de la membrana vitelina son homólogas a ZP3 y ZP2, respectivamente.

Por último, en el modelo de teleósteo, *Pseudopleuronectes americanus*, se ha caracterizado la glicoproteína wf_♀ del corion y presenta un 28 % de homologías con la glicoproteína ZP2 de la zona pelúcida estudiada en mamíferos.

La capa gelatinosa constituye el detonante de la reacción acrosómica en grupos de metazoos como son los anfibios y los equinodermos. Esta capa es necesaria para

la unión y la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del oocito.

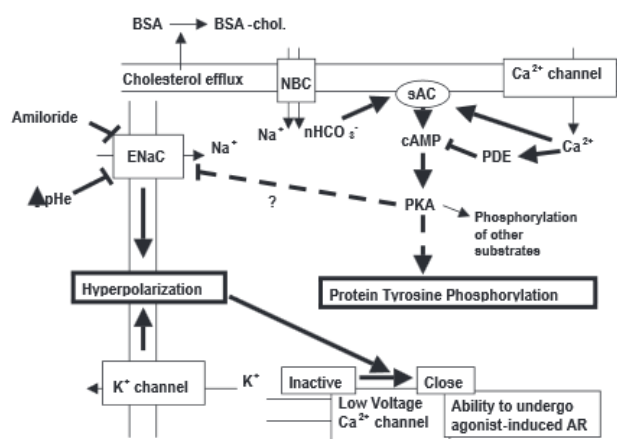


Fig. 2. Esquema del proceso bioquímico que acompaña a la capacitación del espermatozoide.

La diferencia en estos dos grupos, es que en anfibios se observan de tres a seis capas de proteínas altamente glicosiladas, mientras que en Echinoidea está constituida por una glicoproteína fucosilada principal inductora de la reacción acrosómica y por un grupo de péptidos activadores del espermatozoide (SAPs), que promueven el metabolismo de la fosfatidilcolina (PC) endógena y promueve la reacción acrosómica específicamente. En otros equinodermos de la clase Asterozoa, la membrana gelatinosa está constituida por tres elementos: una glicoproteína altamente sulfatada (Acrosome Reaction- Inducing Substance), un grupo de saponinas esteroideas sulfatadas (Co-ARIS) y un grupo de péptidos SAPs ricos en glutamina (asterosaps); todos estos componentes intervienen en la reacción acrosómica, pero el más importante son las proteínas ARIS. Se han hecho análisis de homologías entre los SAPs de ambas clases de Echinodermata y no se han encontrado evidencias significativas en las secuencias de dichos péptidos.

La membrana vitelógena que rodea a la membrana plasmática del oocito de equinodermos, está constituida por ocho glicoproteínas principales que están altamente manosiladas y contienen fucosa y N-acetilglucosamina.

Unión espermática

La unión de los gametos masculinos y femeninos durante la fecundación está mediada por el reconocimiento y expresión de receptores específicos en las membranas o envolturas de ambos. Estas sustancias están involucradas en el reconocimiento, en la unión, en la inducción de la reacción acrosómica e implican una barrera de fecundación entre especies.

En el caso de los oocitos, los estudios sugieren que es un conjunto de glicoproteínas específicas de la zona pelúcida (ZP3) las que median este proceso. Concretamente es un proceso mediado por carbohidratos de la

glicoproteína ZP3, que varían dependiendo del grupo animal que se estudie. En mamíferos, es O-oligosacárido.

En el caso de los espermatozoides, existe un gran número de proteínas que se expresan en su membrana plasmática y los estudios plantean que las interacciones pueden ser proteína-proteína, carbohidrato-proteína, carbohidrato-carbohidrato o una combinación de estas. En ratones la unión es β -1,4- galactosiltransferasa con la proteína 56 del esperma, mientras que en humanos es fosfolipasa A con la zona receptora ZRK del esperma.

Los espermatozoides de algunos urodelos utilizan una sustancia similar a la heparina en la superficie de la membrana plasmática; los Echinoidea es la proteína 210-kDa la que reconoce las proteínas de unión en la capa gelatinosa del oocito, esta proteína presenta un gran porcentaje de homologías en sus secuencias con la PKD1 (Polycystic Kidney Disease) en humanos.

Reacción acrosómica

Es la reacción que conduce a la liberación del contenido de la vesícula acrosómica del espermatozoide, lo que supone la posibilidad de penetrar a través de las diferentes capas que envuelven el oocito.

Los estudios comparativos entre metazoos invertebrados y vertebrados se basan en los organismos modelo típicos, equinodermos y mamíferos. Aunque filogenéticamente son grupos bastante separados, los mecanismos celulares y moleculares de éste proceso son muy similares. En ambos hay flujos de iones, entrada de Na^+ y Ca^{2+} , salida de H^+ y K^+ , alcalinización del medio intracelular y despolarización de la membrana plasmática. Estos mecanismos son necesarios para que tenga lugar la liberación de los contenidos de la vesícula acrosómica en algunos equinodermos, en cambio en otros grupos basta con un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico. En *Strongylocentrotus purpuratus*, una especie de la clase Echinoidea,

Fusión gamética

Los espermatozoides que han experimentado la reacción acrosómica fusionan su membrana con la del oocito por la zona opuesta a la de la posición de la vesícula acrosómica, mediante una serie de proteínas.

Son varias las proteínas implicadas en este proceso de la fecundación, pero la más estudiada es la fertilina. Es una proteína transmembrana heterodimérica con dos subunidades (α y β), ambas con dominios ricos en cisteínas. La subunidad β presenta una región similar a los dominios de proteínas de unión a integrinas, se trata de una desintegrina de la familia ADAM (A Destintegrin And Metalloproteinase) localizada en la membrana plasmática del espermatozoide. Por otra parte, la expresión de integrinas (e.g. $\alpha 6\beta 1$, en mamíferos) en la membrana del oocito se ha observado en diferentes grupos animales, que además de participar en la unión gamética intervienen en procesos de transducción de señales a través de la membrana, mediante la regulación iónica y vías de fosforilación/desfosforilación. En asociación con

estas integrinas se encuentran las proteínas CD9, esenciales para la fusión; en estudios con hembras mutantes para el gen codificante de esta proteína, se observa una significativa reducción de la fertilidad. Parece ser que CD9 facilita la interacción entre la integrina de la membrana del oocito y la fertilina, que es en último término la responsable de la fusión.

Se han hecho estudios con péptidos con dominios desintegrina miméticos a la subunidad β de la fertilina y estudios en los que se ha inducido una mutación puntual en los dominios desintegrina; tanto en uno como en otro se ha visto reducida significativamente la unión entre ambos gametos. Por eso se puede concluir que la fertilina- β participa en la unión gamética al unirse al receptor $\alpha 6\beta 1$. Por otra parte, la subunidad α de la fertilina podría estar implicada en la fusión gamética.

En cada grupo animal se observan especializaciones que sirven como método de barrera de fecundación entre grupos muy separados. En la clase Echinoidea, la proteína de unión espermática más estudiada es la bindina.

Activación oocitaria

Este fenómeno constituye una serie de procesos que tienen lugar en el oocito durante la fecundación y está bastante conservado en los diferentes grupos de metazoos. Un ejemplo de conservación lo encontramos entre los oocitos de ascidias y los de humanos, ya que al inyectar un extracto soluble de espermatozoides humanos en oocitos de ascidias se desencadena la vía de los fosfolípidos de inositol a partir de un incremento en la concentración de Ca^{2+} , imitando los primeros pasos de activación de los oocitos humanos (Wilding *et al.*, 1997).

El modelo más estudiado es el de mamíferos, en los que éste fenómeno viene desencadenado por la entrada del espermatozoide que provoca la liberación de Ca^{2+} en el oocito. Esto implica la activación de una serie de vías de señalización dentro del oocito. Los estudios plantean dos hipótesis en las cuales está implicada la fosfolipasa C (PLC). Una es la activación de la PLC por medio de una proteína quinasa transmembrana que, activada por la unión del espermatozoide a su receptor (e.g. RGD sensible a integrinas), inicia la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol. La PLC cataliza la hidrólisis de PIP_2 en IP_3 y DAG. El inositol trifosfato (IP_3) provoca la movilización del Ca^{2+} almacenado en los orgánulos citoplasmáticos. La otra hipótesis implicaría la entrada de un factor espermático soluble, que podría tratarse de una isoforma de la PLC, la PLC ζ , que desencadenaría la misma ruta. Existen estudios de microinyección que defiende la segunda opción, ya que inyectando en un oocito los componentes de la membrana plasmática del espermatozoide, no tiene lugar su activación; mientras que si se inyecta una fracción del citoplasma del espermatozoide, sí que se da. Aún así este factor no es el único componente necesario para la activación. Cuando se hacen experimentos de trans-complementación con contenidos espermáticos, en las muestras de extractos de espermatozoides se observa

una gran sensibilidad a los choques térmicos que impiden la activación, mientras que si el choque térmico se aplica al espermatozoide por completo, sí que tiene lugar la activación. Estos resultados concluyeron con la existencia de un componente altamente estable a elevadas temperaturas. (Perry *et al.*, 1999).

Sin embargo, en algunos decápodos marinos los oocitos son activados mediante el Mg^{+2} del agua

marina durante el desove. Aunque hay excepciones como esta, el mecanismo típico de activaciones un descenso o aumento en la $[Ca^{+2}]$ citoplasmático seguido de una despolarización de la membrana plasmática. Tras la activación se suceden fenómenos para evitar la poliespermia, fusión de pronúcleos, formación del huso acromático y las primeras divisiones celulares del cigoto.

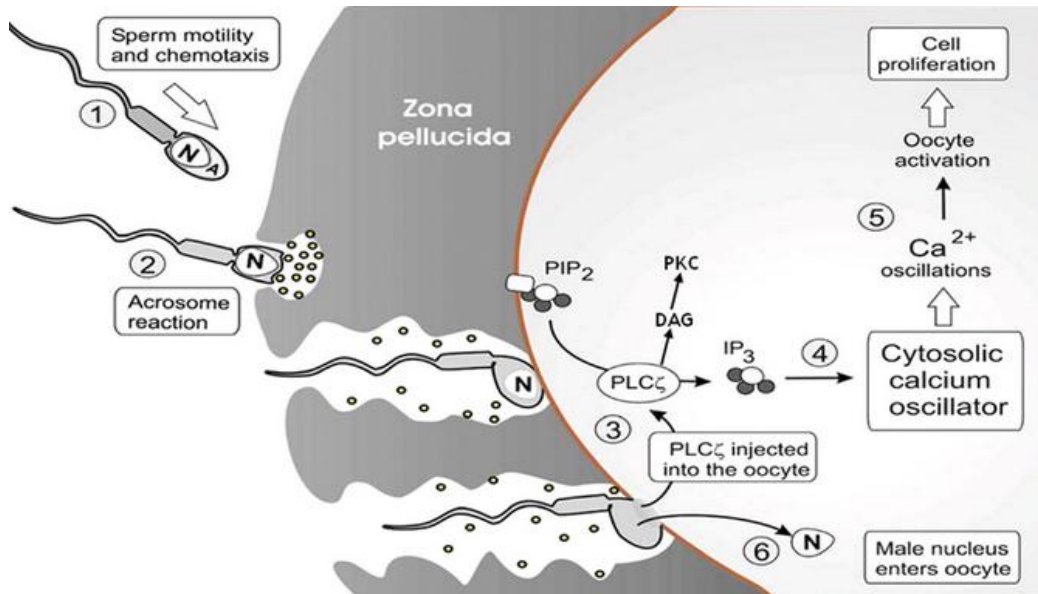


Fig. 3. Ruta de señalización de PLCζ de activación del oocito [Toamda de Berridge, 2009].

Mecanismos para evitar la poliespermia

El mecanismo más extendido es la despolarización de la membrana plasmática del oocito, a lo que se denomina potencial de fecundación. Es utilizado por muchos grupos de invertebrados y algunos anfibios. En cambio en los crustáceos decápodos tiene lugar una hiperpolarización. Estos cambios de potencial en la membrana son desencadenados por diferentes iones, Ca^{2+} , K^+ , Na^{2+} , Cl^- , en función del grupo animal.

En otros metazoos se observan otros patrones de cambios de voltaje en la membrana. Los oocitos de invertebrados no utilizan canales iones específicos para despolarizar la membrana. Algunos teleosteos marinos presentan una corta despolarización (debida a una salida inespecífica de iones), seguida de una hiperpolarización larga (debida a un aumento de K^+). Los anuros utilizan iones K^+ , canales de Na^+ y canales de Cl^- activados por voltaje

Sin embargo, el potencial de membrana vuelve a su valor normal en poco tiempo, por tanto es necesario un segundo mecanismo de bloqueo. Este se basa en la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol. En el momento en que entra el espermatozoide en el oocito, se produce un aumento de Ca^{2+} citosólico en el punto de entrada y se expande como una onda por todo el oocito. Este aumento

provoca la activación del oocito, que inicia la reacción cortical.

Esto provoca la liberación del contenido de los gránulos (proteasas, hialina, peroxidasas y mucopolisacáridos) presentes en la capa granulosa, lo que provoca cambios estructurales (ocasionados por proteólisis e hidrólisis) en las glicoproteínas de la zona pelúcida e impide la entrada de más espermatozoides. Además pueden surgir nuevas capas, como la capa hialina de equinodermos. También hay excepciones en las que no es necesaria la liberación de los gránulos para que tenga lugar la fecundación (e.g. clase Echinoidea y peces), pero cuando se da sigue el mismo patrón, en ondas, que la liberación de Ca^{+2} .

El proceso global de activación del oocito implica algunos procesos como la reacción cortical, la activación del metabolismo del oocito, la salida del arresto meiótico en metafase II (o profase I) y la síntesis de DNA, todo esto para seguir con los fenómenos de embriogénesis.

En todos los grupos de metazoos se observa un arresto meiótico (en metafase I, II, profase I o en interfase), mayoritariamente profecundación, por eso la entrada del espermatozoide, el consecuente aumento de Ca^{+2} y las rutas son la señal para reanudar el ciclo y formar un nuevo organismo. Esto no es así en todos los grupos, ya que algunos no necesitan ninguna señal (e.g. artrópodos).

El ciclo celular está regulado por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, que se regulan cíclicamente. Por eso, la entrada y salida de la meiosis puede ser entendida como un ciclo de activación/inhibición de estas moléculas. Concretamente la MAPK (Proteína Quinasa Activada por Mitógenos) y la ciclina B. Cuando se da la fecundación, el oocito se encuentra arrestado en la meiosis, aumenta transitoriamente la $[Ca^{+2}]$, que activa la calmodulina activa la CaMQuinasa II, que a su vez activa la degradación de Mos (Factor a partir del cual se origina la MAPK) y Ciclina B, y por tanto inactivan MAPK y MPF (Factor Promotor de la Mitosis).

Pronúcleos y formación del cigoto

En la fecundación de mamíferos, la unión de gametos haploides y la formación del cigoto diploide no son eventos inmediatamente consecutivos. Existe un intervalo en el cual se dan una serie de procesos entre los que se encuentra la aproximación de pronúcleos, la rotura de las membranas nucleares de cada gameto, fusión de husos acromáticos, etc. Los estudios mayoritariamente se basan en modelos de ratón y conejo. En los pronúcleos de conejo aparece una superficie muy irregular con invaginaciones, que contrasta con la de otros organismos como *Caenorhabditis elegans*, el conejo o el humano.

Existen diferencias entre los diferentes grupos de metazoos, la primera de ellas es que en algunos tiene lugar la fusión de pronúcleos femenino y masculino (protozoos y invertebrados marinos), mientras que en otros no se observa esta fusión, si no que se da una aproximación progresiva de los pronúcleos, seguida de una desintegración de sus membranas como preparación para la primera meiosis. La rotura de las envueltas pronucleares ocurre simultáneamente en ambos pronúcleos. Este proceso empieza por la aparición de huecos en las membranas y en el momento en el que empiezan a condensarse los cromosomas en el centro del cigoto, se rompen por completo las membranas. Los eventos que suceden aquí son muy similares a los que ocurren durante la rotura de la membrana nuclear durante la mitosis en células somáticas. La única diferencia es que en estas últimas no se observa la presencia de centriolos, que aportan los espermatozoides durante la fecundación. Este centriolo participa, en algunos organismos, en la formación del primer huso mitótico.

BIBLIOGRAFÍA

- Bedford, J. M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biology of reproduction. Supplement*, 2, 128.
- Dollander, A., & Fenart, R. (1986). Elementos de embriología. *Embriología general. Editorial Limusa SA, México*.
- Fischer, J. L. (1990). Experimental embryology in France (1887–1936). *Int J Dev Biol*, 34, 11-23.
- Konstantinov, I. E. (2000). In search of Alexander A. Maximow: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspectives in Biology and Medicine*, 43(2), 269-276.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.
- Perry, A. C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., & Yanagimachi, R. (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284(5417), 1180-1183.
- Reinhardt, K. (2007). Evolutionary consequences of sperm cell aging. *The Quarterly review of biology*, 82(4), 375-393.
- Tarín, J. J. (2000). Fertilization in protozoa and metazoan animals: a comparative overview. Springer Berlin Heidelberg.
- Tarín, J. J., & Cano, A. (1999). Do human concepti have the potential to enter into diapause?. *Human Reproduction*, 14(10), 2434-2436.
- Wilding, T. J., & Huettner, J. E. (1997). Activation and desensitization of hippocampal kainate receptors. *The Journal of neuroscience*, 17(8), 2713-2721.