



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES
Hospital General Centro Médico “La Raza”
Instituto Mexicano del Seguro Social

CARDIOPATÍA HIPÓXICA, FRECUENCIA, PRESENTACIÓN CLÍNICA Y
MÉTODOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO EN RECIÉN NACIDOS DE UNA
UNIDAD DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL.

TESIS RECEPCIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA MÉDICA

PRESENTA:



DRA. MARTHA ESPINOSA MALDONADO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI MADRE:

Enriquita, por haberme dado el ser,
por haber sembrado en mi el espíritu
de superación, por su apoyo
y confianza constante.

A MIS HERMANOS:

Daniel, Fco. Javier, José

Josué, Pedro, Enriqueta y

César Octavio.

A MIS PROFESORES:

Con agradecimiento por sus enseñanzas
y apoyo constante, con lo cual
nos indica el camino para la superación.

INDICE

| | |
|--------------------------------|----|
| 1) Objetivos | 1 |
| 2) Antecedentes científicos | 2 |
| 3) Planteamiento del problema | 5 |
| 4) Programa de Trabajo | 6 |
| 5) Criterio de inclusión | 7 |
| 6) Criterio de no inclusión | 8 |
| 7) Criterio de exclusión | 9 |
| 8) Material y métodos | 10 |
| 9) Resultados | 12 |
| 10) Gráficas | 14 |
| 11) Discusión | 19 |
| 12) Conclusiones | 21 |
| 13) Perspectivas de desarrollo | 22 |
| 14) Bibliografía | 23 |

OBJETIVOS

Establecer si la frecuencia, características clínicas y métodos auxiliares de diagnóstico de la cardiomiopatía hipóxica en recién nacidos del Centro Médico “La Raza” son similares a los reportados en la literatura mundial.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Desde 1947 ya se tenían conocimientos y se describían lesiones isquémicas miocárdicas en pacientes recién nacidos ⁽¹⁾. A partir de entonces continúan apareciendo en la literatura reportes de alteraciones transitorias de la función miocárdica sobretodo en niños con antecedentes de asfixia perinatal ⁽¹⁻⁴⁾.

Inicialmente la cardiopatía hipóxica (CMH) fue reportada como hallazgo de autopsia en recién nacidos de término, asociándose a embarazo normal, presencia de meconio al nacimiento y desarrollo de datos clínicos de insuficiencia cardiaca congestiva en los primeros días de vida extrauterina ⁽¹⁻⁴⁾. Trabajos más recientes han modificado el concepto de que la edad gestacional es un factor determinante en la presentación de este padecimiento, al demostrarse casos en niños pretérmino ⁽⁴⁾.

No existe predominio en cuanto al sexo, y hasta el momento se desconoce su verdadera frecuencia, dado que no hay estudios dedicados a la búsqueda intencionada de esta enfermedad en la población neonatal. Existen algunos reportes de pacientes fallecidos con antecedentes de hipoxia perinatal que mencionan necrosis del músculo papilar de la válvula tricúspide en un 29%. En dicho estudio la severidad de las lesiones miocárdicas no se correlacionaron con el peso al nacimiento y la edad de muerte postnatal ⁽⁵⁻⁸⁾.

Primhak y cols. así como Flores-Nava y cols. mencionan estudios con resultados similares: encontrándose hasta 51% de los pacientes incluidos en sus estudios con esta

patología; presentando el 41% cardiomegalia, 25% alteraciones electrocardiográficas, 20% insuficiencia cardiaca y el 80% elevación sérica enzimática⁽⁷⁾.

Es obligado se presente un evento hipóxico que anteceda las manifestaciones clínicas de la disfunción miocárdica, la cual se expresa como grados variables de insuficiencia cardiaca que pueden llegar hasta el choque cardiogénico. Es común encontrar además soplo sistólico de insuficiencia tricuspídea por disfunción del músculo papilar, retracciones intercostales, cianosis, taquipnea, etc. ⁽⁹⁻¹²⁾.

Dado que los mecanismos de hipoxia-isquémica pueden ser transitorios y de diferentes grados, podemos observar que dependiendo de esto el daño es inicialmente en el subendocardio, posteriormente en el miocardio y en grados más severos lesiones epicárdicas ⁽¹³⁾.

Para establecer el diagnóstico de cardiomiopatía hipóxica, además de las manifestaciones de insuficiencia cardiorrespiratoria, disminución de la intensidad de los ruidos, de los pulsos distales y hallazgos auscultatorios ya mencionados, existen métodos paraclínicos de gran ayuda diagnóstica como son el electrocardiograma en el que se pueden encontrar datos de isquemia subendocárdica e incluso infartos ^(3,4), la radiografía de tórax que generalmente muestra datos de cardiomegalia de grado variable con congestión venocapilar ^(4,13). Alteraciones bioquímicas como son la determinación de la fracción miocárdica de la creatin-fosfoquinasa, aunque ésta última también se ha observado elevada en lesiones a nivel de otros tejidos ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾, por lo que la validez de los resultados deberá de correlacionarse con la clínica y su determinación debe ser secuencial. Esta enzima se eleva característicamente en forma importante alcanzando un pico máximo a las 6 horas posteriores al evento hipóxico y desaparece a las 48 horas. ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Por otro lado Walsh y cols. establecieron parámetros electrocardiográficos normales en un grupo de pacientes prematuros durante la primera semana de vida encontrando un alargamiento del QT en las primeras 24 horas de vida en pacientes mayores de 1500 gramos y hasta 7 días después en menores de este peso⁽¹⁹⁾.

Un estudio realizado por Velíz y Cols. en nuestro hospital, hace suponer que la hipoxia podría jugar un papel importante en la producción de alteraciones en el sistema de conducción intraventricular, lo cual sería un parámetro muy importante de evaluación.⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

En relación con los niveles obtenidos de CPK total, dado que la elevación de ésta enzima depende de alguno de sus tres grupos de subunidades, tanto la fracción MM (traumatismo obstétrico, medidas terapéuticas iniciales), como la fracción BB (lesión neurológica secundaria a hipoxia) puede explicar este hecho. Existe por lo demás un incremento anormal de la CPK-MB en el músculo del recién nacido con antecedente de evento hipóxico^(21,22).

El examen ecocardiográfico es también de gran utilidad ya que permite descartar anomalías estructurales cardiacas, evalúa la función ventricular y diagnostica regurgitaciones valvulares sobre todo en la técnica Doppler^(11,16,23).

Los estudios con medio de contraste también han sido utilizados como métodos diagnósticos con resultados positivos, como la angiografía con radio-isótopos utilizando sodio y potasio radioactivos que permiten visualizar las zonas afectadas a través de defectos de captación⁽²³⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el servicio de Terapia Intensiva Neonatal del Hospital General y del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del Centro Médico “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social ingresan recién nacidos a término de los cuales algunos cuentan con el antecedente de hipoxia perinatal.

Por lo anterior es importante conocer la frecuencia representativa, las características clínicas y la utilidad de los auxiliares de diagnóstico para la identificación temprana de esta patología.

PROGRAMA DE TRABAJO

El estudio se realizó en pacientes recién nacidos a término, sin importar el sexo, con antecedentes de hipoxia perinatal de diverso grado que ingresaron en el Servicio de Terapia Intensiva del Hospital General y del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del Centro Médico "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social en el periodo comprendido del 1° de Diciembre de 1991 al 3° de Enero de 1992.

Se realizó con la colaboración de los servicios de Cardiología Pediátrica para la interpretación de electrocardiogramas, se requirió del servicio de Laboratorio Clínico de Urgencias Pediatría para la determinación de los niveles séricos CPK total y su isoenzima MB y del servicio de Radiodiagnóstico para la interpretación de estudios radiológicos de tórax.

CRITERIO DE INCLUSIÓN

Todo recién nacido a término, sin importar sexo, que ingrese al servicio de Terapia Intensiva Neonatal y que haya sido calificado con APGAR al minuto igual o menor a 6 puntos y de menos de 48 horas de vida extrauterina.

CRITERIO DE NO INCLUSIÓN

Aquellos recién nacidos a término que fallezcan en las primeras 12 horas de vida, que hayan recibido manejo de digitálicos o aquellos que fueron sometidos a masaje cardiaco.

CRITERIO DE EXCLUSIÓN

Paciente en el cual se detecte cardiopatía de tipo estructural por examen clínico o ecocardiográfico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en el cual se estudiaron a todos los recién nacidos a término, asfixiados y con edad extrauterino inferior a 48 horas que ingresaron al Servicio de Terapia Intensiva Neonatal del Hospital General y Hospital de Gineco-Obstetricia del Centro Médico “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social durante el periodo del día 1° de Diciembre de 1991 al 3° de Enero de 1992.

Durante este periodo se seleccionaron a 10 recién nacidos que cumplieron con el criterio de inclusión. A todos se les realizó exploración física con especial énfasis en la semiología cardiovascular con el fin de detectar datos de insuficiencia respiratoria y cardiaca, presencia de cianosis y datos auscultatorios de insuficiencia tricuspídea.

Se practicó estudio electrocardiográfico con aparato portátil antes de las 72 horas de vida extrauterina en el que se evaluaron alteraciones de la ONDA T, SEGMENTO ST y ONDA Q.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa antes de las 48 horas de vida extrauterina para investigar los niveles séricos de la fracción miocárdica de la creatin-fosfoquinasa (CPK-MB). Se consideró indicativo de lesión más del 18% del valor total de la CPK, utilizando método de inmuno-inhibición (Laboratorio Merck). Cuando se encontraron cifras mayores, se realizó seguimiento bioquímico a las 24 y 36 horas.

A todos los neonatos se les realizó estudio radiológico de tórax en proyección antero-posterior con equipo portátil modelo Phillips MCD-100, para detectar grados variables de cardiomegalia y congestión veno-capilar.

Los estudios electrocardiográficos fueron interpretados por un médico cardiólogo pediatra del Hospital General, los hallazgos obtenidos se compararon con los valores normales referidos en la literatura.

En cuanto a los estudios radiológicos, fueron interpretados por un médico radiólogo del Hospital General, determinándose el índice cardiorácico en todos los casos.

El diagnóstico de cardiomiopatía hipóxica se estableció ante la presencia de manifestaciones clínicas, alteraciones electrocardiográficas y bioquímicas ya mencionadas.

El análisis estadístico se realizó mediante medidas de tendencia central, tabulación de datos (histogramas) y cálculo de desviaciones estandar.

RESULTADOS

Durante el periodo referido ingresaron al servicio de Terapia Intensiva Neonatal de ambos hospitales un total de 10 neonatos que reunían los criterios de inclusión. El 60% correspondieron al sexo masculino. La edad gestacional media fue de 38.8 semanas con límite de 37-40 semanas y peso promedio de 3,146 grs. con límite de 2,500 gramos a 3,600 gramos. La valoración APGAR al minuto fue de 3-4 y a los 5 minutos de 6 como media. En cuanto a la vía de nacimiento, el 10% nació por cesárea (caso no. 2) el 50% por parto distócico (casos no. 6 y 10 por periodo expulsivo prolongado, caso no. 4 por presentación podálica con retención de hombros, caso no. 3 por presentación pélvica con retención de cabeza y el caso no. 7 por aplicación de forceps desconociéndose su indicación al igual que el caso no. 2 obtenido mediante cesárea), y el 40% por parto eutócico (casos no. 1 y 8 fortuitos, caso no. 9 se refiere sin problemas). En el 20% de los pacientes se detectó sufrimiento fetal agudo (casos no. 4 y 7) evolucionando con aspiración de meconio el 10% (caso no. 4). En lo que respecta a la sintomatología sólo el 40% cursaron con dificultad respiratoria (casos no. 2,3,5,8), requiriendo asistencia ventilatoria el 50% de los neonatos (casos no. 1,2,3,5,6) . sólo un paciente presentó datos de insuficiencia cardiaca congestiva (caso no. 4) y cardiomegalia (caso no. 4). En ningún paciente se auscultaron soplos. La frecuencia cardiaca media fue de 139 por minuto con límite de 100 a 160 por minuto y 2 desviaciones estandar con valor de 171 por minuto (fig. no. 1 y no. 2). El índice cardiocrítico se observó con límites de 0.55 a 0.88 con media de 0.60 y dos desviaciones estandar con valor de 0.73 (fig. no. 3 y no. 5). El flujo pulmonar sólo estaba incrementado en el 10% (caso no. 4). Como dato agregado se encontró encefalopatía hipóxica isquémica en el 80% de los casos, estadio I 50% (casos no.

1,4,5,9), estadio II el 37.5% (casos no. 6,7,8), estadio III el 12.5% (caso no. 3). En cuanto al estudio electrocardiográfico no observamos alteraciones sugestivas de cardiomiopatía hipóxica (ondas T simétricas, aplanadas o negativas; desnivel ST u onda Q anormal). Esta última con límites de 0.5 mm a 0.85 mm medidas en DII, con media de 0.60 mm y dos desviaciones estandar con valor de 0.73 mm (fig. no. 3 y 5). Como hallazgo se encontró en los casos no. 3 y 4 datos sugestivos de HAP (hipertensión arterial pulmonar), en general, el estudio electrocardiográfico en todos los casos se interpretó como normal. En cuanto a la CPK-MB se encontró con límites de 0.9% al 25% (fig. no. 4), la media fue de 9.16% con 2 desviaciones estandar con valor de 24.76% (fig. no. 5), los casos con CPK-MB mayor del 18% fueron el no. 3 (19.78%) y el no. 4 (25%). En el caso no. 3 la CPK-MB se normalizó a las 72 hrs. y en el no. 4 el paciente falleció a las 72 horas de vida.

FIGURA No. 1
FRECUENCIA CARDIACA

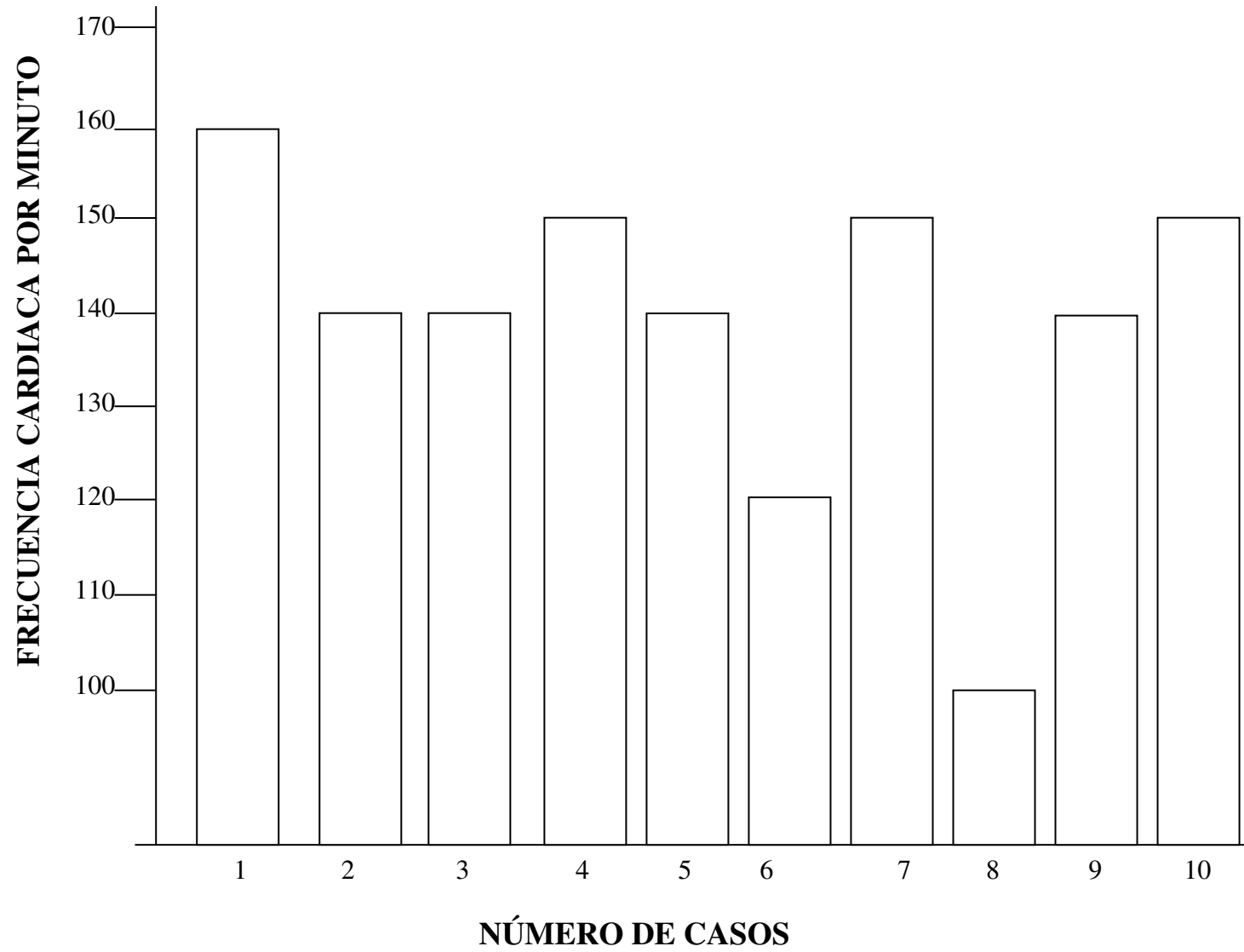


FIGURA No. 2
INDICE CARDIOTORACICO

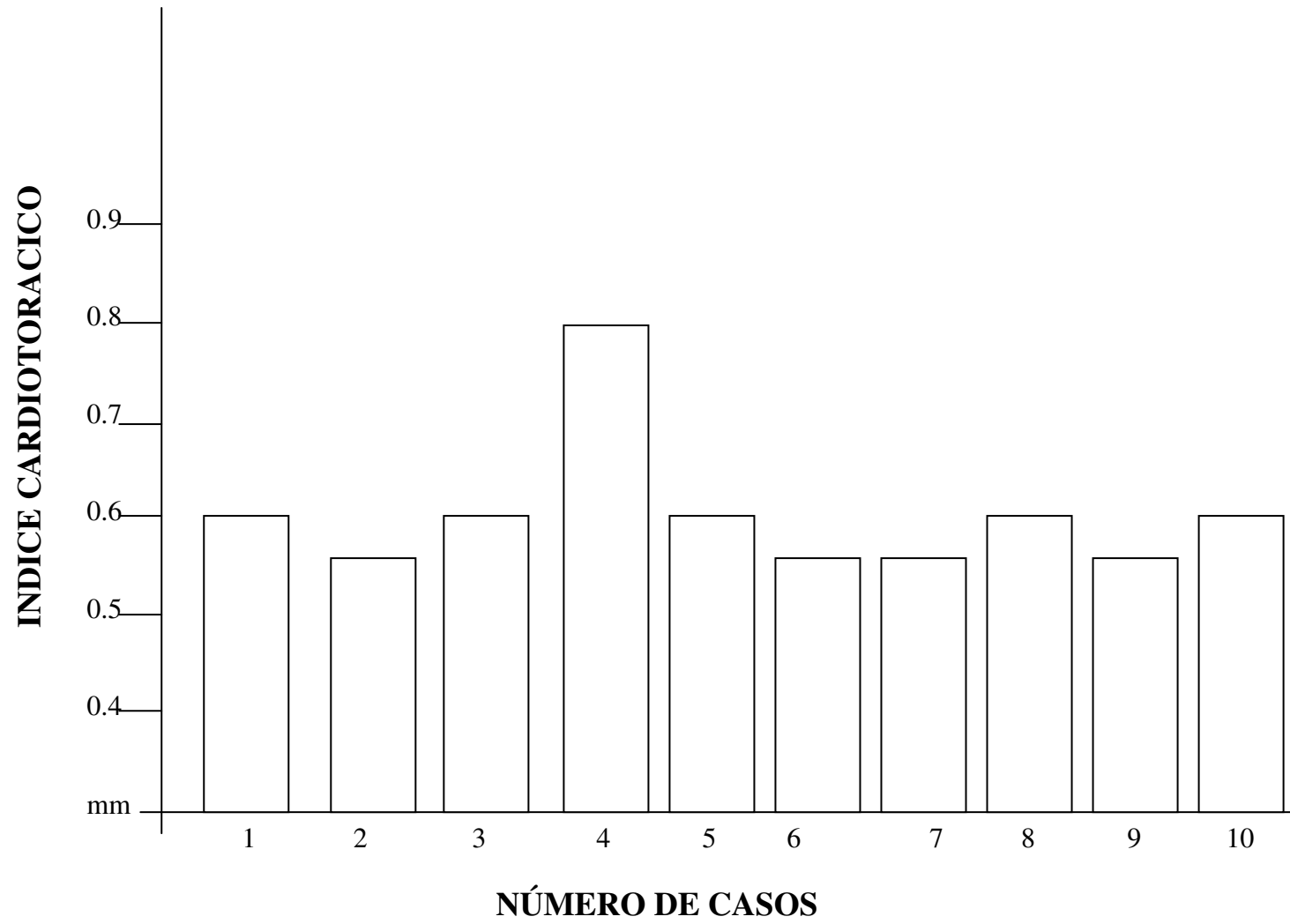


FIGURA No. 3
ONDA Q

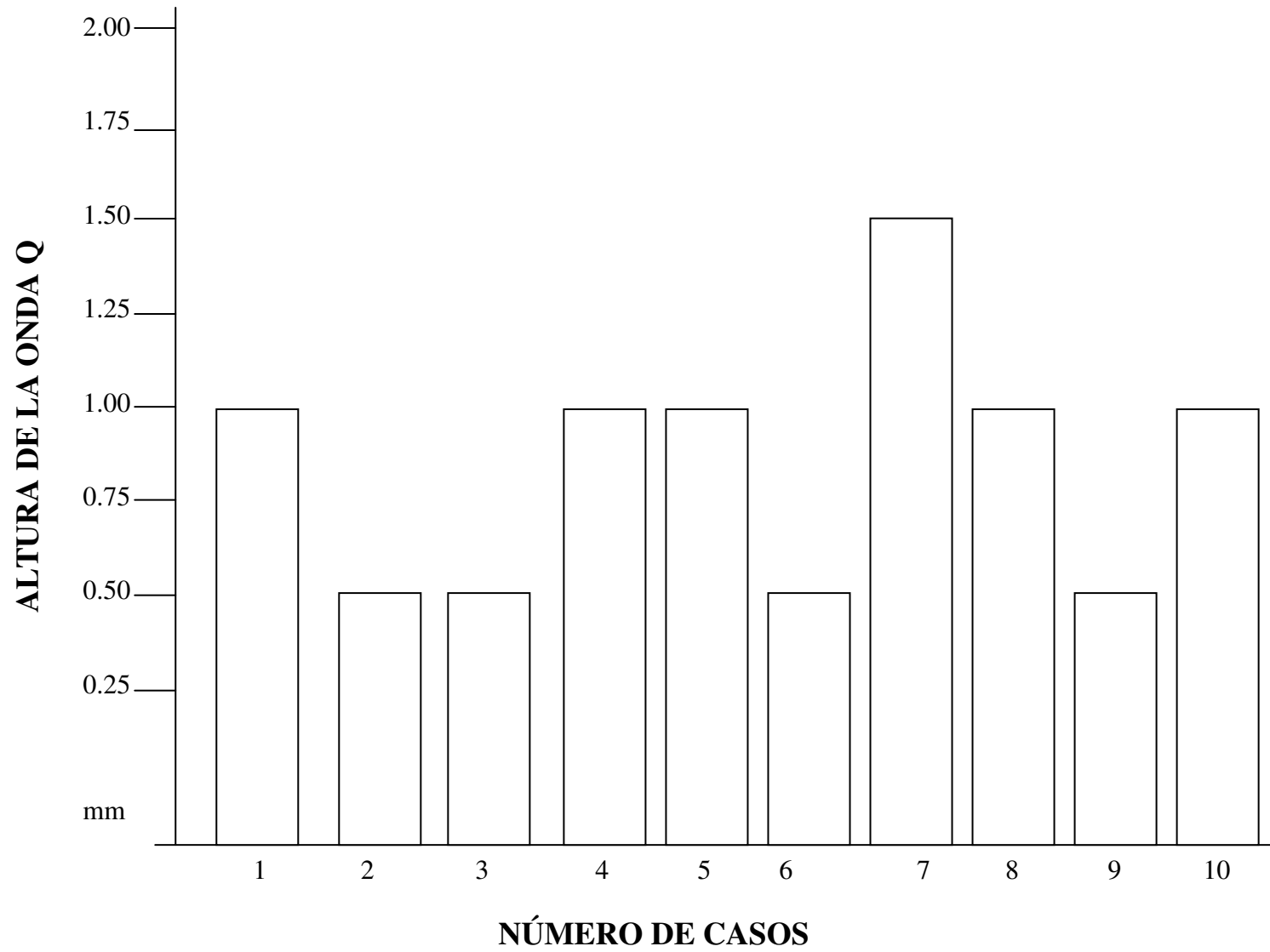


FIGURA No. 4
PORCENTAJE DE ISOENZIMA CPK-MB

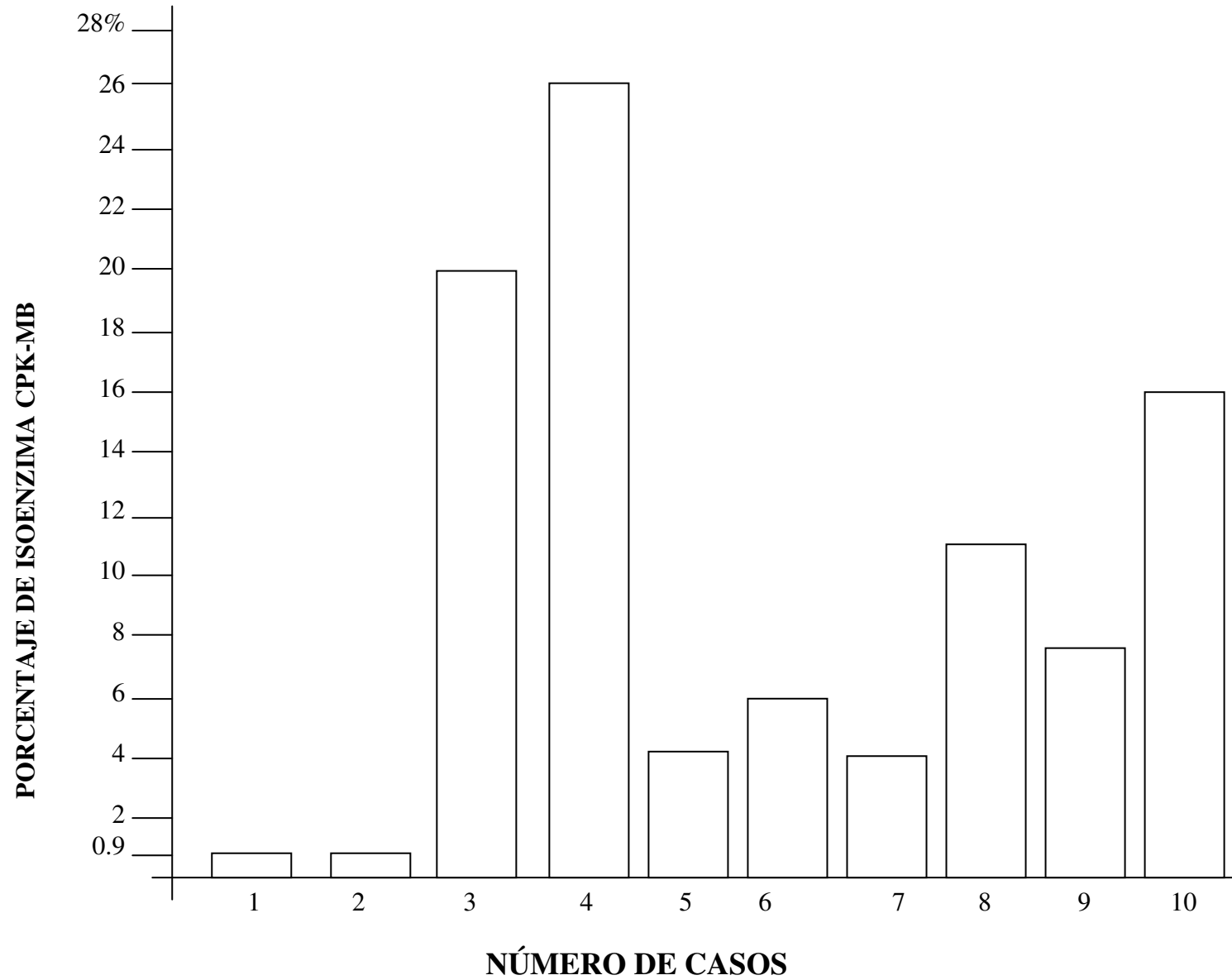
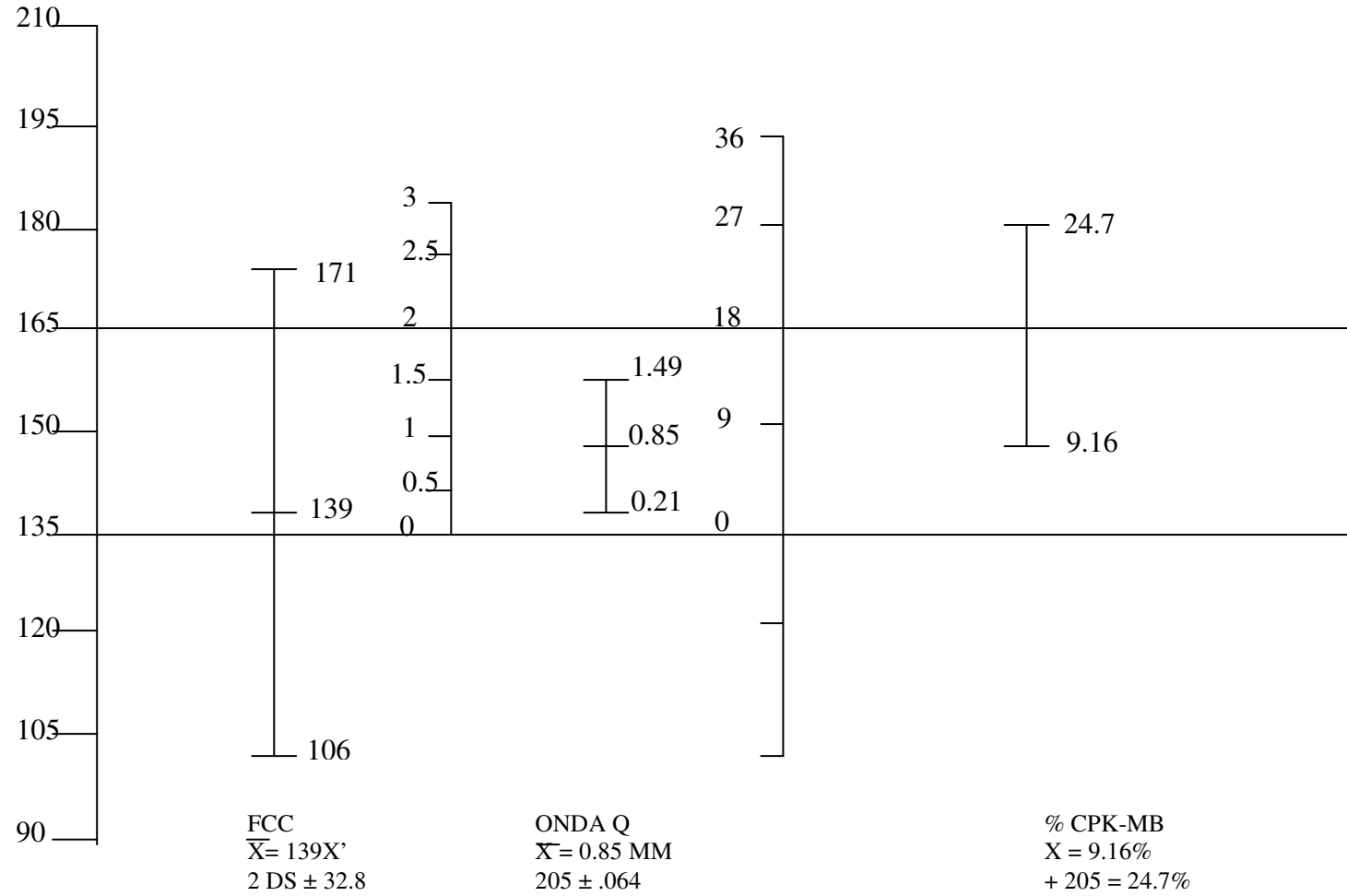


FIGURA No. 5
RESULTADOS DE FCC, ONDA Q, CPK-MB
COMPARACIÓN CON VALORES NORMALES PRE-ESTABLECIDOS



DISCUSIÓN

En nuestro estudio se revisaron 10 recién nacidos a término con asfixia neonatal de grado variable de los cuales dos presentaron alteraciones bioquímicas caracterizadas por elevación de la fracción MB de la CPK. Ninguno de los pacientes presentaron alteraciones electrocardiográficas y sólo uno cursó con insuficiencia cardiaca congestiva (caso no. 4). Los 2 pacientes tienen antecedente de trauma obstétrico, equimosis y laceraciones, (caso no. 3 y no. 4) que podrían explicar en un momento dado la elevación enzimática observada, sin embargo, se reporta en la literatura que el porcentaje de la fracción MB de la CPK no debe ser mayor del 18% en recién nacidos (21-22). En nuestro estudio ambos pacientes tienen elevación de la CPK-MB superior a lo referido (caso no. 3 de 19.-78%, caso no. 4 de 25%) y de acuerdo a la desviación estandar (2DE sólo el caso no. 4 tiene discreta elevación de la CPK-MB. Flores-Nava y cols. reportan para la determinación del porcentaje de la CPK-MB una sensibilidad del 85% y especificidad del 96% por lo que estos estudios tienen un valor diagnóstico importante (19). También se ha mencionado que el electrocardiograma tiene una sensibilidad del 73% lo cual pudiera explicar la falta de alteraciones electrocardiográficas en nuestros pacientes ya referidos. Por otro lado, la falta de alteraciones electrocardiográficas e incluso insuficiencia cardiaca no descartan lesión miocárdica ya que el grado de la misma dependerá de la duración y severidad del insulto hipóxico (11-12), pudiendo presentarse exclusivamente alteraciones enzimáticas sin traducción electrocardiográfica o clínica (comportándose generalmente en forma transitoria) (19-20).

Por último, dado que el número de pacientes estudiados no permite un análisis estadístico confiable, es conveniente estudiar una muestra de mayor dimensión para poder concluir la verdadera incidencia de esta entidad y comparar los estudios de fácil

acceso (CPK-MB) y Electrocardiograma) con aquellos más complejos como la captación de radio-isótopos (de mayor sensibilidad) para confirmar la utilidad de los primeros, sobre todo en los casos en que solamente hay elevación enzimática (específicamente CPK fracción MB) sin manifestaciones clínicas y/o electrocardiográficas.

CONCLUSIONES

- 1) La frecuencia de presentación de la Cardiomiopatía hipóxica en el Hospital General y Hospital de Gineco-Obstetricia No. 3 del Centro Médico “La Raza” es menor a lo reportado por otros autores ya que en nuestro estudio no encontramos pacientes que cumplieran con el criterio diagnóstico establecido.

- 2) Es necesario realizar más estudios con el objetivo de correlacionar entre sí los hallazgos bioquímicos y electrocardiográficos para el Dx de esta entidad.

PERSPECTIVAS DE DESARROLLO

En todo recién nacido con asfixia perinatal que desarrolle insuficiencia respiratoria, cardiomegalia, encefalopatía hipóxico-isquémica, y con o sin insuficiencia cardíaca se deberá realizar estudio electrocardiográfico y bioquímico (CPK-MB) para detección oportuna de cualquier grado de cardiomiopatía hipóxica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ravich R, rosemblatt P: Myocardial infarction in the newborn infant. J Pediatr 1947; 31:266-270.
- 2) Richard R, Benirschke K: Myocardial infarction in the perinatal period. J Pediatr 1959; 55:706-712.
- 3) Rowe R, Hoffman T: Transient Myocardial ischemia of the newborn infant: A form of severe cardiorespiratory distress in full term infants. J Pediatr 1972; 81:243-250.
- 4) Bucciarelli R, Nelson R, Egan I, Eitzman D, Gessner I: Transient tricuspid insufficiency of the newborn: A form of myocardial dysfunction in stressed newborn. Pediatrics 1977; 59:330-337.
- 5) Roew R, Izukwa T, Mulholland H, bloom K, Cook D, Swyer D: Nonstructural Heart disease in the newborn. Arch Dis Child 1978; 53:726-730.
- 6) Setzar E, Hermosilla R, tonkin I, Jhon E, Sansa M, Cassidi G. Papillary muscle necrosis in neonatal autopsy population: Incidence and associated clinical manifestation. J Pediatr 1980 96:289-293.
- 7) Primhak RA, Jedeikin R, Ellis G y cols. Myocardial ischemia in asphyxia neonatorum. Electrocardiographic, enzymatic and histologic correlation. Acta Pediatr Scand 1985; 74:595-600.
- 8) Jennins R, Gannote Ch, Reimerk K: Ischemic tissue injury. Am J Pathol 1975; 81:179-198.
- 9) Donnelly W, Bucciarelli R, Nelson R; Ischemic papillary muscle necrosis in expressed newborn infants. J Pediatric 1980; 96:295-300.

- 10) Cabal L, Devastar U, Isasi B, Hodgman J, Emmanoulides G: Cardiogenic shock associated with perinatal asphyxia in preterm infants. *J Pediatr* 1980; 96:705-710.
- 11) Lee M: Perinatal asphyxia and the myocardium: *J Pediatr* 1980 96:675-678.
- 12) Rudolph A. Developmental consideration in neonatal failure. *Hosp. prac.* 1985; 1:53-70.
- 13) Burnard E, James L: Failure of the Heart undue asphyxia at birth. *Pediatrics* 1961; 27:545-565.
- 14) Nelson R, Buciarelli R, Eltzman D, Egan E, Gessner T: FERUM creatine phosphokinase MB fraction in newborn with transient tricuspid insufficiency. *N. England J. Med:* 1978;298:146-149.
- 15) Rudolph N, Gross R: Creatine-phosphokinase activity in serum of the newborn infants as an indicator of fetal trauma during birth. *Pediatrics* 1966; 38: 1039-1046.
- 16) Pitt B, Stauss W: Myocardial imaging in the non invasive evaluation of patients with suspected ischemic Heart disease. *Am J Cardiol* 1976; 37; 797-806.
- 17) Gersony W, Morishina H, Daniel S, Kohls S, Cohen H, Brown W: Haemodynamic effects of intrauterine hypoxia: An experimental model in newborn lambs. *J Pediatr* 1976; 89: 631-635.
- 18) Desa J: Myocardial change in immature infants requiring prolonged ventilation. *Arch Dis Chile* 1977; 52: 138-147.
- 19) Flores-Nava, Echevarría-Ybarguengoitia, Navarro-Barrón. Et. All. Isquemia miocárdica transitoria en el recién nacido con asfixia perinatal (miocardiopatía hipóxica). *Bol. Medi Hosp. Infant Mex.* Vol 47. N 12. Dic 1990:806-814.
- 20) Veliz R, Olvera C, Ortiz U. *Temas Selectos de Terapia Intensiva Pediátrica* 1985. Mendez Oteo. México

- 21) Lang H, Wurzburg U: Creatine Kinase, an enzyme of many forms. Clin Chem 1982; 28:1439-1447.
- 22) Lang H: Creatine Kinase isoenzymes, Pathophysiology and clinical application. 1981 Ed Springer, Berlin-Heidelberg.
- 23) Rowe R, Freedom R, Wehrizi A, Bloom K: The neonate with congenital Herat disease. Saunders Sec Ed. 1981:404-409.

ANEXO 1: Soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.4 (PBS): NaH_2PO_4 50 mM, Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 150 mM.

Solución amortiguadora de tris, pH 7.5 (TBST): Tris 10 mM, NaCl 154 mM, Tween 20 al 0.05%.

Solución de Bouin: 12 g de ácido pícrico (solución saturada) en 75 ml de agua, 25 ml de formol 40%, 5 ml de ácido acético glacial.

Solución de azul de Coomassie: Azul de Coomassie R250 0.2%, etanol 50%, ácido acético 5%.

Solución de citratos 50 mM, pH 5.0: Mezclar 3 ml de una solución de ácido cítrico 0.1 M con 7 ml de una solución de citrato de sodio 0.1 M. Ajustar el pH con las mismas soluciones.

Solución de depósito, pH 9.5: CHES 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%, 0.005 g de azul de bromofenol, beta mercaptoetanol 2%.

Solución de diálisis, pH 8.0: Tris 20 mM, NaCl 100 mM.

Solución de elución, pH 7.0: Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 500 mM, beta mercaptoetanol 1 mM (agregar antes de usar).

Solución de lavado, pH 8.0: Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 5 mM, urea 6 M, beta mercaptoetanol 10 mM (agregar antes de usar).

Solución de lisis, pH 8.0: Urea 2 M, Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Tritón X-100 al 2%.

Solución de replegamiento, pH 7.8: Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 5 mM, glicerol 1%, beta mercaptoetanol 1 mM (agregar antes de usar).

Solución de solubilización, pH 8.0: Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 5 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, beta mercaptoetanol 10 mM (agregar antes de usar).

Solución de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%.

ANEXO 2:

Especificidad de unión a carbohidratos de las lectinas utilizadas

Canavalia ensiformis (**Con A**): Se une a residuos de manosa en oligosacáridos con núcleos de tres manosas. También se une a residuos de manosa en oligosacáridos complejos biantenarios ligados a N⁽¹⁴³⁾.

Dolichos biflorus (**DBA**): Reconoce residuos terminales de α -NAcGal en carbohidratos ligados a N⁽¹⁴⁴⁾.

Ricinus communis (**RCA120 o RCA-I**): Se une a los residuos de β -Gal ligados a NAcGlc, en el contexto del disacárido Gal β 1-4NAcGlc⁽¹⁴⁵⁾.

Arachis hypogaea (**PNA**): Reconoce residuos de β -Gal en el contexto del antígeno T⁽¹⁴⁶⁾. El antígeno T es un disacárido formado por Gal β 1-3NAcGal.

Triticum vulgare (**WGA**): Reconoce residuos de ácido siálico y a la NAcGlc en secuencias de polilactosamina (Gal β 1-4NAcGlc repetidas varias veces)⁽¹²⁰⁾.

Ulex europaeus (**UEA-I**): Se une a residuos de fucosa con enlaces α 1-2, en los contextos del antígeno H tipo 2 y el antígeno de Lewis^y ⁽¹⁴⁷⁾. El antígeno H tipo 2 está conformado por la estructura: Fuc α 1-2Gal β . El antígeno de Lewis^y posee la estructura Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3) NAcGlc.

Glycine max (**SBA**): Reconoce residuos de β -NAcGal⁽¹⁴⁴⁾.

Aleuria aurantia (**AAA**): Se une a residuos de fucosa α 1-6 ligados a la NAcGlc más interna en oligosacáridos complejos ligados a N. También reconoce residuos terminales de fucosa con ligaciones α 1-2⁽¹¹⁷⁾.

Artocarpus integrifolia (**jacalina o AIA**): Reconoce al antígeno Tn⁽¹⁴⁸⁾. El antígeno Tn es una NacGal ligada al oxígeno (O) de la serina del esqueleto polipeptídico.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Shalgi R, Raz T. *The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization*. *Histol Histopathol* 1997; **12**:813-822.
2. McLeskey SB, Dowds C, Carballada R, White RR, Saling PM. *Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction*. *Int Rev Cytol* 1998; **177**:57-113.
3. Snell WJ, White JM. *The molecules of mammalian fertilization*. *Cell* 1996; **85**:629-637.
4. Sinowatz F, Plendl J, Kolle S. *Protein-carbohydrate interactions during fertilization*. *Acta Anat* 1998; **161**:196-205.
5. Brewis I, Wong C. *Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida*. *Rev Reprod* 1999; **4**:135-142.
6. Dell A, Morris H, Easton R, Patankar M, Clark G. *The glycobiology of gametes and fertilization*. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1473**:196-205.
7. Barbieri RL. Assisted reproduction. In: Yen SSC, Jaffe, R.B., Barbieri, R.L., editor. *Reproductive endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1999. pp. 594-621.
8. 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**:175-194.
9. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Neil J, editor. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994. pp. 189-317.
10. Chang MC. *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes*. *Nature* 1951; **168**:997-998.
11. Austin CR. *Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg*. *Aust. J. Sci. Res.* 1951; **B, 4**:581-596.
12. Zinaman M, Drobnis EZ, Morales P, Brazil C, Kiel M, Cross NL, Hanson FW, Overstreet JW. *The physiology of sperm recovered from the human uterine cervix: acrosomal status and response to inducers of the acrosome reaction*. *Biol Reprod* 1989; **41**:790-797.
13. Zhu JJ, Barratt CLR, Cooke ID. *Effect of human cervical mucus on human sperm motion and hyperactivation in vitro*. *Hum Reprod* 1992; **7**:1402-1406.
14. Bielfeld P, Jeyendran RS, Zanaveld LJD. *Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix*. *Int J Fertil* 1991; **36**:302-306.
15. Kervancioglu ME, Djahanbackhch O, Aitken RJ. *Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation*. *Fertil Steril* 1994; **61**:1103-1108.
16. Banerjee M, Chowdhury M. *Purification and characterization of a sperm-binding glycoprotein from human endometrium*. *Hum Reprod* 1994; **9**:1497-1504.
17. Tulsiani DR. *Carbohydrates mediate sperm-ovum adhesion and triggering of the acrosome reaction*. *Asian J Androl* 2000; **2**:87-97.

18. Ravnik SE, Albers JJ, Muller CH. *Stimulation of human sperm capacitation by purified lipid transfer protein*. J Exp Biol 1995; **272**:78-83.
19. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. *Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function*. J Cell Sci 1995; **108 (Pt 5)**:2017-2025.
20. Benoff S. *Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction*. Mol Hum Reprod 1998; **4**:453-471.
21. Gerton GL. Function of the sperm acrosome. In: Hardy DM, editor. Fertilization, 2002. pp. 265-302.
22. Kim KS, Cha MC, Gerton GL. *Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix*. Biol Reprod 2001; **64**:36-43.
23. Burgess TL, Kelly RB. *Constitutive and regulated secretion of proteins*. Ann Rev Cell Biol 1987; **3**:243-293.
24. Honda A, Siruntawineti J, Baba T. *Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions*. Hum Reprod Update 2002; **8**:405-412.
25. Suri A. *Sperm specific proteins-potential candidate molecules for fertility control*. Reprod Biol Endocrinol 2004; **2**:10.
26. Liu DY, Baker HW. *Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding*. Fertil Steril 1996; **66**:312-315.
27. Fraser LR. *Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction*. Hum Reprod 1995; **10 Suppl 1**:22-30.
28. Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC. *Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida*. J Assist Reprod Genet 2000; **17**:374-378.
29. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, van Rooyen LH. *Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF*. Hum Reprod 2001; **16**:138-144.
30. Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR. *Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization*. Fertil Steril 2003; **79**:49-55.
31. Liu DY, Stewart T, Baker HW. *Normal range and variation of the zona pellucida-induced acrosome reaction in fertile men*. Fertil Steril 2003; **80**:384-389.
32. Brewis IA, Clayton R, Barratt CL, Hornby DP, Moore HD. *Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa*. Mol Hum Reprod 1996; **2**:583-589.

33. van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ. *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 1994; **51**:607-617.
34. Dong KW, Chi TF, Juan YW, Chen CW, Lin Z, Xiang XQ, Mahony M, Gibbons WE, Oehninger S. *Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells*. Am J Obstet Gynecol 2001; **184**:835-843; discussion 843-834.
35. Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK. *Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C*. Mol Hum Reprod 2005; **11**:365-372.
36. Lee MA, Check JH, Kopf GS. *A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida*. Mol Reprod Dev 1992; **31**:78-86.
37. Tesarik J, Carreras A, Mendoza C. *Differential sensitivity of progesterone and zona pellucida-induced acrosome reactions to pertussis toxin*. Molecular Reproduction and Development 1993; **34**:183-189.
38. Franken D, Morales P, Habenicht U. *Inhibition of G protein in human sperm and its influence on acrosome reaction and zona pellucida binding*. Fertil Steril 1996; **66**:1009-1011.
39. Schuffner AA, Bastiaan HS, Duran HE, Lin ZY, Morshedi M, Franken DR, Oehninger S. *Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G(i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid*. Mol Hum Reprod 2002; **8**:722-727.
40. Bielfeld P, Faridi A, Zaneveld L, De Jonge C. *The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases*. Fertil Steril 1994; **61**:536-541.
41. Jacob A, Hurley I, Mandel FS, Hershlag A, Cooper G, Benoff S. *Human sperm non-nuclear progesterone receptor expression is a novel marker for fertilization outcome*. Mol Hum Reprod 1998; **4**:533-542.
42. Allgeyer M, Kirschenhofer N, Mann U, Brucker C. *Measurement of induced acrosome reactions in human sperm using physiologic stimuli--relevance for the prediction of fertilization outcome*. Andrologia 2006; **38**:99-105.
43. Dunbar BS, Prasad SV, Timmons TM. Comparative structure and function of mammalian zonae pellucidae. In: O'Rand M, editor. A Comparative Overview of Mammalian Fertilization. New York: Plenum Press, 1991. pp. 97-114.
44. Bleil JD, Wassarman PM. *Structure and function of the zona pellucida; identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida*. Dev Biol 1980; **76**:185-202.
45. Wassarman PM, Bleil JD, Florman HM, Greve JM, Roller RJ, Salzman GS, Samuels FG. *The mouse egg's receptor for sperm: what is it and how does it work?* Ann Rev Biochem 1985; **57**:415-422.

46. Wassarman PM. *Zona pellucida glycoproteins*. Annu Rev Biochem 1988; **57**:415-442.
47. Wassarman PM. *The Parkes Lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization*. J Reprod Fertil 1999; **116**:211-216.
48. Greve JM, Wassarman PM. *Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat*. J Mol Biol 1985; **181**:253-264.
49. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM. *The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins*. Nat Cell Biol 2002; **4**:457-461.
50. Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolski DK. *Identification of rat intestinal trefoil factor: Tissue -and cell- specific member of the trefoil protein family*. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; **88**:11017-11021.
51. Litscher ES, Qi H, Wassarman PM. *Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes*. Biochemistry 1999; **38**:12280-12287.
52. Yurewicz EC, Hibler D, Fontenot GK, Sacco AG, Harris J. *Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 alpha, a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte*. Biochim Biophys Acta 1993; **1174**:211-214.
53. Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P. *Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries*. Cell Tissue Res 2001; **303**:277-287.
54. Cariño C, Prasad SV, Skinner S, Dunbar B, Chirinos M, Schwoebel E, Larrea F, Dunbar BS. *Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries*. Reprod BioMed Online 2002; **4**:116-126.
55. Sinowatz F, Kolle S, Topfer-Petersen E. *Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals*. Cells Tissues Organs 2001; **168**:24-35.
56. Epifano O, Liang L, Familiarì M, Moos M, Dean J. *Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis*. Development 1995; **121**:1947-1956.
57. Wassarman PM, Kinloch R. *Gene expression during oogenesis in mice*. Mutat Res 1992; **296**:3-15.
58. Grootenhuys AJ, Philipsen HL, de Breet-Grijsbach JT, van Duin M. *Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3*. J Reprod Fertil Suppl 1996; **50**:43-54.
59. Kolle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G. *Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo*. Mol Reprod Dev 1998; **49**:435-443.
60. Maresh GA, Timmons T, Dunbar B. *Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins*. Biol Reprod 1990; **43**:965-976.
61. Bogner K, Hinsch K, ., Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E. *Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (Callithrix jacchus) ovary*. Mol Hum Reprod 2004; **10**:481-488.

62. Dunbar B, Liu C, Sammons D. *Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucida by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell proteins.* Biol Reprod 1981;**24**:1111-1124.
63. Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, DeMayo FJ. *Zona pellucida composition: Species crossreactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA).* Biol Reprod 1981;**25**:997-1008.
64. Shabanowitz RB, O'Rand MG. *Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs.* J Reprod Fertil 1988;**82**:151-161.
65. Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. *Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families.* DNA Seq 1994;**4**:361-393.
66. Lefievre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. *Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human.* Hum Reprod 2004;**19**:1580-1586.
67. Hughes DC, Barratt CL. *Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida?* Biochim Biophys Acta 1999;**1447**:303-306.
68. Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC, Barratt CL. *Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida.* Hum Reprod 2005;**20**:1148-1152.
69. Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, Gonzalez-Gonzalez ME, Galicia-Chavarria M, Larrea F, Gerton GL. *Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function.* Biol Reprod 2006;**74**:760-768.
70. Epifano O, Liang LF, Dean J. *Mouse Zp1 encodes a zona pellucida protein homologous to egg envelope proteins in mammals and fish.* J Biol Chem 1995;**270**:27254-27258.
71. Liang LF, Chamow SM, Dean J. *Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: developmental regulation of the zona pellucida genes.* Mol Cell Biol 1990;**10**:1507-1515.
72. Bleil J, Greve J, Wassarman P. *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 1988;**128**:376-385.
73. Lee V, Dunbar B. *Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles.* Developmental Biology 1993;**155**:371-382.
74. Taya T, Yamasaki N, Tsubamoto H, Hasegawa A, Koyama K. *Cloning of a cDNA coding for the porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 and its genomic organization.* Biochem Biophys Res Commun 1995;**207**:790-799.
75. Dunbar B, Wardrip N, Hedrick J. *Isolation, physicochemical properties and macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes.* Biochemistry 1980;**19**:356-365.

76. Tsubamoto H, Hasegawa A, Inoue M, Yamasaki N, Koyama K. *Binding of recombinant pig zona pellucida protein 1 (ZP1) to acrosome-reacted spermatozoa*. J Reprod Fertil Suppl 1996; **50**:63-67.
77. Moos J, Faundes D, Kopf G, Schultz M. *Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization*. Human Reproduction 1995; **10**:2467-2471.
78. Gupta SK, Yurewicz EC, Sacco AG, Kaul R, Jethanandani P, Govind CK. *Human zona pellucida glycoproteins: characterization using antibodies against recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3*. Mol Hum Reprod 1998; **4**:1058-1064.
79. Liang L, Dean J. *Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes*. Developmental Biology 1993; **156**:399-408.
80. Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K. *Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa*. Biol Reprod 1999; **61**:1649-1654.
81. Ringuette M, Chamberlin M, Baur A, Sobieski D, Dean J. *Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida*. Dev Biol 1988; **127**:287-295.
82. Bleil JD, Wassarman PM. *Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein*. Dev Biol 1983; **95**:317-324.
83. Kinloch R, Mortillo S, Stewart C, Wassarman PM. *Embryonal carcinoma cells transfected with ZP3 genes differentially glycosylated similar polypeptides and secrete active mouse sperm receptor*. J Cell Biol 1991; **115**:655-664.
84. Beebe S, Leyton L, Burks D, Ishikawa M, Fuerst T, Dean J, Saling P. *Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction*. Dev Biol 1992; **151**:48-54.
85. Yamasaki N, Richardson RT, O'Rand MG. *Expression of the rabbit sperm protein Sp17 in COS cells and interaction of recombinant Sp17 with the rabbit zona pellucida*. Mol Reprod Dev 1995; **40**:48-55.
86. Yurewicz EC, Pack BA, Armant DR, Sacco AG. *Porcine zona pellucida ZP3 alpha glycoprotein mediates binding of the biotin-labeled M(r) 55,000 family (ZP3) to boar sperm membrane vesicles*. Mol Reprod Dev 1993; **36**:382-389.
87. Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. *Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles*. J Biol Chem 1998; **273**:7488-7494.
88. Chamberlin ME, Dean J. *Human homolog of the mouse sperm receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; **87**:6014-6018.
89. Chapman N, Kessopoulou E, Andrews P, Hornby D, Barratt CR. *The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro*. Biochem J 1998; **330 (Pt 2)**:839-845.

90. Schwoebel E, Prasad S, Timmons T, Cook R, Kimura H, Niu E, Cheung P, Skinner S, Avery S, Wilkins B, Dunbar B. *Isolation and characterization of a full-length cDNA encoding the 55-kDa rabbit zona pellucida protein.* J Biol Chem 1991; **226**:7214-7219.
91. Prasad SV, Wilkins B, Skinner SM, Dunbar BS. *Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system.* Mol Reprod Dev 1996; **43**:519-529.
92. Yurewicz EC, Sacco AG, Subramanian AG. *Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida.* J Biol Chem 1987; **262**:564-571.
93. Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, Matzat PD. *Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with the alpha glycoprotein component of the Mr= 55,000 family.* Biol Reprod 1989; **41**:523-532.
94. Nelson DL, Cox, M.M. Lehninger Principles of biochemistry. Nueva York: Freeman and company, 2005.
95. Loeser CR, Lynch C, 2nd, Tulsiani DR. *Characterization of the pharmacological-sensitivity profile of neoglycoprotein-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa.* Biol Reprod 1999; **61**:629-634.
96. Miranda PV, Gonzalez-Echeverria F, Marin-Briggiler CI, Brandelli A, Blaquier JA, Tezon JG. *Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro.* Mol Hum Reprod 1997; **3**:399-404.
97. Ozgur K, Patankar MS, Oehninger S, Clark GF. *Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding.* Mol Hum Reprod 1998; **4**:318-324.
98. Maymon B, Maymon R, Ben-Nun I, Ghetler Y, Shalgi R, Skutelsky E. *Distribution of carbohydrates in the zona pellucida of human oocytes.* J Reprod Fertil 1994; **102**:81-86.
99. Jimenez-Movilla M, Aviles M, Gomez-Torres MJ, Fernandez-Colom PJ, Castells MT, de Juan J, Romeu A, Ballesta J. *Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry.* Hum Reprod 2004; **19**:1842-1855.
100. Loeser CR, Tulsiani DR. *The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa.* Biol Reprod 1999; **60**:94-101.
101. Leyton L, Saling P. *Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction.* J Cell Biol 1989; **108**:2163-2168.
102. Shur BD. *Is sperm galactosyltransferase a signaling subunit of a multimeric gamete receptor?* Biochem Biophys Res Commun 1998; **250**:537-543.
103. Talbot P, Shur BD, Myles DG. *Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion.* Biol Reprod 2003; **68**:1-9.
104. Martic M, Moses EK, Adams TE, Liu de Y, Gook DA, Garrett C, Dunlop ME, Baker GH. *Recombinant human zona pellucida proteins ZP1, ZP2 and ZP3 co-expressed in a human cell line.* Asian J Androl 2004; **6**:3-13.
105. Summers M, Smith G. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. In. EUA: Texas A&M University, 1987.

106. Prasad SV, Mujtaba S, Lee VH, Dunbar BS. *Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system*. Biol Reprod 1995; **52**:1167-1178.
107. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 1970; **227**:680-685.
108. Timmons TM, Dunbar BS. *Protein blotting and immunodetection*. Method Enzymol 1990; **182**:679-688.
109. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, U.K. ; New York, NY: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, 1999.
110. Gamzu R, Yavetz H, Lichtenberg D, Paz G, Homonnai Z, Yogev L. *The effect of egg yolk on the binding capacity of human spermatozoa to zona pellucida*. Fertil Steril 1994; **62**:1221-1225.
111. Kohn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJ. *Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy*. Hum Reprod 1997; **12**:714-721.
112. Cross NL, Overstreet JW. *Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro*. Gamete Res 1987; **16**:23-35.
113. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, Van Rooyen LH. *Clinical importance of a micro-assay for the evaluation of sperm acrosome reaction using homologous zona pellucida*. Andrologia 2001; **33**:87-93.
114. Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. Nueva York: Oxford University Press, Inc., 1994.
115. Gahlay GK, Gupta SK. *Glycosylation of zona pellucida glycoprotein-3 is required for inducing acrosomal exocytosis in the bonnet monkey*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2003; **49**:389-397.
116. Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K. *Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid*. Histochemistry 1984; **80**:575-579.
117. Yamashita K, Kochibe N, Ohkura T, Ueda I, Kobata A. *Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia lectin*. J Biol Chem 1985; **260**:4688-4693.
118. Easton RL, Patankar MS, Lattanzio FA, Leaven TH, Morris HR, Clark GF, Dell A. *Structural analysis of murine zona pellucida glycans. Evidence for the expression of core 2-type O-glycans and the Sd(a) antigen*. J Biol Chem 2000; **275**:7731-7742.
119. Nakano M, Yonezawa N. *Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins*. Cells Tissues Organs 2001; **168**:65-75.
120. Gallagher JT, Morris A, Dexter TM. *Identification of two binding sites for wheat-germ agglutinin on polylectosamine-type oligosaccharides*. Biochem J 1985; **231**:115-122.

121. Wassarman PM. *Sperm receptors and fertilization in mammals*. Mt Sinai J Med 2002; **69**:148-155.
122. Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. *Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis*. Development 2007; **134**:933-943.
123. Yamashita M, Yamagata K, Tsumura K, Nakanishi T, Baba T. *Acrosome Reaction of Mouse Epididymal Sperm on Oocyte Zona Pellucida*. J Reprod Dev 2006.
124. Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J. *Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding*. Development 1998; **125**:2415-2424.
125. Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. *Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs*. Dev Cell 2003; **5**:33-43.
126. Benoff S. *Carbohydrates and fertilization: an overview*. Mol Hum Reprod 1997; **3**:599-637.
127. Mori K, Daitoh T, Irahara M, Kamada M, Aono T. *Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization*. Am J Obstet Gynecol 1989; **161**:207-211.
128. Benoff S, Hurley IR, Mandel FS, Cooper GW, Hershlag A. *Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands*. Mol Hum Reprod 1997; **3**:827-837.
129. Brandelli A, Miranda PV, Tezon JG. *Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase*. Biochim Biophys Acta 1994; **1220**:299-304.
130. Benoff S, Hurley I, Cooper GW, Mandel FS, Rosenfeld DL, Hershlag A. *Head-specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss*. Hum Reprod 1993; **8**:2141-2154.
131. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. *Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients*. Fertil Steril 1991; **56**:113-118.
132. Tesarik J, Mendoza C, Ramirez JP, Moos J. *Solubilized human zona pellucida competes with a fucosylated neoglycoprotein for binding sites on the human sperm surface*. Fertil Steril 1993; **60**:344-350.
133. Springer GF. *T and Tn, general carcinoma autoantigens*. Science 1984; **224**:1198-1206.
134. Cao Y, Karsten UR, Liebrich W, Haensch W, Springer GF, Schlag PM. *Expression of Thomsen-Friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation*. Cancer 1995; **76**:1700-1708.
135. Goluboff ET, Mertz JR, Tres LL, Kierszenbaum AL. *Galactosyl receptor in human testis and sperm is antigenically related to the minor C-type (Ca²⁺)-dependent lectin variant of human and rat liver*. Mol Reprod Dev 1995; **40**:460-466.

136. Rivkin E, Tres LL, Kaplan-Kraicer R, Shalgi R, Kierszenbaum AL. Molecular cloning of rat sperm galactosyl receptor, a C-type lectin with in vitro egg binding activity. *Mol Reprod Dev* 2000;56:401-411.
137. Florman HM, Wassarman PM. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* 1985;41:313-324.
138. Nakano M, Yonezawa N, Hatanaka Y, Noguchi S. Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl* 1996;50:25-34.
139. Yonezawa N, Fukui N, Kudo K, Nakano M. Localization of neutral N-linked carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoprotein ZPC. *Eur J Biochem* 1999;260:57-63.
140. Verhage HG, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Schmidt A, Arias EB, Donnelly KM, Boomsma RA, Thibodeaux JK, Fazleabas AT, Jaffe RC. Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in the fertilization process. *Biol Reprod* 1998;58:1098-1101.
141. Malette B, Paquette Y, Merlen Y, Bleau G. Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 1995;41:384-397.
142. Rosado-García A. Introducción a la glicobiología. México: Universidad Autónoma Metropolitana, 2000.
143. Bhattacharyya L, Ceccarini C, Lorenzoni P, Brewer CF. Concanavalin A interactions with asparagine-linked glycopeptides. Bivalency of high mannose and bisected hybrid type glycopeptides. *J Biol Chem* 1987;262:1288-1293.
144. Schmidt-Arras DE, Bohmer A, Markova B, Choudhary C, Serve H, Bohmer FD. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 2005;25:3690-3703.
145. Baenziger JU, Fiete D. Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J Biol Chem* 1979;254:9795-9799.
146. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 1975;250:8518-8523.
147. Baldus SE, Thiele J, Park YO, Hanisch FG, Bara J, Fischer R. Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla* agglutinin (AAA) in comparison to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I). *Glycoconj J* 1996;13:585-590.
148. Wu AM, Wu JH, Lin LH, Lin SH, Liu JH. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). *Life Sci* 2003;72:2285-2302.

9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA DURANTE ESTE TRABAJO DE TESIS

- Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, **Gonzalez-Gonzalez ME**, Galicia-Chavarria M, Larrea F, Gerton GL. *Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function*. Biol Reprod 2006; **74**:760-768.