

ORIGINAL

La capacitación y la reacción acrosómica se asocian con cambios en la localización del ácido siálico y en la morfometría de la región cefálica del espermatozoide humano



Paula Sáez-Espinosa^a, Stéphanie Torrijo-Boix^a, Natalia Huerta-Retamal^a, Manuel Avilés^b, Jon Aizpurua^{c,d}, Alejandro Romero^a y María José Gómez-Torres^{a,d,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad de Alicante, Alicante, España

^b Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad de Murcia, Instituto Murciano de Investigación Sociosanitaria (IMIB), Murcia, España

^c IVF Spain, Medicina Reproductiva, Alicante, España

^d Cátedra Human Fertility, Universidad de Alicante, Alicante, España

Recibido el 14 de septiembre de 2016; aceptado el 12 de marzo de 2017

Disponible en Internet el 19 de abril de 2017

PALABRAS CLAVE

Espermatozoide;
Ácido siálico;
Lectina;
Morfometría
geométrica

Resumen

Objetivo: Evaluar los cambios de distribución del ácido siálico durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica *in vitro* y estudiar las modificaciones morfométricas en estas condiciones fisiológicas en la región cefálica del espermatozoide humano.

Material y método: En este estudio prospectivo, evaluamos 6 muestras espermáticas normozoospermicas. La distribución de ácido siálico se evaluó mediante la lectina *Wheat germ agglutinin* en diferentes condiciones fisiológicas: antes, después de la capacitación y tras la reacción acrosómica. La forma y el tamaño cefálico de cada estadio se estudiaron mediante métodos de morfometría geométrica.

Resultados: Tras la capacitación, un $73,07 \pm 21,43\%$ de espermatozoides presentaron ácido siálico en la región acrosomal en relación directa con una expansión del acrosoma y una contracción del segmento ecuatorial. Por otra parte, después de la reacción acrosómica se registra un mayor efecto alométrico entre los estadios debido a que los espermatozoides experimentaron una marcada expansión del segmento ecuatorial. En relación con la localización de *Wheat germ agglutinin*, encontramos una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia en la región acrosomal, así como un incremento del marcaje en la banda ecuatorial.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran que la distribución de la lectina *Wheat germ agglutinin* covaría con importantes cambios en la morfometría de la cabeza del espermatozoide

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mjose.gomez@ua.es (M.J. Gómez-Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.androl.2017.03.002>

1698-031X/© 2017 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Spermatozoa;
Sialic acid;
Lectin;
Geometric
morphometrics

y evidencia importantes implicaciones en los procesos de capacitación y reacción acrosómica.

© 2017 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Capacitation and acrosome reaction are associated with changes in sialic acid location and head morphometry in human sperm

Abstract

Objective: Assess changes in sialic acid distribution during capacitation and acrosome reaction processes, and evaluate head sperm morphometrics modifications in these physiological conditions in human sperm.

Material and method: In this prospective study, we included 6 normozoospermics sperm samples. Sialic acid distribution was evaluated by *Wheat germ agglutinin* lectin in different physiological conditions: before, after capacitation and after acrosome reaction. Head shape and size of each stage were analyzed by means of geometric morphometric methods.

Results: After capacitation, $73.07 \pm 21.43\%$ of sperm showed sialic acid in acrosomal region, linked with an acrosome expansion and equatorial segment contraction. Otherwise, after acrosome reaction higher allometric effect between stages was recorded since sperm undergo further expansion of equatorial segment. Regarding *Wheat germ agglutinin* location, we found that sperm percentage significant decline in acrosomal fluorescence and an increase of equatorial band labeling.

Conclusions: Our findings demonstrate that modifications in *Wheat germ agglutinin* expression covariate with dramatic changes in sperm head morphometry, suggesting important implications in capacitation and acrosome reaction processes.

© 2017 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las células espermáticas presentan una gran diversidad morfométrica debido a la evolución y a las presiones selectivas que actúan sobre la competencia espermática¹. Su particular organización estructural en la especie humana resulta de cambios morfogenéticos complejos que se producen en los testículos durante la espermiogénesis. Una vez que los espermatozoides han abandonado los testículos, la fecundación dependerá de la capacidad para adquirir su funcionalidad en el tracto genital femenino. Este proceso de capacitación² se encuentra asociado a una serie de factores secundarios, como la pérdida de colesterol, una reorganización de los glicoconjugados, un aumento de proteínas fosforiladas y la hiperactivación³. Además, durante la inducción de la reacción acrosómica, el espermatozoide libera enzimas hidrolíticas, permitiendo su paso a través de las cubiertas del óvulo⁴.

Existen numerosos estudios que demuestran la importancia de los hidratos de carbono en el reconocimiento y la unión espermatozoide-zona pelúcida en diferentes especies de mamíferos, incluida la humana⁵. Presentan, además, un papel destacado en otras funciones vinculadas a la inhibición de la capacitación prematura⁶, el paso a través del moco cervical⁷, la protección contra la inmunidad innata y adaptativa de la mujer⁸ o la formación del reservorio espermático⁹. De este modo, para culminar con éxito la fecundación, los espermatozoides deben permanecer

íntegros en su estructura y funcionalmente activos durante el recorrido por el tracto genital femenino.

Dada su habilidad para unirse a hidratos de carbono específicos, el estudio del glucocáliz se vincula a la aplicación de lectinas¹⁰. En concreto, la *Wheat germ agglutinin* (WGA) ha sido comúnmente empleada debido a su afinidad por la N-acetilglucosamina -GlcNAc- y el ácido siálico -NeuNAc-¹¹ de la membrana plasmática. Sin embargo, esta afinidad denota ser altamente superior hacia el ácido siálico¹², cuya deficiencia se ha relacionado como posible causa subyacente de infertilidad masculina en individuos oligospermicos¹³.

Las presiones selectivas influyen en el fenotipo del espermatozoide de una manera plástica¹⁴ y su variabilidad morfométrica se asocia al modo de fecundación y a la selección sexual¹⁵. No obstante, la población espermática de la especie humana, a diferencia de la mayoría de las especies de mamíferos, presenta una extrema variabilidad morfológica¹⁶, probablemente producida durante la espermiogénesis y a través de efectos pleiotrópicos poco conocidos. Esta elevada variación morfológica, junto con la utilización de técnicas de análisis subjetivas que dependen de la experiencia del observador, del método de tinción, así como del número de células evaluadas, limita la obtención de resultados contundentes y de carácter predictivo en el proceso reproductivo¹⁷. Adicionalmente, en la especie bovina se han observado cambios morfológicos en el espermatozoide a nivel cefálico durante la capacitación y tras la

reacción acrosómica¹⁸. Otros estudios en roedores describen el efecto de la expresión de protaminas del mismo modo en la morfometría celular¹⁹.

El ácido siálico es el monosacárido más abundante en el extremo terminal de los glicoconjugados²⁰, posición que le confiere una relevancia destacada durante el proceso de fecundación. Además, su localización está asociada con la morfología del espermatozoide humano²¹. Sin embargo, la distribución detallada de sus patrones y su relación con la morfometría durante la capacitación y tras la reacción acrosómica no es conocida. En este trabajo, evaluamos por primera vez la influencia de los cambios de distribución del ácido siálico en la variación morfométrica de la región cefálica durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica. Este estudio tiene como finalidad identificar nuevos biomarcadores espermáticos indicadores del estado fisiológico y la capacidad fecundante del espermatozoide humano.

Material y métodos

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Alicante en el periodo de tiempo comprendido entre abril y diciembre del 2015.

Tratamiento de las muestras espermáticas

Las muestras espermáticas se obtuvieron bajo consentimiento informado de 6 donantes mediante masturbación con un tiempo de abstinencia sexual de entre 3 y 5 días. Antes del transcurso de 1 h se les realizó un seminograma básico y se incluyeron las muestras clasificadas como normozoospermicas con base en criterios previos establecidos¹⁶. Posteriormente, las muestras se dividieron en 2 alícuotas para ser estudiadas antes y después de la capacitación *in vitro*.

Capacitación *in vitro*

El plasma seminal fue eliminado centrifugando la muestra durante 10 min a 250 g y, seguidamente, se le realizó un lavado con medio fluido tubárico humano (Origio) durante 5 min a 250 g. La capacitación de la muestra se llevó a cabo mediante la técnica de *swim-up* a 1 h utilizando el medio fluido tubárico humano suplementado con 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) a 37 °C y 5% CO₂. Los resultados de movilidad obtenidos fueron $\geq 95\%$ en todas las muestras. Tras la capacitación, la mitad de la muestra fue destinada a fijación y la otra para la inducción de la reacción acrosómica.

Reacción acrosómica

La inducción de la reacción acrosómica tuvo lugar mediante la adición de 10 μ M de ionóforo de calcio A23187 (Sigma) y 220 mM de cloruro de calcio durante 1 h a 37 °C y 5% CO₂, tomando como referencia protocolos previos²². A la muestra control únicamente se le añadió cloruro de calcio. Tras la inducción de la reacción acrosómica se verificó la viabilidad de la muestra mediante la tinción eosina-nigrosina, siendo este porcentaje $> 95\%$ en todas las muestras.

Fijación

Las muestras antes y después de la capacitación, así como tras la reacción acrosómica fueron fijadas en paraformaldehído al 2% durante 1 h a 4 °C. Finalmente, se resuspendieron para lograr una concentración final de 1 mill/ml y se conservaron a 4 °C.

Técnicas de inmunofluorescencia

Integridad del acrosoma

Para la evaluación de la reacción acrosómica, las células previamente fijadas se incubaron con la lectina *Pisum sativum agglutinin* (PSA) conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories) a una concentración de 50 μ g/ml durante 30 min en oscuridad. Tras 3 lavados con PBS, se utilizó el medio de montaje VectaShield con DAPI para su evaluación en el microscopio de fluorescencia (Leica DMRB). Aquellos espermatozoides que mostraron fluorescencia en el acrosoma fueron considerados como no reaccionados y los que presentaron marcaje en la banda ecuatorial, como reaccionados.

Fosforilación de tirosina

Con el objetivo de comprobar el estado de la capacitación, las células previamente fijadas se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal antifosfotirosina (Sigma) 1:500 durante 1 h, seguido de 3 lavados en PBS durante 5 min. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch) 1:300 durante 1 h en oscuridad y se procedió a su lavado 3 veces en PBS durante 5 min. Finalmente, se utilizó el medio de montaje VectaShield combinado con DAPI y el resultado fue examinado mediante microscopia de fluorescencia (Leica DMRB). La presencia de tirosina fosforilada fue evaluada a nivel del flagelo.

Inmunolocalización de *Wheat germ agglutinin*

Las muestras previamente fijadas se depositaron en cubreobjetos y, una vez secas, se incubaron con la solución de bloqueo de suero bovino fetal al 2% durante 30 min. A continuación, se procedió al marcaje con la lectina WGA conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories) a una concentración de 20 μ g/ml durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad y se realizaron 3 lavados en PBS. Para el montaje se utilizó VectaShield combinado con DAPI y el resultado se evaluó mediante microscopia de fluorescencia (Leica DMRB). Se caracterizaron aquellos patrones de marcaje presentes como mínimo en un 5% de la población espermática en función de modelos previamente establecidos²³. En todos los experimentos fueron evaluados un mínimo de 200 espermatozoides.

Análisis morfométrico

Obtención de micrografías

El análisis morfométrico del espermatozoide se realizó a partir de micrografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido con una magnificación estandarizada de $\times 10.000$ aumentos y a partir de nuevas técnicas de morfometría

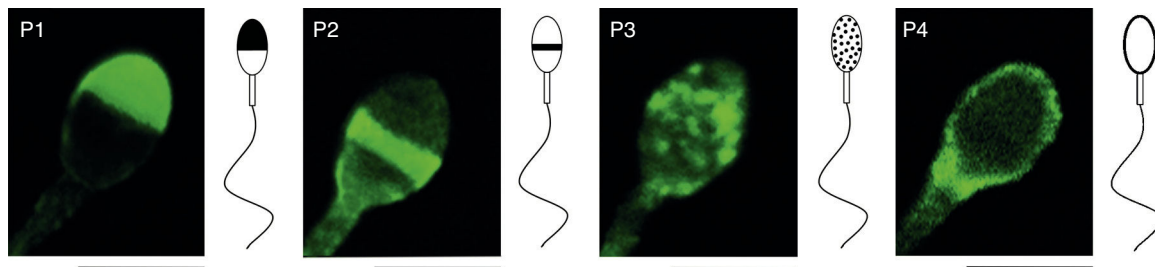


Figura 1 Patrones de fluorescencia observados con la lectina WGA. Región acrosomal (P1), segmento ecuatorial (P2), región cefálica punteada (P3) y contorno de la membrana plasmática a nivel cefálico (P4). Barra de escala: 5 μ m.

geométrica (MG)^{14,19}, extrayendo la forma y el tamaño como variables independientes. La MG es una técnica de análisis definida como la unión entre la biología y la geometría²⁴. En lugar de enfocarse en el análisis multivariante de un conjunto de medidas lineales entre puntos morfométricos, la MG analiza los cambios en la conformación de un objeto a partir del desplazamiento en el plano (2D) o en el espacio (3D) de un conjunto de *landmarks*.

Registro de forma y tamaño celular

El registro de la forma y el tamaño del espermatozoide a partir de técnicas de MG²⁴ se llevó a cabo en 334 células de 6 donantes agrupadas en 3 condiciones fisiológicas, correspondientes a no capacitado ($n = 148$), capacitado ($n = 109$) y reaccionado ($n = 77$). Por cada donante se analizó un número similar > 50 células. Las micrografías (1.024×756 TIFF) fueron procesadas en MakeFan6 para disponer 30 radios equiangulares de contorno con respecto al punto central de cada célula, delimitado por el acrosoma y punto de intersección con la pieza intermedia. Para el análisis de la variación morfométrica se identificaron 4 puntos anatómicos homólogos o *landmarks*, definidos por los límites del segmento ecuatorial y el que separa la cabeza de la pieza intermedia. El resto de las 26 coordenadas fueron consideradas como *semi-landmarks*^{14,25}. Cada coordenada fue registrada y escalada a 1 μ m con tpsDIG2. Para el conjunto de células, las coordenadas se superpusieron por medio de un análisis de Procrustes generalizado considerando el deslizamiento de *semi-landmarks* por minimización de distancia de Procrustes²⁴. El algoritmo del análisis de Procrustes generalizado permite minimizar la rotación, la traslación y el escalamiento de las configuraciones de coordenadas registradas, extrayendo los parámetros de forma y tamaño (*centroid size* [CS])²⁴.

Análisis estadístico

La variación en los patrones a nivel intra e interestadio fue analizada estadísticamente mediante *t-test*. La dependencia entre forma y tamaño se calculó por medio de una regresión multivariante de las coordenadas Procrustes y el *logCS*. La variabilidad morfométrica para las 3 subpoblaciones de células fue analizada a partir de los residuos derivados de un análisis de componentes principales²⁶. El análisis de MG y estadístico univariante (ANOVA y HSD Tukey) se realizó con MorphoJ y PAST 3.0. En todos los casos el nivel de significación estadística fue $\alpha = 0,05$.

Resultados

Valoración de la reacción acrosómica mediante *Pisum sativum agglutinin*

Después de la inducción de la reacción acrosómica un $82,00 \pm 8,85\%$ de los espermatozoides se encontraban reaccionados, frente al $17,50 \pm 5,25\%$ registrado en los controles.

Valoración de la fosforilación de tirosina mediante anticuerpo primario monoclonal antifosfotirosina

El porcentaje promedio de espermatozoides que mostraron fosforilación de tirosina a nivel del flagelo antes de la capacitación fue de $3,64 \pm 2,33\%$. Tras la capacitación ($23,45 \pm 8,41\%$) y la inducción acrosómica ($17,64 \pm 7,43\%$), este valor aumentó de forma significativa ($p < 0,001$).

Distribución de *Wheat germ agglutinin*

La fluorescencia de la WGA fue evaluada a partir del registro de 4 patrones definidos como región acrosomal (P1), segmento ecuatorial (P2), región cefálica punteada (P3) y contorno de la membrana plasmática a nivel cefálico (P4) (fig. 1). El porcentaje de patrones (media $\pm \sigma$) de la lectina WGA (tabla 1) muestra como el porcentaje de P1 no sufre cambios significativos tras la capacitación, pasando de un $60,15 \pm 12,45\%$ a un $73,08 \pm 21,43\%$. Sin embargo, después de la inducción de la reacción acrosómica disminuye significativamente ($p < 0,05$) hasta un $36,92 \pm 13,62\%$. El P2 antes de la capacitación presentó un $6,69 \pm 8,00\%$, en capacitado un $4,85 \pm 6,67\%$ y tras la inducción de la reacción acrosómica aumentó significativamente ($p < 0,05$) hasta el $29,00 \pm 20,52\%$. En cuanto al P3 y al P4, sus valores no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes estadios. De este modo, el P3 presentó un $24,00 \pm 8,18\%$ en fresco, un $15,84 \pm 13,50\%$ en capacitado y un $22,69 \pm 11,93\%$ tras la reacción acrosómica. Por su parte, el P4 mostró en fresco un $9,15 \pm 9,55\%$, en capacitado un $6,23 \pm 8,88\%$ y un $11,38 \pm 5,39\%$ en reaccionado.

Cambios de conformación morfométrica

Los 3 primeros componentes principales (CP1-3) extraídos del análisis multivariante morfométrico explican un $72,20\%$ de variabilidad de la varianza. La varianza registrada a partir

Tabla 1 Expresión de los patrones de WGA en las diferentes condiciones fisiológicas

	P1	P2	P3	P4
No capacitado	60,15 ± 12,45	6,69 ± 8,00	24,00 ± 8,18	9,15 ± 9,55
Capcitado	73,08 ± 21,43	4,85 ± 6,67	15,84 ± 13,50	6,23 ± 8,88
Reaccionado	36,92 ± 13,62 ^a	29,00 ± 20,52 ^a	22,69 ± 11,93	11,38 ± 5,39

Los valores se muestran como media ± σ (%) para cada patrón (P1-4).

^a Patrones significativamente diferentes (*t-test*; $p < 0,05$) entre capacitado y reaccionado.

del CP4 es < 5%. Únicamente el CP1 (42,84% de la varianza) presenta diferencias significativas entre las poblaciones espermáticas (ANOVA: $F_{2, 331} = 49,735$; $p < 0,001$) (fig. 2a) y permite discriminar la forma celular entre grupos. Con

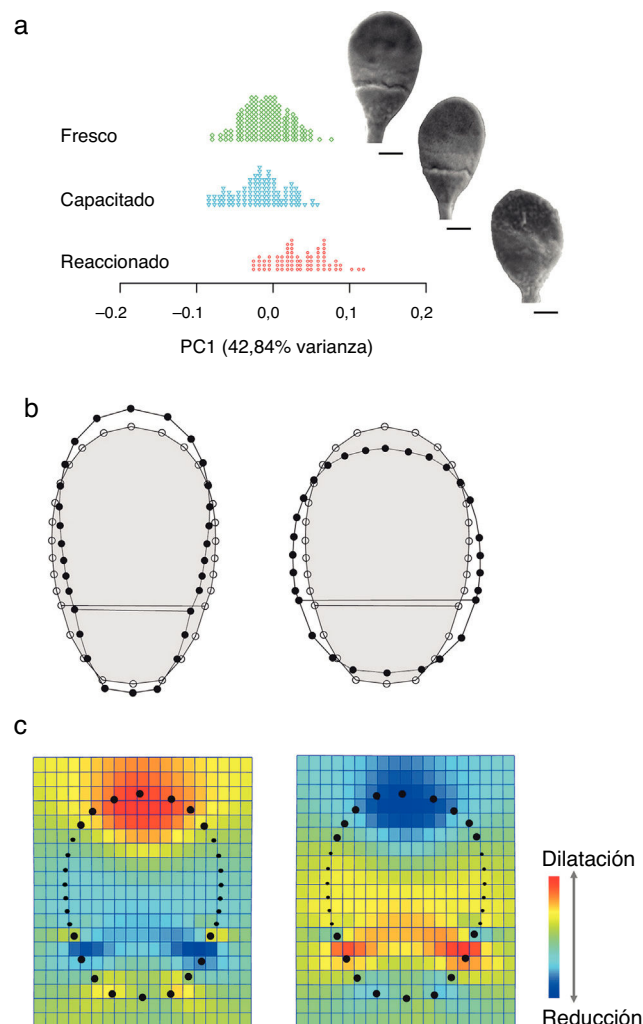


Figura 2 Variación de la morfometría del espermatozoide. (a) Distribución de los casos en el primer componente principal (CP1) de forma. Micrografías por microscopia electrónica de barrido $\times 10.000$ de los tipos fresco, capacitado y reaccionado; escala 1 μm en todos los casos. (b) Cambios de forma (*wireframes*) en los extremos negativo y positivo con respecto al consenso (gris). Nótese el cambio de conformación (mapas de deformación) en el espermatozoide reaccionado que afecta a la reducción del acrosoma y dilatación del segmento ecuatorial (c).

respecto al fresco, los capacitados expresan una dilatación del acrosoma y una reducción de la anchura del segmento ecuatorial que confieren cambios en sus respectivas conformaciones (HSD Tukey; $p = 0,009$) (fig. 2b-c). No obstante, existen diferencias mayores entre la morfometría de la población de espermatozoides reaccionados con respecto a aquellos frescos y capacitados (HSD Tukey; $p < 0,001$). Durante la reacción acrosómica, el cambio morfométrico expresa una dilatación del segmento ecuatorial, confiriendo una reducción proporcional del acrosoma (fig. 2c). Por otro lado, las diferencias en tamaño (CS) entre poblaciones (ANOVA: $F_{2, 331} = 16,976$; $p < 0,001$) se derivan de la heterogeneidad celular. El análisis alométrico indica que existe a nivel intrapoblación un cambio de configuración en la morfometría celular (matriz Procrusters) con respecto al CS (r Pearson $\geq 0,5$; $p < 0,001$) (fig. 3). No obstante, el porcentaje de predicción para el espermatozoide reaccionado (33,22%) es mayor que para el capacitado (14,70%) y fresco (4,10%).

Discusión

Nuestros resultados muestran que la capacitación *in vitro* aumenta significativamente el porcentaje de espermatozoides que presentan fosforilación de tirosina a nivel del flagelo. Estos datos concuerdan con estudios previos que confirman la presencia de tirosina fosforilada en el flagelo del espermatozoide y su marcada relación con la hiperactivación de la motilidad durante el proceso de capacitación²⁷.

Las lectinas, dada su habilidad para unirse específicamente a hidratos de carbono, permiten registrar la distribución de las glicoproteínas presentes en la membrana plasmática del espermatozoide¹⁰. Su empleo revela los múltiples cambios que afectan a la distribución de glicoconjugados durante la maduración epididimaria, así como en la capacitación y tras la reacción acrosómica^{23,28}. En concreto, la lectina PSA que se une a residuos de manosa presentes en la vesícula acrosomal es un marcador del estado del acrosoma de los espermatozoides²⁹. El porcentaje de espermatozoides reaccionados tras la inducción de la reacción acrosómica mediante ionóforo de calcio A23187 y valorado mediante la lectina PSA confirma que el 82,00% de los espermatozoides evaluados en este grupo habían desencadenado la reacción acrosómica. Sin embargo, en el grupo control este porcentaje fue significativamente menor (17,50%), resultados que concuerdan con trabajos previos²⁹.

La morfología del gameto masculino puede ser un claro indicador de la capacidad fecundante de los espermatozoides³⁰. No obstante, una definición óptima de su morfología no implica necesariamente la correcta funcionalidad, muchas veces ligada a la incapacidad de unión

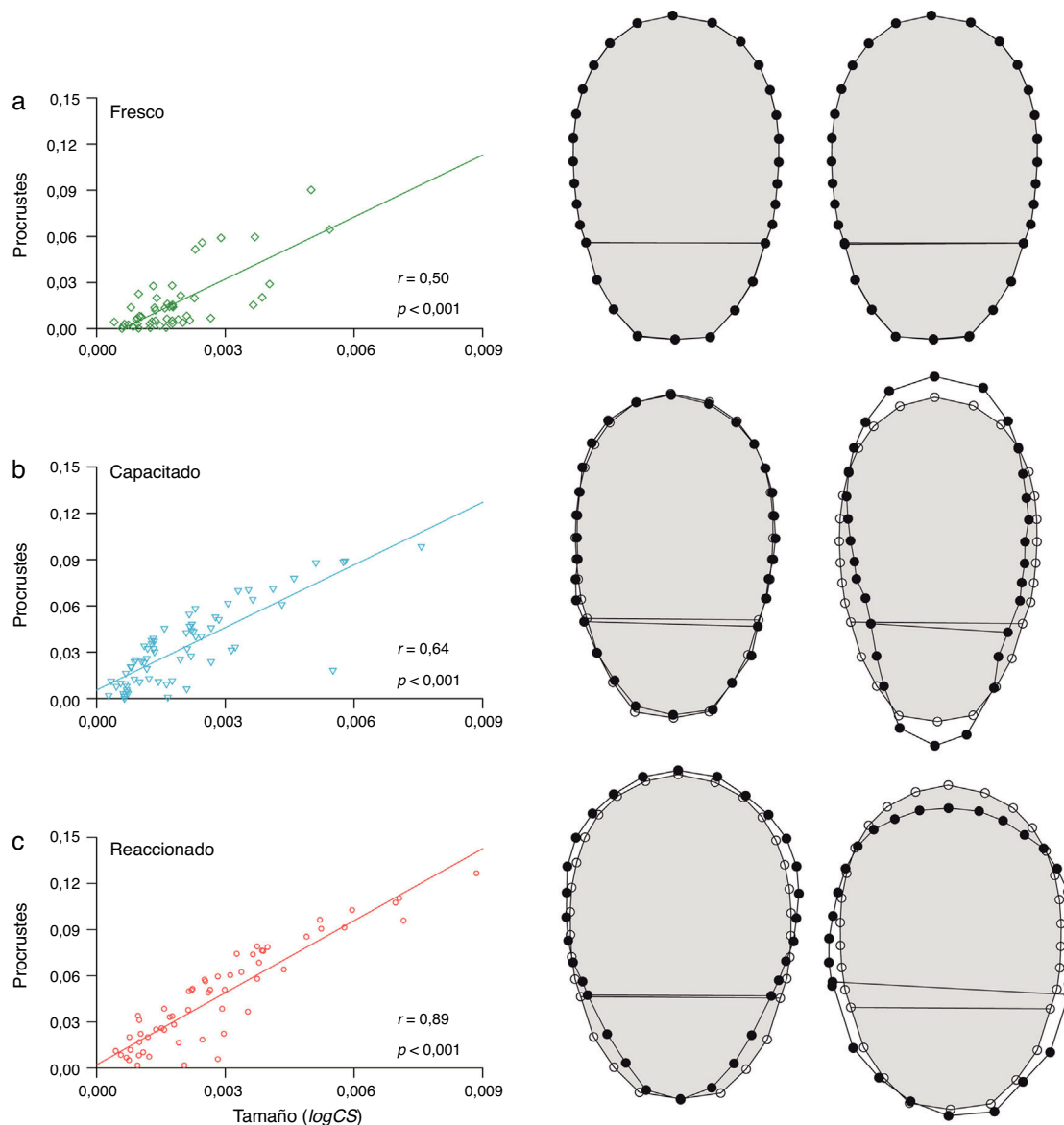


Figura 3 Relación forma-tamaño entre poblaciones de espermatozoides frescos (a), capacitados (b) y reaccionados (c). La forma (matriz de Procrustes) muestra una covariación positiva y significativa ($p < 0,001$) con el tamaño ($\log CS$). Los cambios de forma (wireframes) representan los casos extremos (negro) en relación con el consenso (gris). La alometría expresa un mayor cambio de conformación en capacitados (14%) y reaccionados (33%) y evidencia que la variabilidad en frescos (4%) es menor.

del espermatozoide, bien con la zona pelúcida³¹, bien con el oolema³², del ovocito. En este contexto, la relación entre la distribución de los glicoconjugados de membrana plasmática y la morfometría del espermatozoide humano no ha sido hasta ahora analizada en detalle.

El empleo de técnicas de MG permite establecer con precisión los cambios estructurales del espermatozoide y su relación con la distribución de los glicoconjugados a lo largo del proceso de capacitación y reacción acrosómica. El registro morfométrico de los espermatozoides analizados en nuestro estudio, tras la capacitación, muestra un proceso de dilatación acrosomal y una reducción en anchura del segmento ecuatorial. Por lo tanto, a partir del modelo establecido y propuesto en la [figura 3](#), es posible registrar una

evidente plasticidad estructural que se asocia con los cambios moleculares que acontecen durante la capacitación. Entre ellos, la pérdida de colesterol, que le otorga un mayor grado de fluidez a la membrana, permitiendo la redistribución de dominios lipídicos y proteicos que van a favorecer finalmente el proceso de fecundación³. Además, tras la capacitación observamos un aumento en el porcentaje de espermatozoides, en los que la presencia del ácido siálico se localizó en la región acrosomal, con respecto a los espermatozoides nativos. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambas poblaciones, esta relocalización está en concordancia con otros estudios en los que se evidenció la importancia de la redistribución del ácido siálico durante el proceso de capacitación³³, así como la relación

de un elevado porcentaje de expresión del ácido siálico en el acrosoma de espermatozoides capacitados con mejores tasas de reproducción *in vitro*³⁴.

Por otro lado, tras la reacción acrosómica, el registro morfométrico en este estudio revela que en el espermatozoide humano se produce una disminución del acrosoma y una dilatación del segmento ecuatorial, como se ilustra en la figura 3. La disminución del acrosoma está asociada a la descrita exocitosis del contenido de la vesícula acrosómica³. Sin embargo, la dilatación del segmento ecuatorial podría estar relacionada con la incorporación de parte del contenido acrosomal necesario para continuar con el proceso de penetración espermática²⁰. Este cambio morfométrico, con base en la forma y al tamaño, del segmento ecuatorial en el espermatozoide humano tras la inducción de la reacción acrosómica se detalla por primera vez en este trabajo. La pérdida de la membrana plasmática también se corrobora con la relocalización de la WGA, disminuyendo significativamente la presencia del ácido siálico a nivel del acrosoma y aumentando en la región del segmento ecuatorial. Esto está en concordancia con trabajos recientes en los que se observó la presencia de ácido siálico en el sobrenadante tras la capacitación espermática³⁵. Además, la ausencia del ácido siálico tras la reacción acrosómica sería un marcador de la pérdida de la membrana acrosomal externa, la cual permite desenmascarar moléculas presentes en la membrana interna implicadas en el reconocimiento de la zona pelúcida^{12,28}.

Por lo tanto, este trabajo demuestra que el estudio simultáneo de diferentes biomarcadores espermáticos y la aplicación de nuevas herramientas morfométricas permiten definir de forma precisa los cambios celulares y moleculares que experimenta el espermatozoide durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica. Este modelo de análisis establece una herramienta de mejora de los métodos de selección espermática, permitiendo desarrollar avances en los tratamientos de reproducción asistida.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este trabajo ha sido subvencionado por la Cátedra Human Fertility de la Universidad de Alicante y el proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad AGL2015-70159-P.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Gage MJ. Complex sperm evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:4341–2.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951;168:697–8.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, et al. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*. 1998;19:242–8.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD, editores. *Physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 189–317.
- Benoff S. Carbohydrates and fertilization: An overview. *Mol Hum Reprod*. 1997;3:599–637.
- Yeung WS, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho PC, et al. Roles of glycodefin in modulating sperm function. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;250:149–56.
- Tollner TL, Venners SA, Hollox EJ, Yudin AI, Liu X, Tang G, et al. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci Transl Med*. 2011;3:92ra65.
- Pandya IJ, Cohen J. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. *Fertil Steril*. 1985;43:417–21.
- Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. 2006;12:23–37.
- Koehler JK. Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Arch Androl*. 1981;6:197–217.
- Monsigny M, Roche AC, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F. Sugar-lectin interactions: How does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem*. 1980;104:147–53.
- Lassalle B, Testart J. Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface. *J Reprod Fertil*. 1994;101:703–11.
- Purohit S, Laloraya M, Kumar PG. Distribution of N- and O-linked oligosaccharides on surface of spermatozoa from normal and infertile subjects. *Andrologia*. 2008;40:7–12.
- Firman RC, Cheam LY, Simmons LW. Sperm competition does not influence sperm hook morphology in selection lines of house mice. *J Evol Biol*. 2011;24:856–62.
- Immler S, Moore HD, Breed WG, Birkhead TR. By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS One*. 2007;2:e170.
- World Health Organization, editor. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Geneva: World Health Organization; 2010.
- Yaniz JL, Soler C, Santolaria P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim Reprod Sci*. 2015;156:1–12.
- García-Herreros M, Leal CL. Sperm volumetric dynamics during *in vitro* capacitation process in bovine spermatozoa. *Animal*. 2015;9:1016–24.
- Lüke L, Campbell P, Varela Sánchez M, Nachman MW, Roldan ER. Sexual selection on protamine and transition nuclear protein expression in mouse species. *Proc Biol Sci*. 2014;281:20133359.
- Teclé E, Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol Reprod Dev*. 2015;82:635–50.
- 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;26:5–8.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res*. 1986;15:213–26.

23. Gómez-Torres MJ, Avilés M, Girela JL, Murcia V, Fernández-Colom PJ, Romeu A, et al. Characterization of the lectin binding pattern in human spermatozoa after swim-up selection. *Histol Histopathol.* 2012;27:1621–8.
24. Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, editores. *Geometric morphometrics for biologists: A primer.* Amsterdam: Academic Press; 2012.
25. Varea Sánchez M, Bastir M, Roldan ER. Geometric morphometrics of rodent sperm head shape. *PLoS One.* 2013;8: e80607.
26. Klingenberg CP. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol Dev.* 2009;11:4054–121.
27. Chang MC. The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *J Androl.* 1984;5:45–50.
28. Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene MC, Faure GC, et al. Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: Modifications judged by electron microscopy/flow cytometry. *Arch Androl.* 1996;36:187–96.
29. 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;12:714–21.
30. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49:112–7.
31. Liu DY, Clarke GN, Martic M, Garrett C, Baker HW. Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding. *Hum Reprod.* 2001;16:1185–90.
32. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature.* 2014;508:483–7.
33. 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;4:318–24.
34. 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;63:894–901.
35. Fang M, Diana W, Liwen D, Patrick S, June Z, Nissi V, et al. Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *J Biol Chem.* 2012;287:38073–9.