

Andrología

Utilidad de las lectinas en el estudio de espermatozoides

Utility of lectins in sperm cells

Montoya Ureta, A¹, Ten Morro, J¹, Mendiola Olivares J¹, Guerrero Villena, J¹, Bernabeu Pérez, R².

¹Dpto. Biología de la Reproducción. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante.

²Dpto. Medicina Reproductiva. Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante y Cátedra de Medicina Reproductiva, Universidad Miguel Hernández, Elche (Alicante).

Resumen

El proceso de fecundación puede definirse como una secuencia de acontecimientos moleculares coordinados que consiste en la penetración y fusión de un espermatozoide con un ovocito, y finaliza con la primera división normal del cigoto. Aunque hace ya mucho tiempo que se describió al espermatozoide como el agente fecundante, los conocimientos acerca de los receptores que intervienen en el reconocimiento especie-específico entre ambos gametos aún no se conocen con claridad. Las lectinas son unas moléculas que gracias a su exquisita selectividad para unirse a determinadas secuencias oligosacáridicas pueden ser de gran utilidad para darnos una mayor información acerca de los receptores espermáticos que intervienen en la fecundación. Los estudios que se han hecho hasta ahora con lectinas, tanto en animales como en humanos, han permitido observar que hay una reestructuración de glucoproteínas desde la espermatogénesis hasta el momento de la fecundación, así como también, han permitido identificar determinadas secuencias oligosacáridicas que juegan un importante papel en dicho proceso. Del mismo modo se han utilizado para evaluar el estado del acrosoma y estudiar el estado funcional de la población espermática. El uso de las lectinas en futuros estudios nos va a facilitar una mayor comprensión acerca de la fisiología de la interacción entre espermatozoide y ovocito, y a su vez, nos va a permitir elaborar nuevos ensayos diagnósticos y aportar nuevas soluciones en el tratamiento de la infertilidad masculina.

Palabras clave: Lectina. Glucoproteína.

Summary

Fertilization can be defined as a highly coordinated molecular sequence that consist in the penetration and fusion of an sperm cell and and egg, and ended with the first normal division of the zygote. Although there have been a long time since sperm was identified as the fertilizing agent, our understanding about the receptors involved in the species-specific recognition between both gametes is limi-

Correspondencia: Dr. Jorge Ten
Avda. Albufereta, 31
03016 Alicante
e-mail: jten@institutobernabeu.com

ted. Lectins are molecules that have an exquisite selectivity to bind definite oligosaccharidic sequences so they can be of great utility in giving us more information about the sperm receptors involved in fertilization. Studies with lectins that have been done up to now, both animals and humans, have allowed us to observe that there is a glycoprotein restructuring from spermatogenesis to fertilization, as well as have let us identify definite oligosaccharidic sequences that play an important role in the above mentioned process. In the same way they have been used to evaluate the acrosomal status and to study the functional status of the sperm population. The use of lectins in further studies is going to make us the understanding of the interaction between sperm and egg physiology easier, and at the same time, they will allow us to develop new diagnostic assays and to contribute with new solutions to the treatment of male infertility.

Key words: Lectin. Glycoprotein.

INTRODUCCIÓN

La fecundación es un proceso altamente especializado que implica una secuencia coordinada de interacciones celulares entre los gametos masculino y femenino con el fin de formar un cigoto diploide y dar lugar a un nuevo individuo (1). Aunque hace ya aproximadamente 200 años desde que se identificó al espermatozoide como el agente fecundante del semen, nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la fecundación es limitado. El primer paso en el proceso de fecundación es el reconocimiento especie-específico entre el espermatozoide y el ovocito. Los receptores de ambos gametos implicados en esta interacción aun no han sido claramente identificados (2).

Las células germinales masculinas sufren procesos de división, diferenciación y maduración intratesticular dependientes de las células de Sertoli. Una vez han sido liberados a la luz del túbulo seminífero pasan por la rete testis al epidídimo donde sufrirán una serie de cambios conocidos como maduración espermática. Durante su tránsito por el epidídimo, el espermatozoide sufre una glicosilación activa de lípidos y proteínas de la membrana plasmática, llevada a cabo por galactosiltransferasas y sialiltransferasas presentes en el fluido epididimario. También tiene lugar una pérdida y ganancia de nuevas glucoproteínas segregadas en el epitelio del epidídimo que dotan al espermatozoide de capacidad fecundante y confieren estabilidad a su membrana plasmática, previniendo una prematura capacitación o reacción acrosómica (3). Algunas de las proteínas adquiridas se sospecha que son factores descapacitantes (4). La maduración la completan en el resto del tránsito a medida que interactúan con las secreciones de las vesículas seminales y de la próstata.

Una vez los espermatozoides se encuentran en el tracto genital femenino, sufren un proceso denomina-

do capacitación que se define como una serie de cambios complejos a nivel estructural y funcional, que ha de sufrir el espermatozoide para estar en condiciones de fecundar al ovocito. Entre estos cambios se encuentran la pérdida de factores descapacitantes, el aumento de la concentración de calcio intracelular, la adquisición de hipermotilidad, la modificación de la superficie del espermatozoide facilitada por la ultraestructura del moco cervical y sus enzimas y la pérdida de colesterol por parte de la membrana del espermatozoide (5). Los factores descapacitantes suelen actuar como anclajes para determinadas glucoproteínas, por lo que su pérdida supone una mayor libertad de movimiento por parte de dichas glucoproteínas. Lo mismo ocurre con la disminución del colesterol presente en la membrana, gran parte del cual se queda en el moco cervical. Al disminuir el contenido de éste, aumenta la proporción de fosfolípidos aniónicos, lo que dota de una mayor fluidez a la membrana plasmática y facilita la redistribución de las glucoproteínas, adquiriendo la conformación de 'llave' que es la que va a interactuar con la zona pelúcida (ZP) durante el reconocimiento especie específico entre el gameto masculino y femenino y que por tanto va a permitir que tengan lugar las posteriores etapas de la interacción entre espermatozoide y ovocito, como son la reacción acrosómica, la penetración de la zona pelúcida y la unión y posterior fusión de las membranas de ambos gametos (6). Es aquí donde las lectinas cobran importancia ya que son las moléculas que nos van a permitir identificar y estudiar la redistribución de las glucoproteínas de la membrana espermática desde la espermatogénesis hasta la fecundación.

LECTINAS

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune capaces de aglutinar células y de enla-

zarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Por tanto, van a ser capaces de reconocer de forma selectiva determinadas secuencias oligosacáridicas que forman parte de las glucoproteínas de la membrana de los espermatozoides y que, potencialmente, van a intervenir en el reconocimiento primario del ovocito.

Estas proteínas, privadas de actividad enzimática, contienen al menos dos sitios de unión, de ahí que puedan enlazarse en primer lugar a un azúcar específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada. Su exquisita selectividad las convierte en valiosas herramientas bioquímicas (7, 8).

Localización

Se encuentran presentes en toda la escala evolutiva (animales, plantas, hongos, microorganismos y virus), lo cual refleja su participación decisiva en actividades celulares muy diversas.

En el Reino Animal se encuentran contenidas en la hemolinfa, membranas celulares y órganos sexuales. Intervienen en numerosos procesos intra e intercelulares, tanto fisiológicos como patológicos. Ejemplos de los primeros son el reconocimiento entre el espermatozoide y el óvulo durante la fecundación, adhesión entre células y célula-matriz extracelular en la embriogénesis y el desarrollo, diferenciación y proliferación celular. También intervienen en la inflamación, transformación maligna y metástasis.

En el Reino Vegetal se localizan en cotiledones y endospermos de las semillas. No se conoce con exactitud la función biológica de las lectinas vegetales, no obstante, la presencia de lectinas en raíces asociadas a lugares de nodulación de bacterias fijadoras de nitrógeno, sugiere una función simbiótica. También existen indicios de la toxicidad de algunas lectinas para determinados insectos fitófagos (8).

En cuanto a los microorganismos, se encuentran contenidas en la membrana y en el citosol y sus funciones básicas son las de unión de bacterias, virus y toxinas a la superficie celular. Numerosos agentes patógenos se sirven de lectinas de unión a glicanos para el anclaje a la superficie celular que precede a la infección.

Estructura

Están compuestas por una cadena polipeptídica a la que pueden estar unidos uno o más residuos oligosacáridicos entre los cuáles suelen estar los siguientes: D- manosa, D-galactosa, L-fucosa, N-acetil-D-glu-

cosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido siálico, glucosamina y galactosamina.

Aplicaciones

Las lectinas se consideran armas valiosas en el campo de la Genética, la Biomedicina y la Inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales. Se utilizan principalmente para:

– Tipificación de grupos sanguíneos; la mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, actuando a la misma dilución y por tanto no son específicas de grupo. Las específicas aglutinan eritrocitos humanos preferentemente de un determinado grupo sanguíneo. Esta especificidad permite usar a las lectinas como reactivo de tipificación de grupos sanguíneos (9).

– Estudio de la estructura de las membranas; las lectinas se utilizan como marcadores para emplearlos en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática. Generalmente se utilizan lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes, como la biotina (7). También se utilizan para la purificación de polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos.

– Detección de transformaciones malignas; a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas (7). Un ejemplo de esta actividad es la lectina de la leguminosa *Vicia villosa* y de la labiada *Salvia sclarea*. Estas lectinas reconocen selectivamente a un antígeno que se esconde en la estructura de la membrana plasmática de células humanas normales, pero que se encuentra expuesto en la superficie celular del noventa por ciento de los carcinomas humanos. La elevada especificidad por este marcador de carcinomas hace que las lectinas en cuestión sean herramientas bioquímicas útiles para la detección precoz de tumores humanos (8).

– Medicamentos para prevenir metástasis; las propiedades citotóxicas de algunas lectinas como la Ricina y la Abrina podrían ser de utilidad como armas terapéuticas en el tratamiento del cáncer humano (7).

– Estudio y mayor comprensión de la fisiologías de la interacción entre espermatozoide y ovocito.

En general, gracias a su exquisita selectividad, las lectinas son las encargadas de descifrar los códigos relativos a los glúcidos, lo cual, si atendemos al enorme potencial codificador de información de las estructuras de los glicanos, superior al de proteínas, áci-

dos nucleicos y otra moléculas, les hace cobrar una gran importancia (1). Este potencial tiene su explicación en la posibilidad que tienen las unidades estructurales de los carbohidratos de engarzarse entre si en varios puntos y de varias formas, si tenemos en cuenta la isomería α/β . Los aminoácidos de las proteínas y los nucleótidos de los ácidos nucleicos se limitan, en cambio, a generar estructuras lineales, lo que restrin-

– También permiten evaluar el estado del acrosoma de una población espermática y ver el porcentaje de espermatozoides que sufren una reacción acrosómica prematura (23-25).

– Finalmente, pueden ser utilizadas como marcadores para evaluar la morfología espermática (26).

Las principales lectinas utilizadas en estudios de reproducción asistida son las siguientes: Tabla 1.

Tabla 1

Las principales lectinas utilizadas en estudios de reproducción asistida

Lectina	Localización	Secuencia oligosacáridica reconocida
Con A	Cannavalia enzyformis	α -D-glucosa y α -D-manosa
WGA	Tri ricum vulgari s	N-acetilglucosamina y ác. siálico
PNA	Ara chis hypogaea	β -galactosa
SBA	Soja	N-acetil-D-galactosamina
DBA	Dolichos biflorus	Metil-2-acetamina-2-desoxi-D-galactosa
PSA	Pisum sativum	Residuos de manosa
AAA	Anguilla anguilla	Restos de fucosa
LEA	Licopersicum esculentum	N-acetil-lactosamina
TPA	Tetragonolobus purpureus	Residuos de fucosa
UEA-1	Ulex Europaeus	Antígeno fucosilado H

ge su diversidad. La capacidad de crear un repertorio amplio de isómeros a partir de unos pocos azúcares sencillos es la que convierte a los polisacáridos en las moléculas de reconocimiento por excelencia (8).

Aplicaciones en el campo de la reproducción asistida

Las lectinas pueden emplearse en los siguientes casos:

– Para estudiar la redistribución que sufren las glucoproteínas de la membrana plasmática del espermatozoide, gracias a su capacidad de unirse selectivamente a determinadas secuencias oligosacáridicas (10). Esta propiedad ha permitido observar los cambios que sufre la superficie de la membrana espermática durante la maduración epididimaria en los espermatozoides de diversos mamíferos incluyendo el cordero (11), la rata (12, 13), el conejo (14, 15), el mono (16), el cerdo (17), el perro (3) y el ratón (18). También ha revelado cambios durante la capacitación en el mono (16), en el ratón (19), en el cerdo (20) y en humanos (21).

– Su patrón representativo de marcaje puede ser útil a la hora de estudiar el estado funcional de la población espermática y de predecir su valor fecundante (22).

Estudios en animales

En 1996 *Navaneetham D. y colaboradores* realizaron un estudio en el que utilizaron tres lectinas (Con A, PNA y WGA) para marcar espermatozoides de mono procedentes del epidídimo, de eyaculado y tras capacitación. Como resultado observaron diversos cambios en la distribución de las glucoproteínas (GP) de la superficie espermática durante la maduración espermática y la capacitación (16).

Un año más tarde, *Nishikimi y colaboradores* utilizaron la lectina Con A para evaluar el estado funcional del acrosoma en espermatozoides de vacunos, ya que dicha lectina presenta distintos patrones de marcaje en espermatozoides que han sufrido la reacción acrosómica (RA) y en los que no (25).

En 2002 *Kawakami y colaboradores* realizaron un estudio en el que utilizaron 6 lectinas diferentes (Con A, DBA, PNA, PSA, SBA, y WGA) para marcar la superficie de los espermatozoides de distintas partes del epidídimo de perros y de esta forma observar si existían diferencias en los patrones de marcaje durante el tránsito por el epidídimo. Observaron que los espermatozoides procedentes de testículo presentaban fluorescencia para las lectinas DBA, PNA, PSA y

WGA, pero no para Con A y SBA. Por lo tanto, la superficie de los espermatozoides de testículo de perro se encuentra cubierta por una GP compuesta por metil-2-acetamida-2-deoxi-D-galactosa, que es el sacárido al que se une la lectina DBA y el cual no está presente en la superficie de espermatozoides de testículo humano, los cuáles no presentan fluorescencia para DBA aunque sí para SBA (26). Los espermatozoides procedentes de la cabeza del epidídimo presentaban fluorescencia para todas las lectinas estudiadas menos para Con A y los procedentes del cuerpo del epidídimo presentaban fluorescencia para todos las lectinas. Esto indicaba que, durante el tránsito por el epidídimo, glucoproteínas compuestas por N-acetyl-D-galactosamina, que es el sacárido al que se une la lectina SBA, y por α -manosa, que es el sacárido al que se une la lectina Con A, eran secretadas por el epitelio de la cabeza del epidídimo y del cuerpo del epidídimo, respectivamente, y cubrían la superficie del espermatozoide.

En cuanto a la cola del epidídimo, observaron que los espermatozoides procedentes de este segmento no presentaban fluorescencia para las lectinas DBA ni SBA, lo que parecía indicar que se trataba de factores descapacitantes que eran eliminados por enzimas presentes en el fluido epididimario, durante el tránsito entre el cuerpo y la cola del epidídimo, lo cual dotaba al espermatozoide de un movimiento activo y de capacidad fecundante. Esta hipótesis fue corroborada cuando se observó que espermatozoides lavados procedentes del cuerpo del epidídimo tampoco presentaban fluorescencia para DBA ni SBA.

La capacidad fecundante medida para espermatozoides del cuerpo y de la cola del epidídimo mostraba valores mayores de fertilidad en espermatozoides de la cola del epidídimo que en espermatozoides procedentes del cuerpo.

Estas observaciones confirmaban que durante el tránsito por el epidídimo existe una activa adición y eliminación de glucoproteínas en la membrana del espermatozoide encaminada hacia la maduración y la adquisición de capacidad fecundante (3).

En la rata (28) y en el cerdo (29, 30) también se ha observado una disminución en el contenido de glucoproteínas, a lo largo del tránsito por el epidídimo, asociada con la maduración espermática.

Jiménez I. y colaboradores realizaron, en el año 2003, un estudio con espermatozoides de cerdo en el que utilizaron tres lectinas (WGA, Con A y UEA) para observar si existían distintos patrones de marcaje en espermatozoides eyaculados, capacitados y tras sufrir la RA. En espermatozoides eyaculados se observó fluorescencia para WGA tanto en la cabeza como en

la cola, pero ésta descendía en espermatozoides capacitados y lo hacía aun más en aquellos que habían sufrido la RA. La Con A se unía homogéneamente a la muestra de espermatozoides en fresco tanto en la cabeza como en la pieza intermedia, y la fluorescencia se incrementaba en espermatozoides capacitados, principalmente en la región intermedia. En espermatozoides que habían sufrido la RA, la fluorescencia se concentraba en el borde de la región acrosomal. En cuanto a la lectina UEA, no mostró variaciones significativas en ninguna de las tres muestras (20).

Estas observaciones seguían confirmando que existía, esta vez en cerdos, una reorganización de las GP de la membrana del espermatozoide necesaria para que la fecundación in vivo se lleve a cabo.

Estos resultados también pueden ser útiles como indicadores de la capacidad fecundante del esperma de cerdos, lo cual puede resultar de muy valiosa utilidad en granjas. Así lo indica el mismo grupo de investigación en otro estudio en el que utilizando las mismas lectinas y midiendo los mismos parámetros en cerdos fértiles y subfértiles, observaron que la fluorescencia emitida por el complejo FITC-WGA era sensiblemente menor en espermatozoides en fresco, capacitados y tras la reacción acrosómica de cerdos subfértiles que de aquellos que tenían una fertilidad probada. La lectina UEA aumentaba su unión a la superficie espermática sólo en espermatozoides capacitados de cerdos subfértiles. Por el contrario la lectina Con A no mostraba diferencias significativas entre fértiles y subfértiles (31).

En 2004, de nuevo *Kawakami y colaboradores* utilizaron 7 lectinas diferentes (Con A, DBA, GS-1, PHA-E, PSA, UEA-1, WGA) para observar posibles cambios en el patrón de marcaje en espermatozoides de la cola del epidídimo, eyaculado y capacitado en perros. Los resultados arrojaron a la luz que la única lectina que marcaba los espermatozoides procedentes de eyaculado, pero no los de la cola del epidídimo era la PHA-E. Sin embargo la fluorescencia de esta lectina tras la capacitación descendía considerablemente. Los autores concluyeron que el monosacárido N-acetyl galactosamina, que es al que se une específicamente la lectina PHA-E, era un factor descapacitante secretado por la próstata y cuya pérdida causaba un influjo en calcio al interior del citoplasma del espermatozoide, induciendo de esta forma el proceso de la capacitación (32).

También en 2004 *Sarah S. Baker y colaboradores* realizaron un estudio en el que utilizaron 8 lectinas diferentes (LEA, PSA, PNA, AAA, UEA-1, WGA, STA y TPA) con el objeto de identificar cambios en la localización de GP en espermatozoides de ratón

como consecuencia de la capacitación. De las ocho lectinas estudiadas, siete mostraron diferentes patrones de marcaje en la superficie de la cabeza espermática tras sufrir la capacitación. Estas diferencias en los patrones de marcaje entre espermatozoides capacitados y no capacitados mostraba la existencia de una redistribución de GP en la membrana de espermatozoides de ratón como consecuencia de la capacitación (19). Dicha redistribución es vital para que el espermatozoide pueda interactuar correctamente con la zona pelúcida del ovocito y, por lo tanto, para que el proceso de la fecundación se lleve a cabo de una forma exitosa.

Estudios en humanos

En 1993 *Benoff S. y colaboradores*, observaron que espermatozoides en fresco procedentes de eyaculado no presentaban receptores de manosa. Sin embargo éstos sí se encontraban presentes en la superficie espermática tras la capacitación, lo que parecía demostrar que en espermatozoides no capacitados estos receptores se encuentran internalizados en la membrana del espermatozoide y sin posibilidad de ser expuestos al exterior debido a que el elevado nivel de colesterol en la membrana impide su movimiento. En cambio, tras la capacitación, al incrementarse el cociente fosfolípidos aniónicos/colesterol los receptores de manosa gozan de mayor libertad para redistribuirse y orientarse hacia el exterior de la membrana, quedando así expuestos para el reconocimiento inicial de la ZP (33-35).

Del mismo modo, *Lassalle y Testart*, un año más tarde, observaron que durante la maduración en el epidídimo y la capacitación de espermatozoides humanos, el marcaje en la cabeza del espermatozoide con la lectina con A disminuía, a la vez que aumentaba el marcaje con WGA. Estos cambios estaban relacionados con la adquisición de la habilidad para unirse a la ZP (36).

Otros de los estudios realizados han ido encaminados a demostrar que la unión de lectinas a espermatozoides humanos se encuentra alterada en pacientes infértiles (37, 38). Por ejemplo, se ha comprobado que la baja expresión de receptores para WGA supone una causa de infertilidad masculina (39, 40), por lo que los receptores de WGA (N-acetilglucosamina y/o ácido siálico) deben jugar un importante papel en el proceso de fecundación. Así mismo, también se ha comprobado que el aumento del grado de teratozoospermia es proporcional a la disminución del marcaje con WGA (41).

Este último grupo de investigación realizó, en la década de los noventa, dos estudios utilizando lecti-

nas. En el primero de ellos, realizado en 1995, se pretendía determinar el significado clínico de los distintos patrones de marcaje observados en espermatozoides humanos al ser incubados con la lectina WGA. Asociaron el estudio a un programa de fecundación *in vitro* de forma que los porcentajes de fecundación eran expresados como el porcentaje de ovocitos en MII que eran fecundados con éxito. Observaron que los espermatozoides humanos capacitados *in vitro* para su uso en un programa de FIV mostraban distintos patrones de marcaje con la lectina WGA correlacionados con las tasas de fecundación. Las muestras en las que el marcaje de la región acrosomal con la lectina WGA era menor al 35% se correspondía con tasas de fecundación inferiores al 50%, mientras que aquellas muestras en las que la región acrosomal era marcada en un porcentaje mayor al 35% se correlacionaba con tasas de fecundación iguales o mayores al 50% (22). De esta forma mostraron el posible valor diagnóstico del uso de ensayos con WGA, asociados a programas de FIV, para evaluar la capacidad fecundante de la muestra seminal.

En 1997 realizaron un nuevo estudio, en el que observaron la unión de espermatozoides humanos a microgotas de agarosa cubiertas con lectinas (simulando de esta forma la unión entre espermatozoide y zona pelúcida). Observaron que el único ensayo que presentaba valores predictivos, al compararlos con las tasas de fecundación, era la unión de espermatozoides a microgotas de agarosa cubiertas de la lectina WGA, lo cual indicaba, de nuevo, que los residuos sacarídicos N-acetil-D-glucosamina y ác. siálico estaban presentes en la unión entre espermatozoide y zona pelúcida y daba pie a la creación de un nuevo ensayo diagnóstico que evaluase la capacidad de los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida del ovocito (42).

También se han realizado estudios para evaluar el estado del acrosoma en espermatozoides humanos. *Mortimer D. y colaboradores* utilizaron la lectina PNA (conjugada con un fluorocromo) combinada con un test de vitalidad (Hoechst 33258) para estudiar el estado acrosomal conjuntamente con la viabilidad de espermatozoides humanos. Los distintos patrones de marcaje de la lectina PNA mostraban el estado de la membrana acrosomal y el test de vitalidad indicaba si se trataba de una RA prematura (espermatozoide vivo) o si bien se podía deber a un deterioro en la estructura de las membranas (espermatozoide muerto) (43).

La integridad de la función acrosomal parece ser de vital importancia para la fecundación, ya que los espermatozoides que carecen de él son incapaces de dar lugar a fecundación, y además se ha descrito que

un elevado porcentaje de acrosomas morfológicamente anormales está relacionado con fallos en FIV (44).

Una RA prematura y la incapacidad del espermatozoide para llevar a cabo la RA ante estímulos apropiados se pueden encontrar asociados con infertilidad masculina de origen idiopático (45). Por lo tanto, la importancia de los estudios en este campo radica en la cantidad de aspectos relevantes que pueden ser examinados estudiando la membrana acrosomal y la reacción acrosómica, tales como la capacidad fecundante de los espermatozoides, la explicación para determinados casos de infertilidad masculina de origen idiopático y la posibilidad de desarrollar anticonceptivos masculinos basados en anticuerpos que reconozcan específicamente determinadas GP de la membrana acrosomal externa interfiriendo así en la reacción acrosómica (47).

Las lectinas también se han utilizado para elaborar un mapa de sus sitios de unión en células espermatogénicas de testículo humano y en espermatozoides humanos, lo que ha permitido observar que la distribución de los gliconjugados de las células espermatogénicas varía durante la diferenciación y maduración espermáticas (47). También se han realizado estudios encaminados a elaborar un mapa completo de la distribución de los oligosacáridos que forman parte de las glucoproteínas en testículos humanos de adultos (48) y de recién nacidos (49). La única diferencia que se observó fue que el marcaje de las células de Leydig con SBA y de las espermatogonias con DBA era indicativo de que pertenecían a un recién nacido ya que este patrón de marcaje no se observa en adultos. Las células de Sertoli mostraron el mismo patrón de marcaje tanto en adultos como en recién nacidos, lo que indicaba que ambos mostraban los mismos residuos oligosacáridicos.

Otro de los estudios en los que se utilizaron las lectinas para visualizar cambios en los residuos oligosacáridicos presentes en los testículos fue el que, en 2004, realizaron Gheri G. y colaboradores, en el cual utilizaron siete lectinas para observar las diferencias que existían entre los testículos descendidos y los no descendidos en un varón prepuberal de ocho años. Se observó que residuos de D-galactosa-N-acetil-D-galactosamina y α -L-fucosa presentes en el citoplasma de las células de Sertoli de testículos descendidos, no estaban presentes en testículos no descendidos. Las células de Leydig de testículos descendidos presentaban residuos de N-acetil-D-glucosamina, ausentes en las células de Leydig de testículos criptorquídicos. También se observaron diferencias en la composición de azúcares de la lámina propia de los túbulos seminíferos (50).

Existen además una serie de estudios experimentales, aun no publicados, en los que se está trabajando con muestras espermáticas humanas de pacientes normo, asteno y teratozoospermicos. Estos estudios van encaminados a comprobar si existen diferencias en el patrón de GP de las distintas muestras antes y después de ser capacitadas *in vitro* y una vez se obtengan los resultados se compararán con las muestras normozoospermicas para observar posibles divergencias. Para ello se fijan las muestras y son sometidas a técnicas de inmunocitoquímica indirecta mediante la cual se marcan con las correspondientes lectinas. Hasta ahora se han observado cambios en el patrón de marcaje de lectinas entre las muestras en fresco y tras capacitado de cada una de las poblaciones. Todo apunta a que se podrán observar diferencias entre el glicocáliz que presentan los espermatozoides de pacientes normozoospermicos y el que presentan aquellos con algún parámetro seminal alterado y de esta forma evaluar si dichos pacientes presentan asociadas alteraciones en los patrones de distribución de glicoproteínas de la membrana espermática que pudiesen afectar a la interacción entre espermatozoide y ovocito.

CONCLUSIONES

La estructura conservada y la composición simple de la zona pelúcida de mamíferos ha facilitado la identificación de los componentes superficiales que interaccionan con el espermatozoide. Por el contrario, se ha confirmado que los receptores espermáticos para la zona pelúcida no se han conservado a lo largo de la evolución, y dicha variación ha conllevado a la especiación (51). La complejidad de los patrones de expresión de las proteínas en la superficie de la membrana espermática (52), la especificidad con la que las proteínas espermáticas se expresan en determinadas regiones (53) y las dificultades a la hora de aislar fragmentos de la membrana plasmática libres de contaminación citoplasmática hacen que la identificación de las proteínas espermáticas que interactúan con la ZP sea una tarea muy complicada.

A pesar de ello, hasta ahora se han descrito más de veinte proteínas de la superficie espermática implicadas en la interacción inicial entre espermatozoide y ovocito. El reconocimiento especie-específico entre gametos no es producto de la acción de una única proteína, sino que hay varias implicadas en dicho proceso.

El método más conveniente para identificar estas GP espermáticas es a través de la unión específica de lectinas, gracias a las cuáles se ha podido observar los continuos cambios y redistribuciones que sufre la

membrana espermática desde la espermatogénesis hasta la fecundación del gameto femenino. Los resultados obtenidos a través de los estudios realizados con lectinas han de ser interpretados con cautela. En primer lugar, hay que tener en cuenta que la especificidad de las lectinas depende de las condiciones en las que se realice la técnica, tales como, el proceso de fijación, temperatura y concentración de ligandos. En segundo lugar, el método que se utilice para procesar el semen también puede falsear los resultados obtenidos. Por último, también hay que tener en cuenta la presencia de glicolípidos en la membrana espermática, lo que implica que las secuencias oligosacáridicas de las GP no son las únicas que reconocen específicamente las lectinas.

APLICACIONES CLÍNICAS

Considerando la relevancia que tienen los pasos iniciales de la interacción entre espermatozoide y ovocito en el proceso de la fecundación, la información aportada por los estudios realizados con lectinas resulta de vital importancia para entender el mecanismo de la fecundación. Además, estos estudios pueden contribuir a:

- El desarrollo de nuevos ensayos diagnósticos que permitan conocer la capacidad fecundante del semen antes de iniciar un ciclo de reproducción asistida, lo que orientaría a los clínicos al indicar el tipo de técnica de reproducción asistida a la que se deben someter los pacientes.

- La ayuda en el tratamiento de la infertilidad masculina, aportando nuevas soluciones.

- El desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos, utilizando moléculas en forma de antígenos que bloqueen determinadas GP esenciales en el reconocimiento especie-específico entre gametos, lo que impediría la unión entre espermatozoide y ovocito y por tanto, en último término, la fecundación.

Del mismo modo, también sería interesante la realización de estudios con lectinas en muestras seminales que no han dado lugar a fecundación tras un ciclo de FIV, lo cual podría proporcionarnos el motivo por el que dicho semen carece de capacidad fecundante.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Töpfer-Petersen E.:** Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Hum Reprod Update*, 1999; 5(4): 314-329.

2. **Conner SJ, Lefièvre L, Hughes DC, Barratt CLR.:** Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Hum Reprod.*, 2005; 20(5): 1148-1152.
3. **Kawakami E, Morita Y, Hori T, Tsutsui T.:** Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. *J Vet Med Sci.*, 2002; 64(7): 543-549.
4. **Mahmoud AI, Parrish JJ.:** Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Mol Reprod Dev.*, 1996; 43: 554-560.
5. **De Jonge C.:** Biological Basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*, 2005; 11(3): 205-214.
6. **Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES.:** A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.*, 2001; 3(2): E59-64.
7. **Herrández Díaz P, Martín González O, Rodríguez de Pablos Vélez Y, Ganem Báez CFA.:** Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.*, 1999; 15(2): 91-95.
8. **Gallego del Sol F, Nagano CS, Cavada BS, Sampaio AH, Sanz L, Calvete JJ.:** Lectinas. *Investigación y ciencia.*, 2006; 361: 58-67.
9. **Rodríguez MV, Riquelme B, Valverde J, Gattuso S.:** Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. *Anales Afa.*, 2004; 16: 247-248.
10. **Elgavish S, Shaanan B.:** Lectin carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci.*, 1997; 12: 462-467.
11. **Hammerstedt RH, Hay SR, Amann RP.:** Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol Reprod.*, 1982; 27: 745-754.
12. **Olso GE, Danzo BJ.:** Surface changes in rat spermatozoa during epididymal transit. *Biol Reprod.*, 1981; 24: 431-443.
13. **Tulsiani DRP, Nagdas SK, Skudlarek MD, Orgebin-Crist MC.:** Rat sperm plasma membrane mannosidase: localization and evidence for proteolytic processing during epididymal maturation. *Dev Biol.*, 1995; 167: 584-595.
14. **Bedford JM.:** Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymus. *Nature*, 1963; 200: 1178-1180.
15. **Nicolson GL, Usui N, Yanagimachi R, Yanagimachi H, Smith JR.:** Lectin binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa: changes in the surface receptors during epididymal maturation and after ejaculation. *J Cell Biol.*, 1977; 74: 950-962.
16. **Navaneetham D, Sivashanmugam P, Rajalakshmi M.:** Changes in binding of lectins to epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa of the rhesus monkey. *Anat Rec.*, 1996; 245: 500-508.

17. **Calvo A, Pastor LM, Bonet S, Pinart E, Ventura M.:** Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymus. *J Reprod Fertil.* 2000; 120: 325-335.
18. **Liu HW, Wang JJ, Chao CF, Muller C.:** Identification of two maturation related, wheat-germ-lectin-binding proteins on the surface of mouse sperm. *Acta Anat.* 1991; 142: 165-170.
19. **Baker SS, Thomas M, Thaler CD.:** Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J Androl.*, 2004; 25(5): 744-751.
20. **Jiménez I, González-Márquez H, Ortiz R, Herrera JA, Garcíá A, Betancourt M, Fierro R.:** Changes in the distribution of lectins receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 2003; 59(5-6): 1171-1180.
21. **Benoff S.:** Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod.*, 1997; 3(7): 599-637.
22. **Gabriel LK, Franken DR, Van der Horst G, Kruger TF.:** Fluorescein isothiocyanate conjugate-wheat germ agglutinin staining of human spermatozoa and fertilization in vitro. *Fertil Steril.*, 1995; 63(4): 894-901.
23. **Centrola GM, Mattox JH, Leary JF.:** Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev.*, 1990; 27: 130-135.
24. **Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR.:** Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 1990; 5(1): 99-103.
25. **Nishikimi A, Yamada M, Minami N, Utsumi K.:** Evaluation of acrosomal status of bovine spermatozoa using concanavalin a lectin. *Theriogenology*, 1997; 48(6): 1007-1016.
26. **Gabriel LK, Franken DR, Van der Horst G et al.:** Wheat germ agglutinin receptors on human sperm membranes and sperm morphology. *Andrologia.*, 1994; 26: 5-8.
27. **Lee M-C, Damjanov I.:** Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat Rec.*, 1985; 212(3): 282-287.
28. **Voglmayr JK, Sawyer RF.Jr, Dacheux JL.:** Glycoproteins: a variable factor in surface transformation of ram spermatozoa during epididymal transit. *Biol Reprod.*, 1985; 33(1): 165-176.
29. **Bostwick EF, Bentley MD, Hunter AG, Hammer R.:** Identification of a surface glycoprotein on porcine spermatozoa and its alteration during epididymal maturation. *Biol Reprod.*, 1980; 23(1): 161-169.
30. **Dacheux JL, Dacheux F, Paquignon M.:** Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. *Biol Reprod.*, 1989; 40(3): 635-651.
31. **Jiménez I, González-Márquez H, Ortiz R, Betancourt M, Herrera J, Fierro R.:** Expresión of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry. *Arch Androl.*, 2002; 48(2): 159-166.
32. **Kawakami E, Sato T, Hirano T, Hori T, Tsutsui T.:** Disappearance of the PHA-E lectin binding site on the surface of ejaculated sperm and sperm capacitation in the dog. *J Vet Med Sci.*, 2004; 66(5): 495-500.
33. **Benoff S, Hurlley 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(12): 2141-2154.
34. **Benoff S, Cooper GW, Hurlley I, Napolitano B, Rosenfeld DL, Scholl GM, Hershlag A.:** Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fertil Steril.*, 1993; 59(4): 854-862.
35. **Benoff S, Hurlley I, Cooper GM, Mandel FS, Hershlag A, Scholl GM, Rosenfeld DL.:** Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod.*, 1993; 8(12): 2155-2166.
36. **Lasalle B, Testart J.:** Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *J Reprod Fertil.*, 1994; 101(3): 703-711.
37. **Vasquez JM, Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH.:** Lectin and heparin-binding features of human spermatozoa as analyzed by flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol.*, 1990; 163(6 Pt 1): 2006-2012.
38. **Bains HK, Sehgal S, Bawa SR.:** Human sperm surface mapping with lectins. *Acta Anat.*, 1992; 145(3): 207-211.
39. **Fei WY, Hao XW.:** Wheat germ agglutinin (WGA) receptors on human sperm membrane and male infertility. *Arch Androl.*, 1990; 24(1): 97.
40. **Pan ZX, Wang YF.:** Quantification and localization of wheat germ agglutinin receptor on human sperm membrane and male fertility and infertility. *Arch Androl.*, 1990; 24(1): 103.
41. **Gabriel LK, Franken DR, Van der Horst G, Kruger TF, Oehninger SC.:** Wheat germ agglutinin receptors on human sperm membranes and sperm morphology. *Andrologia*, 1994; 26(1): 5-8.
42. **Gabriel LK, Franken DR.:** Binding of human spermatozoa to lectin-coated agarose microbeads. *Arch Androl.*, 1997; 38(2): 133-141.
43. **Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR.:** Combined use of fluorescence peanut agglutinin lectin and Hoechst

- 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 1990; 5(1): 99-103.
44. **Esteves SC, Sharma RK, Thimas AJ Jr, Agarwal A.:** Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *Int Braz J Urol.*, 2007; 33(3): 364-374; discussion 375-376.
45. **Tesarik J, Mendoza C.:** Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk. *Fertil Steril.*, 1995; 63(1): 153-157.
46. **Suri A.:** Contraceptive vaccines targeting sperm. *Expert Opin Biol Ther.*, 2005; 5(3): 381-392.
47. **Lee MC, Damjanov I.:** Lectin binding sites on human sperm and spermatogenic cells. *Anat Rec.*, 1985; 212(3): 282-287.
48. **Arenas MI, Madrid JF, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R.:** Lectin histochemistry of the human testis. *Int J Androl.*, 1998; 21(6): 332-342.
49. **Gheri G, Thyrión GD, Vichi D, Sgambati E.:** Lectin-binding sites in newborn human testis. *Ital J Anat Embryol.*, 2004; 109(2):85-93.
50. **Gheri G, Sgambati E, Thyrión GD, Vichi D, Orlandini GE.:** The oligosaccharidic content of the glycoconjugates of the prepubertal descended and undescended testis: lectin histochemical study. *Ital J Anat Embryol.*, 2004; 109(2): 69-84.
51. **Snell WJ, White JM.:** The molecules of mammalian fertilization. *Cell*, 1996; 85(5): 629-637.
52. **Xu C, Rigney DR, Anderson DJ.:** Two-dimensional electrophoretic profile of human sperm membrane proteins. *J Androl.*, 1994; 15(6): 595-602.
53. **Bearer EL, Friend DS.:** Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microscop Tech.*, 1990; 16(4): 281-297.