

ORIGINAL

Localización de arilsulfatasa A durante la incubación *in vitro* de espermatozoides humanos en medio de capacitación



Natalia Huerta-Retamal^a, Paula Sáez-Espinosa^a, Laura Robles-Gómez^a,
Alejandro Romero^a, Jon Aizpurua^{b,c} y María José Gómez-Torres^{a,c,*}

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

^b IVF Spain, Medicina Reproductiva, Alicante, España

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

Recibido el 29 de enero de 2020; aceptado el 8 de agosto de 2020

Disponible en Internet el 17 de diciembre de 2020

PALABRAS CLAVE

Capacitación;
ARSA;
Inmunofluorescencia

Resumen

Objetivo: Conocer la localización y la distribución del receptor arilsulfatasa A (ARSA) en espermatozoides humanos antes y después de incubarlos en medio de capacitación durante 1 y 4 h.

Material y métodos: Las muestras seminales se obtuvieron de 5 donantes normozoospermicos. La capacitación se llevó a cabo mediante la técnica de *swim-up* usando medio de capacitación durante 1 y 4 h. La localización del receptor ARSA se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta usando microscopia confocal. En cada condición fisiológica se observó un mínimo de 200 células.

Resultados: Antes de la incubación no se observó ningún patrón representativo entre las células positivas para este biomarcador (8,61%). Dicho porcentaje aumentó significativamente tras la incubación en medio de capacitación 1 y 4 h (61,86 y 63,38%, respectivamente). Entre las células capacitadas se observó un patrón mayoritario, con marcaje intenso en la región acrosomal (27,11 y 28,20% tras 1 y 4 h, respectivamente). Destacar que previamente a la incubación en los espermatozoides no se observó el patrón correspondiente a la fluorescencia a nivel de la región periacrosomal: solo tras incubar en medio de capacitación durante 1 y 4 h se detectaron un 9,13 y un 12,78% de células con dicha distribución.

Conclusiones: La capacitación *in vitro*, independientemente del tiempo, favorece la inmunolocalización de ARSA en la región cefálica de los espermatozoides. La subpoblación más representativa tras dicho proceso fue aquella en la que ARSA se distribuyó de forma intensa y homogénea en la región acrosomal, implicada en el reconocimiento primario entre gametos.

© 2020 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

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

KEYWORDS

Capacitation;
ARSA;
Immunofluorescence

Localization of Arylsulfatase A during in vitro incubation of human spermatozoa in capacitation media**Abstract**

Objective: To determine the localization and distribution of the Arylsulfatase A receptor (ARSA) in human spermatozoa before and after their incubation in capacitation medium for 1 and 4 hours.

Material and methods: Semen samples were obtained from five normozoospermic donors. Capacitation was by swim-up technique using capacitation medium for 1 and 4 hours. Localization of the ARSA receptor was assessed by indirect immunofluorescence using confocal microscopy. A minimum of 200 cells were observed in each physiological condition.

Results: Before incubation, no representative pattern was observed among the cells positive for this biomarker (8.61%). This percentage increased significantly after incubation in the capacitation medium for 1 and 4 hours (61.86% and 63.38% respectively). A majority pattern was observed among the capacitated cells, with intense labelling in the acrosomal region (27.11% and 28.20% after 1 and 4 hours respectively). It should be noted that the pattern corresponding to fluorescence at the level of the periacrosomal region was not observed in the spermatozoa prior to incubation. Only after incubation in capacitation medium for 1 and 4 hours, 9.13% and 12.78% of cells with such distribution were detected.

Conclusions: In vitro capacitation, regardless of time, favours the immunolocalization of ARSA in the cephalic region of the spermatozoa. The most representative subpopulation after this process was the one in which ARSA was intensely and homogeneously distributed in the acrosome region, involved in primary gamete recognition.

© 2020 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La espermatogénesis y la espermiogénesis son las responsables de la génesis del espermatozoide, pero dichos procesos no son capaces de generar *per se* gametos con capacidad fecundante^{1,2}. Dicha capacidad se adquiere durante el trayecto de los espermatozoides eyaculados por el tracto genital femenino, cuyas propiedades biológicas, físicas y químicas inducen la capacitación³⁻⁶. Este proceso implica una serie de cambios fisiológicos en el gameto masculino que van desde la pérdida de colesterol⁶ hasta la reorganización de glicoconjugados⁷, pasando por la fosforilación de proteínas⁸ y la hiperactivación⁹⁻¹¹, entre otros.

Debido a la importancia fisiológica de la fosforilación de tirosinas, así como de la capacidad del espermatozoide de liberar su contenido acrosomal durante la fecundación¹¹⁻¹³, varios estudios han señalado estos procesos moleculares como potenciales biomarcadores del éxito de la fecundación^{9,14-20}.

A pesar de la posibilidad de llevar a cabo la capacitación de manera *in vitro*^{6,21}, existe controversia en cuanto al tiempo necesario para que las células espermáticas completen los cambios fisiológicos asociados a este proceso^{6,22}. Los estudios relativos a este tema han referido que los mayores porcentajes de espermatozoides capaces de reconocer y unirse a la zona pelúcida (ZP) del ovocito, es decir, que han completado los cambios asociados a la capacitación, son recuperados tras 4 h de incubación en medio capacitante²³. El hecho de que el problema más frecuente durante la fecundación sea la incapacidad del espermatozoide para

reconocer y unirse a la ZP²⁴⁻²⁷ hace que se cuestione el tiempo de incubación en medio de capacitación durante una hora utilizado actualmente en reproducción asistida²⁸. Por lo tanto, surge la necesidad de conocer la influencia del tiempo de incubación sobre la localización y redistribución de determinados biomarcadores implicados en la fecundación.

Los últimos avances en la identificación de receptores espermáticos implicados en el reconocimiento de la ZP han señalado a la arilsulfatasa A (ARSA) como una proteína clave durante este proceso. Esta proteína forma parte de un complejo junto con la proteína de choque térmico A2 (HSPA2) y la molécula de adhesión espermática (SPAM1)^{27,29}. Los estudios referentes a este complejo han destacado que la deficiencia en la expresión de ARSA ocasiona un fallo en la adhesión de los espermatozoides a la ZP³⁰, haciendo evidente la importancia de esta proteína para el reconocimiento primario entre gametos.

Dada la relevancia de ARSA durante el proceso de fecundación, en la bibliografía podemos encontrar datos sobre la expresión superficial de esta proteína en espermatozoides humanos antes y tras la incubación en medio de capacitación durante 180 min^{27,29}. Estos estudios evidencian la expresión de ARSA en la superficie espermática y su colocalización con HSPA2 y SPAM1 en la región periacrosomal de la cabeza de espermatozoides tras este tiempo de incubación, pero sin tener en cuenta los cambios individuales de estas proteínas durante la capacitación ni el tiempo de 4 h recomendado previamente para completar este proceso²³.

Por ello, en este trabajo evaluamos por primera vez la influencia del tiempo de capacitación en la distribución

espacial del receptor ARSA, antes y tras la incubación en medio de capacitación durante 1 y 4 h.

Material y métodos

Análisis de muestras espermáticas

Las muestras espermáticas se obtuvieron de 5 donantes mediante masturbación tras una abstinencia sexual de entre 3 y 4 días. Estos donantes fueron voluntarios de fertilidad no probada pertenecientes al colectivo de estudiantes de la Universidad de Alicante durante el curso 2018/2019, cuyas edades comprendieron entre los 18 y los 23 años. Antes del transcurso de una hora se realizó un seminograma básico y solo se incluyeron en el estudio las muestras clasificadas como normozoospermicas según los criterios de la OMS²⁸. Posteriormente se dividieron las muestras en alícuotas, de manera que se pudieran testar tres biomarcadores (fosforilación de tirosinas, reacción acrosómica espontánea y ARSA) tanto antes (fresco) como después de 1 y 4 h de incubación en medio de capacitación. Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Alicante (España) de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y todos los donantes firmaron un consentimiento informado.

Capacitación *in vitro*

Tras eliminar el plasma seminal centrifugando la muestra a 250 g durante 10 min se realizó un lavado con medio de fluido tubárico humano (HTF, Origio) durante 5 min a 250 g. Se realizó la capacitación mediante la técnica de *swim-up* en medio de capacitación durante 1 y 4 h usando 1 ml de medio HTF suplementado con 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich), que se repartió en 4 tubos y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Tras la capacitación se recuperaron 250 µl de la fracción superior y se lavó con tampón fosfato (PBS, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Determinación de la reacción acrosómica espontánea

Tras la incubación en medio de capacitación se verificó la integridad acrosomal de las células recuperadas fijando 5 µl de muestra en un cubreobjetos con metanol durante 30 min. Tras tres lavados con PBS, las células fijadas se incubaron en oscuridad durante media hora con la lectina *Pisum sativum agglutinin* conjugada con isocianato de fluoresceína (PSA-FITC, Sigma Aldrich) a una concentración final de 50 µg/ml³¹. Por último, se lavaron las muestras tres veces con PBS y se dejaron secar antes de montarlas en un portaobjetos usando medio de montaje Vectashield H-100, que contiene 4',6-diamidina-2'-fenilindol dihidroclorido (DAPI, Vector Laboratories). Se evaluaron un total de 200 células de cada muestra seminal y condición fisiológica (fresco, capacitada 1 h y capacitada 4 h) utilizando un microscopio confocal láser TCS SP2 de Leica (Alemania). Se realizaron controles negativos con el anticuerpo secundario pertinente, omitiendo la incubación con la lectina.

Fosforilación de tirosinas

Tanto antes como tras la incubación en medio de capacitación durante 1 y 4 h las células espermáticas fueron fijadas en paraformaldehído al 2% durante 1 h a 4 °C. Finalmente se resuspendieron en PBS a una concentración de un millón de células por mililitro y se conservaron a 4 °C. Con el objetivo de cuantificar uno de los cambios moleculares que acontecen en la capacitación se analizó la fosforilación de tirosinas flagelares, en base a protocolos estándar descritos previamente¹⁶. En resumen, las células fijadas en paraformaldehído se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,1% durante 10 min. Las tirosinas fosforiladas se identificaron usando un anticuerpo primario monoclonal antifosfotirosina (clon PY20, Sigma-Aldrich) a concentración 1:500 durante 1 h, seguido de un anticuerpo secundario policlonal conjugado con el fluorocromo Cianin-3 (Cy3, Jackson ImmunoResearch) a concentración 1:300 durante 1 h en oscuridad. Después de un último lavado de 15 min en PBS se montaron los cubreobjetos con medio de montaje Vectashield H-100 con DAPI (Vector Laboratories). Se evaluaron un total de 200 células de cada muestra seminal y condición fisiológica (fresco, capacitada 1 h y capacitada 4 h) utilizando un microscopio confocal láser TCS SP2 de Leica (Alemania). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario.

Inmunolocalización de arilsulfatasa A

Para evaluar la distribución de ARSA en células espermáticas, las muestras previamente fijadas se depositaron en un cubreobjetos y, una vez secas, se sometieron a una recuperación antigénica mediante inmersión en citrato de sodio de 10 mM (pH 6). Se calentaron en el microondas durante 10 min a 1000 W y se lavaron tres veces con buffer de neutralización (100 mM Tris, pH 8.5). Las siguientes incubaciones se realizaron según una modificación del método previamente descrito por Bromfield et al.³² en 2016, de manera que, tras ser lavadas con PBS, las muestras se incubaron con un anticuerpo primario policlonal anti-ARSA (Sigma-Aldrich) diluido 1:10 durante 2 h a 37 °C. Posteriormente se lavó el exceso de reactivo con PBS y se incubaron las células con un anticuerpo secundario policlonal conjugado con FITC diluido 1:100 durante 1 h en oscuridad. Por último, se lavaron las muestras tres veces en PBS y, una vez secas, se montaron con medio de montaje Vectashield H-100 con DAPI (Vector Laboratories). Se evaluó un total de 400 células de cada muestra seminal y condición fisiológica (fresco, capacitada 1 h y capacitada 4 h) utilizando un microscopio confocal láser TCS SP2 de Leica (Alemania). Se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

Análisis estadístico

Los patrones de distribución de ARSA en la cabeza de las células espermáticas, la reacción acrosómica espontánea y la presencia de tirosina fosforilada a nivel de flagelo se cuantificaron como porcentajes (%). Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA con un análisis *post-hoc* de Bonferroni. Al analizar la distribución de ARSA solo se

Tabla 1 Resultado del análisis seminal de las muestras utilizadas en el estudio (media (%) $\pm$ desviación típica) antes y tras la capacitación *in vitro*

Parámetro	Media (%) $\pm$ Desviación típica		
	Fresco	Capacitados 1 h	Capacitados 4 h
Concentración espermática (mill./ml)	82,06 $\pm$ 10,93	6,38 $\pm$ 1,22*	9,00 $\pm$ 3,00*
Motilidad (%)	69,80 $\pm$ 16,17	98,20 $\pm$ 0,44	98,80 $\pm$ 0,44
Morfología normal (%)	7,80 $\pm$ 0,44	14,60 $\pm$ 3,36*	20,00 $\pm$ 4,24*
Reacción acrosómica espontánea (%)	7,20 $\pm$ 1,48	12,14 $\pm$ 2,92	17,50 $\pm$ 5,83
Fosforilación de tirosinas (%)	7,72 $\pm$ 3,78	14,26 $\pm$ 7,76	32,41 $\pm$ 5,15*,**

Diferencias significativas con $p < 0,01$:

* Con respecto a las muestras en fresco.

** Incubadas 1 h en condiciones capacitantes.

tuvieron en cuenta los patrones presentes en más del 5% de los espermatozoides, ya fuera antes o después de la incubación. Se obtuvieron resultados descriptivos y estadísticos utilizando IBM SPSS Statistics 22.0. En todos los casos el nivel de significación estadística fue $p < 0,05$.

Resultados

Análisis de muestras espermáticas

La [tabla 1](#) muestra la media y la desviación típica de la concentración espermática, el porcentaje de motilidad, la morfología, la reacción acrosómica espontánea y la fosforilación de tirosina de las muestras seminales incluidas. Todas las muestras se clasificaron como normozoospermicas de acuerdo con los valores de referencia de la OMS²⁸.

Valoración de la reacción acrosómica espontánea

Los espermatozoides que presentaban fluorescencia en la región acrosomal se consideraron con el acrosoma intacto, mientras que las células marcadas en la banda ecuatorial o sin marcaje se consideraron como reaccionadas ([fig. 1A](#)). No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de células reaccionadas espontáneamente tras 1 y 4 h de

incubación en medio de capacitación (12,14% vs 17,50%, respectivamente, $p = 0,103$) ([tabla 1](#)). De igual manera, tampoco se encontraron diferencias significativas en la integridad acrosomal de las células en fresco comparadas con espermatozoides incubados con medio de capacitación ($p = 0,198$).

Fosforilación de tirosinas

Se clasificaron como fosforilados los espermatozoides que mostraban fluorescencia total o parcial en el flagelo ([fig. 1B](#)). En espermatozoides en fresco, el 7,72% de las células presentaban tirosina fosforilada en su flagelo. Después de la incubación en medio de capacitación durante 1 h este porcentaje aumentó al 14,26%, mientras que, tras 4 h, este incremento fue significativamente mayor (32,41%) tanto al compararlo con las células en fresco ($p < 0,001$) como con el porcentaje de fosforilación observada tras 1 h de incubación ($p = 0,001$) ([tabla 1](#)).

Inmunolocalización de arilsulfatasa A

La evaluación de ARSA en la superficie de la cabeza del espermatozoide mostró diferencias significativas entre el porcentaje de células con presencia de inmunomarcaje antes y después de 1 h de incubación con medio de

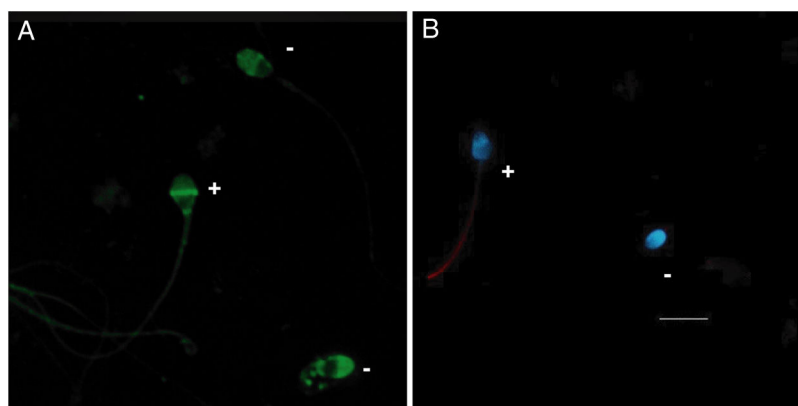


Figura 1 Patrones de fluorescencia observados al analizar la reacción acrosómica espontánea (A) y la fosforilación de tirosinas (B) en células incubadas en condiciones capacitantes. Escala de 10 μ m común para ambas imágenes.

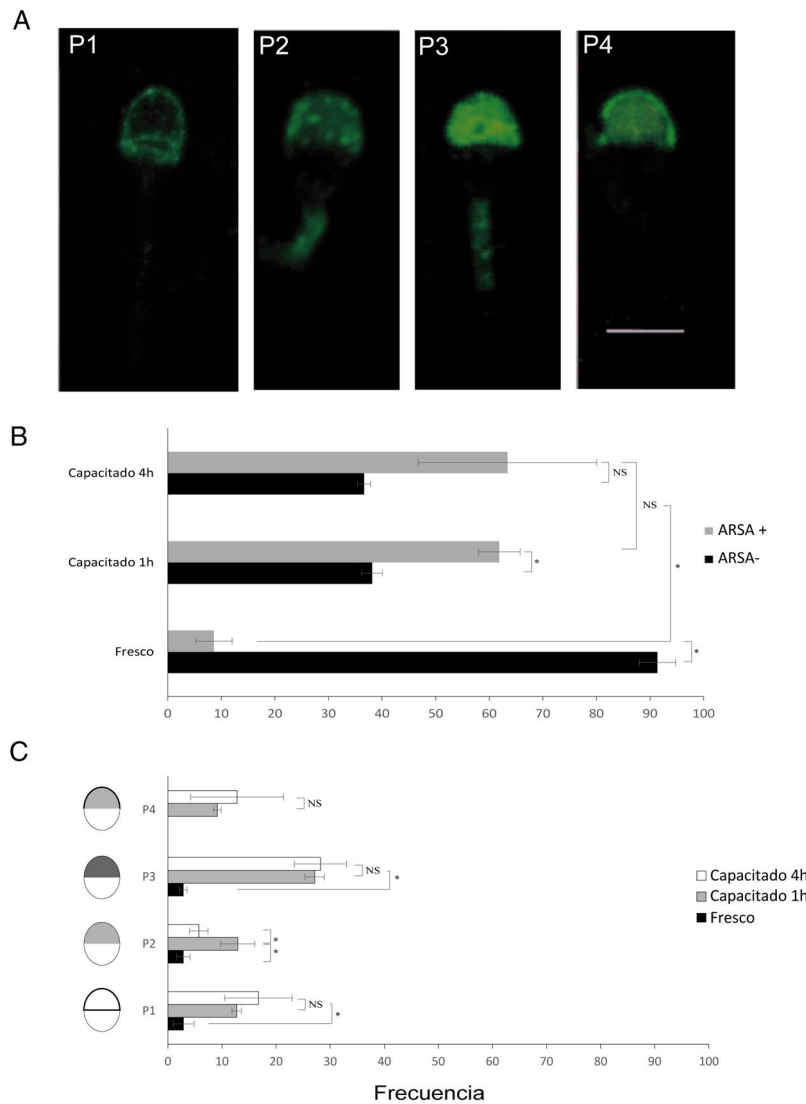


Figura 2 A) Patrones de fluorescencia observados: marcaje en la banda ecuatorial y zona periacrosomal (P1), fluorescencia tenue en la región acrosómica (P2), fluorescencia intensa en la región acrosomal (P3), fluorescencia intensa en la región periacrosomal con un marcaje menos intenso pero homogéneo en toda la región acrosómica (P4). Escala de 10 μ m común a todas las imágenes. B) Frecuencia de células con y sin inmunofluorescencia para ARSA (ARSA+, ARSA–) en cada condición fisiológica. C) Frecuencia de patrones de ARSA en espermatozoides humanos que presentaron inmunofluorescencia para ARSA (ARSA+) en diferentes condiciones fisiológicas.

* Diferencias significativas en $p < 0,05$.

NS: diferencias no significativas.

capacitación (8,61% vs 61,86%, respectivamente; $p < 0,001$). Esta tendencia se siguió observando tras capacitar los espermatozoides durante 4 h (63,38%; $p < 0,001$), aunque sin aumentar de manera significativa con respecto a una hora de incubación. En las células con inmunofluorescencia para ARSA se identificaron 4 patrones principales de distribución de esta proteína en la cabeza de las células espermáticas (fig. 2A): el patrón 1 (P1) se caracterizó por un marcaje en la banda ecuatorial y la zona periacrosomal; el patrón 2 (P2) mostró una fluorescencia tenue en la región acrosómica; el patrón 3 (P3) se expresó como una fluorescencia intensa en la región acrosomal, y el patrón 4 (P4) mostró fluorescencia intensa en la región periacrosomal con un marcaje menos intenso pero homogéneo en toda la región acrosómica.

La comparación de las medias de cada patrón de localización de ARSA en cada uno de los estados fisiológicos (fig. 2B y C) mostró que el porcentaje de P1 aumentó significativamente ($p < 0,005$) con la incubación, desde el 2,89% en células en fresco hasta el 12,72% y el 16,73% en las células capacitadas 1 y 4 h, respectivamente. De la misma manera, P2 aumentó significativamente ($p < 0,001$), del 2,86% al 12,89%, tras 1 h de incubación en medio de capacitación. Sin embargo, cuando se capacitó durante 4 h este patrón disminuyó de manera significativa con respecto a 1 h de incubación, hasta el 5,67% ($p < 0,005$). Independientemente del tiempo de incubación, la localización de ARSA de manera intensa en la región acrosomal (P3) fue el patrón más representativo en las células capacitadas (27,11

y 28,20% 1 y 4 h, respectivamente). Sin embargo, este patrón fue muy poco representativo (2,86%; $p < 0,001$) en las células sin capacitar. Destacar que solo en los espermatozoides capacitados se caracterizó un nuevo patrón, no observado en células en fresco, cuya localización fue en la zona periacrosomal (P4: 9,13% y 12,78% 1 y 4 h, respectivamente).

Discusión

En este trabajo hemos descrito la distribución de la proteína ARSA en espermatozoides humanos antes y después de su incubación en medio de capacitación durante 1 y 4 h. Estos hallazgos sobre la distribución de una proteína de reconocimiento de la ZP tienen implicaciones para el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que subyacen al reconocimiento primario entre gametos, así como una vía para la mejora de la selección espermática en reproducción asistida.

Tras los diferentes tiempos de incubación se valoró la fosforilación de tirosina flagelar, ya que este es uno de los eventos moleculares que ocurren durante la capacitación^{5,14,25}. Nuestros resultados mostraron un aumento de la fosforilación dependiente del tiempo, ya que se observó un mayor número de espermatozoides con tirosina fosforilada a medida que se incrementó el tiempo de incubación. Este incremento concuerda con estudios anteriores que confirman la presencia de fosforilación de tirosina en el flagelo espermático y su aumento dependiente de la capacitación^{14,15,25}.

Al evaluar la presencia de ARSA por microscopía de fluorescencia pudimos observar que antes de la incubación esta proteína se inmunolocalizó en una minoría de células espermáticas, mientras que tras la incubación en medio capacitante, independientemente del tiempo de incubación, ARSA estaba presente en la superficie de más del 60% de los espermatozoides. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados con citometría de flujo en los que se vio un aumento de células con marcaje para ARSA en la superficie espermática tras 3 h de capacitación (5 y 80% antes y después de la capacitación, respectivamente)^{27,29}. A diferencia de nuestro estudio, en estos trabajos de citometría^{27,29} no se pudo mapear la ubicación de ARSA.

En las células con fluorescencia para ARSA se observaron 4 patrones de distribución de ARSA a nivel cefálico en las células espermáticas. Los trabajos previos con esta proteína se han realizado mediante citometría de flujo o comarcaje con otras proteínas^{27,30}, lo que imposibilita la determinación de dichos patrones.

En los espermatozoides antes de la incubación observamos diferentes subpoblaciones espermáticas en lo que respecta a la localización de ARSA. Trabajos previos han caracterizado de igual manera diferentes subpoblaciones de células espermáticas previas a la capacitación con diferentes biomarcadores, como colesterol¹², fosforilación de proteínas³³ o glicoconjugados³⁴. En este último estudio se observó que tras largos periodos de incubación (4 h) la subpoblación celular recuperada fue más homogénea en lo que respecta al glicocáliz³⁴. De igual manera, nosotros observamos que tras la incubación en medio de capacitación se cuantificó un aumento de células espermáticas cuya distribución de ARSA fue homogénea e intensa en todo

el acrosoma, independientemente del tiempo de incubación.

Otro de los patrones observados fue a nivel de la banda ecuatorial y la zona periacrosomal. Esta distribución se observó en alrededor del 12 y del 17% de las células capacitadas (1 y 4 h, respectivamente), siendo estas tasas similares al porcentaje de células reaccionadas de manera espontánea encontradas en estos tiempos de incubación. Estos espermatozoides podrían estar reaccionados, ya que diferentes autores informaron sobre el hecho de que varias proteínas implicadas en la fusión de gametos se reubican en la banda ecuatorial durante la reacción acrosómica de los espermatozoides con el fin de realizar su función tras la desaparición de la membrana plasmática externa^{7,35,36}.

A medida que el tiempo de incubación fue mayor, el porcentaje de células con inmunomarcaje en la región acrosomal y periacrosomal aumentó. A pesar de que este patrón no ha sido el más representativo en espermatozoides tras la incubación en medio de capacitación, es lógico asociar esta distribución con el reconocimiento primario de los gametos, ya que la zona periacrosomal de la cabeza del espermatozoide es la primera en entrar en contacto con el ovocito durante las primeras fases de la fecundación³⁷. Además, otros autores han descrito la colocalización de esta proteína con la chaperona HSPA2 en la zona periacrosomal en espermatozoides capacitados^{27,29}, sugiriendo una posible relación entre esta localización del complejo proteico SPAM1/HSPA2/ARSA y su implicación en el reconocimiento entre gametos.

A partir de los resultados presentados en este estudio se podría deducir que cuando los espermatozoides se incuban con medio de capacitación, independientemente del tiempo, aumenta de manera significativa el número de células con inmunomarcaje para ARSA. De igual manera se observa una tendencia al alza del porcentaje de espermatozoides con una distribución de ARSA a nivel de la zona de interacción con el ovocito tras ambos tiempos de incubación. La presencia de ARSA en la región acrosomal y/o periacrosomal de las células incubadas podría significar que esta proteína desempeñase un papel en el reconocimiento primario del ovocito, siguiendo el modelo propuesto por Redgrove^{26,27,29,32}.

Estos resultados nos llevan a sugerir que ARSA, propuesta por diferentes autores^{27,29,30} como proteína de reconocimiento de ZP, podría ser un biomarcador de capacitación y madurez espermática, ya que los espermatozoides que, tras la incubación en medio de capacitación, no presenten esta proteína en la región acrosomal y periacrosomal no podrán interactuar correctamente con el ovocito^{25-27,29,32}. No obstante, a pesar de la evidente tendencia y de la utilidad que ha demostrado la incubación en medio capacitante durante 4 h con otros biomarcadores^{6,7,22,23,34,38}, para poder recomendar dichos tiempos de incubación a la práctica clínica es necesario seguir ampliando el conocimiento sobre estos eventos moleculares. En este sentido, se realizarán futuros estudios con muestras seminales de pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida para conocer el papel de este receptor en la capacidad fecundante de los espermatozoides, teniendo en cuenta parámetros adicionales como la fragmentación del ADN, la capacidad de unión al ácido hialurónico o la hiperactivación espermática^{39,40}.

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 este 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 de I+D+I ViGrob-186 y UAIND17-03.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Jonge CD, Barratt C. *The Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. New York: Cambridge University Press; 2006.
- Rahman MS, Lee JS, Kwon WS, Pang MG. Sperm proteomics: Road to male fertility and contraception. *Int J Endocrinol*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/360986>.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951;168:697–8.
- Austin CR. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res*. 1951;4:581–96.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD, editores. *The Physiologist of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 189–461.
- De Jonge CJ. Biological basis for human capacitation-revisited. *Hum Reprod Update*. 2017;23:289–99.
- Sáez-Espinosa P, Torrijo-Boix S, Huerta-Retamal N, Avilés M, Aizpurua J, Romero A, et al. Capacitation and acrosome reaction are associated with changes in sialic acid location and head morphometry in human sperm. *Rev Int Androl*. 2018;16:20–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.androl.2017.03.002>.
- Matamoros-Volante A, Moreno-Irusta A, Torres-Rodriguez P, Giojalas L, Gervasi M, Visconti P, et al. Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: The case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*. 2018;24:64–73, <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gax062>.
- Quill T, Sugden S, Rossi K, Doolittle L, Hammer R, Garbers D. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14869–74, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2136654100>.
- Shur BD, Rodeheffer C, Ensslin MA. Mammalian Fertilization. *Curr Biol*. 2004;14:R691–2, <http://dx.doi.org/10.1038/270084a0>.
- Stival C, Puga Molina L, Paudel B, Buffone M, Visconti P, Krapf D. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2016;220:93–106 SpringerVerlag; -L, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7.5>.
- Buffone M, Verstraeten SV, Calamera JC, Doncel GF. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl*. 2009;30:552–8.
- Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;56:334–48.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril*. 1999;71:919–23.
- Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:75.
- Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, Chardonnes D, Campana A, Franken DR, et al. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod*. 2003;68:1463–9.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa 1. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 1995;121:1129–37.
- Khatun A, Rahman MS, Pang MG. Clinical assessment of the male fertility. *Obstet Gynecol Sci*. 2018;61:179–91.
- Barratt CL, Mansell S, Beaton C, Tardif S, Oxenham SK. Diagnostic tools in male infertility — the question of sperm dysfunction. *Asian J Androl*. 2011;13:53–8.
- Oehninger S, Franken DR, Ombelet W. Sperm functional tests. *Fertil Steril*. 2014;102:1528–33.
- Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated? *Oncotarget*. 2017;8:3600–27, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.12274>.
- Ostermeier GC, Cardona C, Moody MA, Simpson AJ, Mendoza R, Seaman E, et al. Timing of sperm capacitation varies reproducibly among men. *Mol Reprod Dev*. 2018;85:387–96.
- Baibakov B, Boggs NA, Yauger B, Baibakov G, Dean J. Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J Cell Biol*. 2012;197:897–905.
- Liu D, Baker H. Defective sperm-zona pellucida interaction: A major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 2000;15:702–8.
- Nixon B, Bromfield E, Dun M, Redgrove K, McLaughlin E, Aitken RJ. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition. *Asian J Androl*. 2015;17:568.
- Bromfield EG, Aitken RJ, Nixon B. Novel characterization of the HSPA2-stabilizing protein BAG6 in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2015;21:755–69.
- Redgrove KA, Nixon B, Baker MA, Hetherington L, Baker G, Liu DY, et al. The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS ONE*. 2012;7, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050851>.
- Organización Mundial de la Salud. World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen 2010.
- Redgrove K, Anderson A, McLaughlin E, O'Bryan M, Aitken RJ, Nixon B. Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human sperm-oocyte recognition. *Mol Hum Reprod*. 2012;19:120–35.
- Carmona E, Weerachatanukul W, Soboloff T, Fluhary AL, White D, Promdee L, et al. Arylsulfatase A is present on the pig sperm

- surface and is involved in sperm-zona pellucida binding. *Dev Biol.* 2002;247:182–96.
31. Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome reacted human sperm. *Gamete Res.* 1986;15:213–26.
32. Bromfield EG, McLaughlin EA, Aitken RJ, Nixon B. Heat shock protein member A2 forms a stable complex with angiotensin converting enzyme and protein disulfide isomerase A6 in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2015;22:93–109.
33. Buffone MG, Doncel GF, Marin Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Calamera JC. Human sperm subpopulations: Relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Hum Reprod.* 2004;19:139–46.
34. Sáez-Espinosa P, Huerta-Retamal N, Robles-Gómez L, Avilés M, Aizpurua J, Velasco I, et al. Influence of in vitro capacitation time on structural and functional human sperm parameters. *Asian J Androl.* 2020;22:447–53.
35. Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci.* 2012;125:4985–90.
36. Okabe M. Mechanisms of fertilization elucidated by gene-manipulated animals. *Asian J Androl.* 2015;17:646–52.
37. Gadella BM. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm. *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 5:12–019.
38. Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, et al. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell.* 2003;5:33–43.
39. Mokánszki A, Molnár Z, Ujjfalusi A, Balogh E, Bazsáné ZK, Varga A, et al. Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients. *Reprod Biomed Online.* 2012;25:620–6.
40. Pregl Breznik B, Kovačič B, Vlasisavljević V. Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertil Steril.* 2013;99:1233–41.