

DESAFÍOS EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA DEL CONEJO COMO MODELO ANIMAL EN REPRODUCCIÓN

El conejo tiene características productivas interesantes como son su alta tasa de reproducción, su crecimiento rápido, la eficiencia en la conversión alimenticia, ocupan menos espacio y tienden a tener un menor impacto ambiental con respecto a otras especies ganaderas más grandes. Además, esta especie presenta un valor añadido como biomodelo animal y, en este contexto, su empleo en las técnicas de reproducción asistida (TRA) les convierte en una herramienta clave para llevar a cabo estudios de investigación tanto básica como aplicada a la especie humana y a otras especies de interés zootécnico. El desarrollo y mejora de las TRA que incluyen la maduración *in vitro* de ovocitos, la capacitación espermática *in vitro*, así como la fecundación *in vitro* (FIV) son esenciales. Aunque los primeros trabajos de capacitación espermática *in vitro* se llevaron a cabo con semen de conejo (Austin 1951; Chang 1951), la eficacia de esta técnica sigue siendo baja y el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el proceso son limitados en esta especie. En este artículo describiremos los acontecimientos que se producen durante la capacitación y resumiremos los avances más importantes de la capacitación de los espermatozoides de conejo.

S. GIMENO-MARTOS^{1,4}, A. VICENTE CARRILLO², D. JORDÁN-RODRÍGUEZ¹, P. L. LORENZO¹, A. GÓMEZ-LEÓN¹, E. CÁCERES-MARTÍN¹, R. M. GARCIA-GARCIA¹, M. ARIAS-ÁLVAREZ², P.G. REBOLLAR³

¹ UCM, Dpto. Fisiología, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro s/n, Madrid, España

² UCM, Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro, Madrid, España

³ UPM, Dpto. Producción Agraria, ETSIAAB, Ciudad Universitaria s/n, Madrid, España

⁴ UNIZAR, Facultad de Veterinaria, C/ Miguel Servet 177, Zaragoza, España



Los espermatozoides se producen en los testículos. Constan de varias partes: cabeza, pieza intermedia y cola. En la cabeza se almacena el ADN paterno empaquetado en el núcleo, así como el acrosoma, lugar donde se almacenan numerosos agentes entre los que se incluyen varias enzimas hidrolíticas y moléculas necesarias para la fecundación. Por otro lado, en la pieza intermedia, acoplada a la cabeza por el cuello, se alojan las mitocondrias, que proporcionan la energía necesaria para poder atravesar el tracto reproductor (TR) de la hembra. Por último, está la cola, que es la parte que favorece el movimiento característico

de esta célula. Los espermatozoides y las secreciones procedentes de las glándulas accesorias o plasma seminal constituyen el semen o eyaculado. Tras la monta, el macho deposita el eyaculado completo en la vagina. Sin embargo, en los mamíferos, los espermatozoides recién eyaculados no tienen capacidad fecundante, la adquieren durante su tránsito por el tracto reproductor femenino mediante el proceso conocido como capacitación espermática, que incluye una serie secuencial de cambios bioquímicos y biofísicos en el espermatozoide (Austin 1951) (Chang 1951). Los fenómenos más relevantes que suceden durante la

capacitación espermática descritos hasta la fecha son: el aumento del pH intracelular, la reorganización de la membrana plasmática debido a la pérdida de colesterol, el aumento de la concentración intracitoplasmática de calcio, y la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en el espermatozoide (revisado por Gadella and Luna 2014). Por otro lado, el tracto reproductor de la coneja presenta una anatomía diferenciada con relación a otras especies ya que es doble, tiene dos oviductos y dos cuernos uterinos individualizados por la presencia de un doble cérvix (**Figura 1**). En el conejo, la monta dura unos

Figura 1. Tracto reproductor femenino de coneja. a) Ovarios; b) Oviductos; c) Unión útero-tubárica; d) Cuernos uterinos; e) Cérvix doble; f) Fondo vaginal. Foto de Sánchez-Rodríguez A.

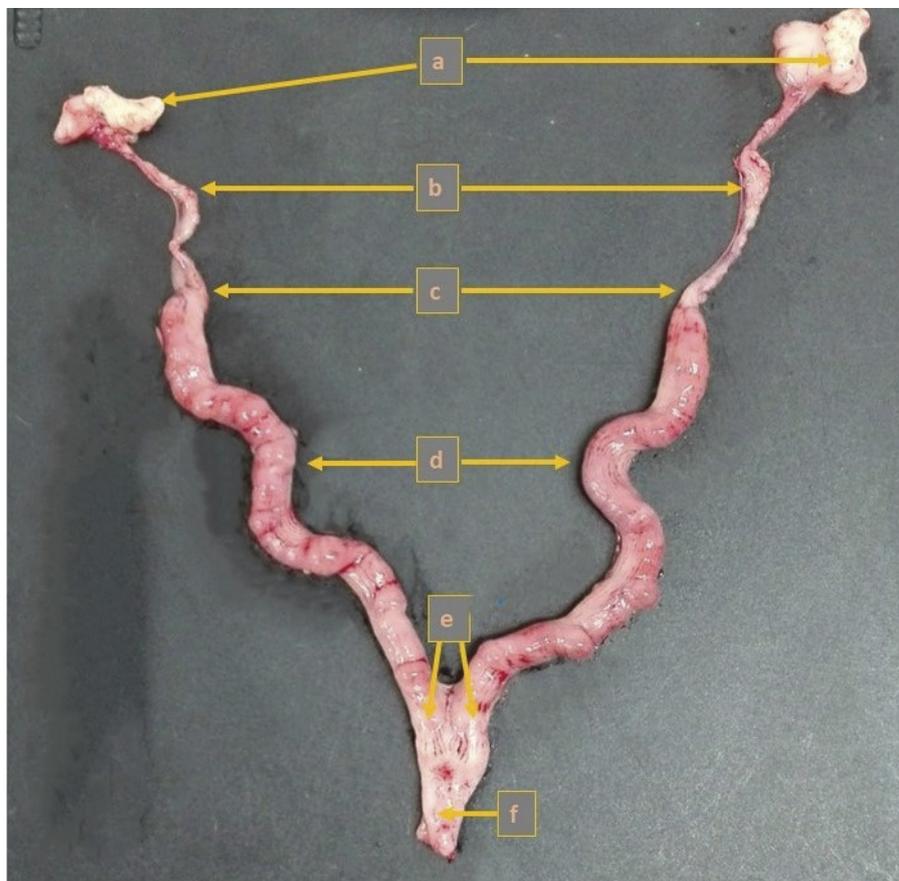
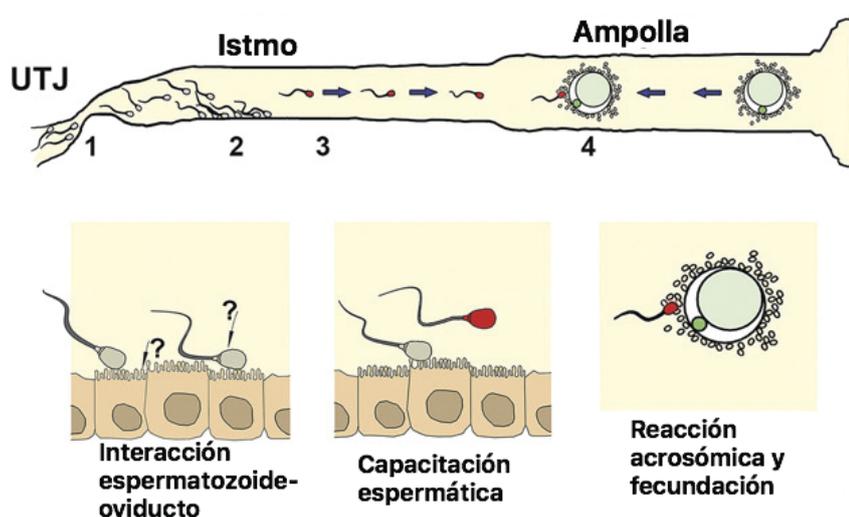


Figura 2. Principales acontecimientos durante el tránsito del espermatozoide por el tracto reproductor femenino: 1) Paso de los espermatozoides del útero al oviducto a través de la unión útero-tubárica (UTJ). 2) Formación del reservorio de espermatozoides en el istmo. 3) Liberación de los espermatozoides capacitados (representados con cabeza roja) del istmo a la ampolla. 4) Reacción acrosómica y fecundación del complejo cúmulo-ovocito por parte de los espermatozoides. Modificada de (Gervasi and Visconti 2016).



EL DESARROLLO Y MEJORA DE LAS TRA QUE INCLUYEN LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS, LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA IN VITRO , ASÍ COMO LA FECUNDACIÓN IN VITRO (FIV) SON ESENCIALES

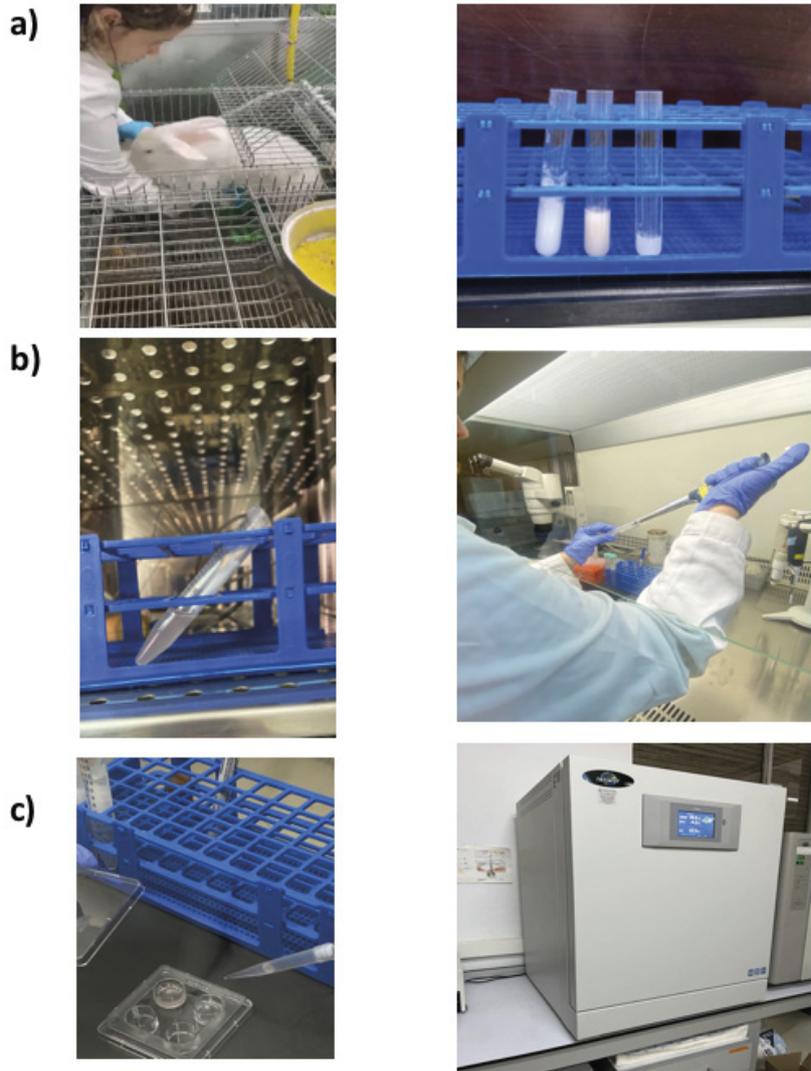
pocos segundos, y el semen se deposita en la entrada de la vagina. Cuando se realiza la inseminación artificial las cánulas profundizan más y el semen se sitúa en el fondo de la vagina. A continuación, los espermatozoides atraviesan uno y otro cérvix, que actúan como primeras zonas de selección espermática en el tracto reproductor femenino, permitiendo que solo los móviles sean capaces de avanzar a través del mucus y formar pequeños reservorios, eliminando a aquéllos de baja calidad (Alghamdi *et al.* 2009). Los espermatozoides llegan a ambos cuernos uterinos, donde entran en contacto con una gran variedad de fluidos y moléculas, los cuales provocarán cambios fisiológicos en ellos. Finalmente, atraviesan la unión útero-tubárica, y alcanzan el oviducto, dónde se crean reservorios de espermatozoides mediante uniones a las células oviductales. En esta zona es donde entran en contacto con diferentes moléculas del fluido oviductal y se produce la capacitación (Figura 2). Este fenómeno fue descrito por primera vez en hámster y conejo (Yanagimachi and Chang 1963) (Figura 2).

Tras la capacitación, se producen otros fenómenos relacionados con la motilidad de los espermatozoides, esenciales para guiarlos con éxito hasta el ovocito. Por un lado, la orientación del espermatozoide en el oviducto parece ser importante para avanzar en la dirección correcta y, hasta ahora, se han descrito tres mecanismos diferentes que la pueden

desencadenar: la termotaxis (Bahat *et al.* 2003; Ruiz-Díaz *et al.* 2023), la reotaxis (Miki and Clapham 2013) y la quimiotaxis (Armon and Eisenbach 2011), cada una de las cuales responde a un estímulo diferente: gradiente de temperatura, flujo de fluido y gradiente de concentración de una sustancia quimiotáctica, respectivamente. En el caso del conejo se ha demostrado la existencia de termotaxis, observándose cambios de temperatura durante la ovulación a lo largo del oviducto (Bahat *et al.* 2005), así como la activación del proceso de quimiotaxis gracias a variaciones en la composición del fluido folicular en el mismo oviducto (Giojalas *et al.* 2004) y en las hormonas producidas por las células del *cumulus* que se expanden alrededor del ovocito (Guidobaldi *et al.* 2008). Además de la orientación espermática, los espermatozoides realizan un cambio en el patrón de movimiento durante su tránsito por el tracto reproductor, proceso conocido como hiperactivación espermática. Este proceso provoca que el espermatozoide pase de batir la cola de forma simétrica a asimétrica, lo que le permite avanzar más fácilmente por el medio viscoso en las cercanías del ovocito. Este movimiento es necesario para poder localizarlo, atravesarlo y que se produzca finalmente la fecundación (Yanagimachi 1970). Por último, y no menos importante, debe llevarse a cabo la reacción acrosómica (RA), proceso de exocitosis que se produce tras la fusión de la membrana acrosomal externa del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, y mediante el cual se liberan las enzimas del acrosoma, que le permiten atravesar la zona pelúcida del ovocito y fecundarlo con éxito (Saling *et al.* 1979). Como ya se ha mencionado, a pesar de que han transcurrido más de 70 años desde que el proceso de capacitación espermática fue descrito, se han evidenciado únicamente parte de los mecanismos moleculares que regulan este proceso gracias a los experimentos *in vitro*. Por todo ello, cuando se pretende realizar una fecundación *in vitro* es necesario emular en el laboratorio el proceso de la capacitación espermática *in vivo* y, por tanto, se emplean una serie de compuestos químicos, similares a los que hay en el oviducto, tales como

Figura 3.

Protocolo estándar de preparación de los espermatozoides de conejo para el proceso de la FIV: a) El semen se obtiene mediante una vagina artificial y se realiza una mezcla heteroespérmica de muestras de varios machos en buen estado para evitar diferencias individuales; b) Se realiza la selección espermática mediante la técnica de *swim-up* en un tubo incubado inclinado 45° en una estufa, recogiendo de la superficie del medio la mitad de la muestra; c) Dicha muestra se incuba en diferentes alicuotas en placas Petri en la estufa en condiciones capacitantes.



altas concentraciones de bicarbonato y calcio, que inducen los efectos mencionados anteriormente, junto con unas condiciones de temperatura, pH, humedad y tiempo, que varían dependiendo de la especie. Así, en algunos animales como el ratón o el hombre, conseguir la capacitación espermática *in vitro* es un proceso relativamente fácil y rápido y se precisan medios de incubación químicamente definidos sencillos. Sin embargo, en el toro, el caballo, el morueco, el hámster dorado o

el conejo, se necesitan medios de incubación químicamente definidos más complejos y un mayor tiempo de capacitación. En el caso particular de los conejos, los estudios sobre capacitación espermática *in vitro* son escasos y muy diferentes entre sí. En 1951 los investigadores C.R. Austin y M.C. Chang, describieron por primera vez y de forma independiente en el conejo como modelo animal, la necesidad de “madurar” los espermatozoides en el tracto reproductor femenino para conseguir

Tabla 1.
Resumen de los estudios de capacitación *in vitro* en espermatozoides de conejo

Tipo de espermatozoide	Medio de capacitación	Tiempo de incubación	Condiciones	Evaluación de parámetros relacionados con la capacitación	Referencia
Eyaculado	Medio definido	12-22 horas	38°C Y 5% CO ₂	FIV <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Brackett <i>et al.</i> , 1982
Epididimario	Medio definido	10 horas	38°C Y 5% CO ₂	FIV <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Niwa <i>et al.</i> , 1983
Eyaculado	Medio definido	6-8 ó 10-12 horas	38°C Y 5% CO ₂	FIV <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Zeng <i>et al.</i> , 1999
Eyaculado	Medio Biggers, Whitten and Whittingham (BWW)	16 horas	37°C Y 5% CO ₂	% de espermatozoides reaccionados tras inducir la RA	Giojalas <i>et al.</i> , 2004; Guidobaldi <i>et al.</i> , 2008
Eyaculado	Medio FERT	6 horas	38,5°C Y 5% CO ₂	FIV <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Arias-Álvarez <i>et al.</i> , 2018
Eyaculado	Medio TALP modificado	4, 8 y 12 horas	37°C Y 5% CO ₂	Tinción clorotetraciclina (CTC) y apoptosis (Anexina V)	Castellini <i>et al.</i> , 2020

fecundar los ovocitos *in vivo*. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo *in vitro* en las décadas de los 70 y 80 utilizando un medio químicamente definido y simple e incubando entre 12 a 22 horas espermatozoides de conejo tanto eyaculados (Brackett and Oliphant 1975; Brackett *et al.* 1982) como procedentes del epidídimo (Niwa *et al.* 1983). Más adelante, Zeng y sus colaboradores en 1999 acortaron las horas de este protocolo (6-8 horas), observando una mejora en la tasa de división de los ovocitos tras la FIV al añadir mayor concentración de bicarbonato al medio (Zeng y Chen 1999).

De manera rutinaria, para los protocolos de FIV en conejos y al igual que en otras especies, se lleva a cabo una mezcla del semen de varios machos para minimizar las diferencias individuales. Posteriormente, se realiza una selección espermática para eliminar el plasma seminal y recoger los espermatozoides más capaces. El protocolo más utilizado y extendido en el conejo para la selección (existiendo otros sistemas), incluye una doble centrifugación para eliminar el plasma seminal y restos celulares, seguido de un periodo de incubación en una estufa en condiciones que imitan las del TR (habitualmente 38,5 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad). Normalmente este proceso se realiza en un tubo inclinado 45°, permitiendo así que los mejores espermatozoides nadan de la parte inferior a la superficie del medio de incubación (proceso también conocido como

A LO LARGO DE LOS ÚLTIMOS AÑOS SE HAN INVESTIGADO MEDIOS PREVIAMENTE UTILIZADOS EN OTRAS ESPECIES CON EL FIN DE MEJORAR EL PROCESO DE CAPACITACIÓN *IN VITRO* DEL SEMEN DE CONEJO

swim-up) y sean recogidos para posteriormente inducir en ellos la capacitación (Brackett *et al.* 1982) (Figura 3).

A lo largo de estos últimos años, se han investigado medios previamente utilizados en otras especies con el fin de mejorar el proceso de capacitación *in vitro* del semen de conejo y, por lo tanto, la FIV (Tabla 1). Entre estos medios se encuentra el medio Biggers, Whitten and Whittingham (BWW), utilizado comúnmente en humanos (Biggers *et al.* 1971), que ha sido ensayado en conejo en un protocolo de capacitación *in vitro* de 16 horas (Giojalas *et al.* 2004; Guidobaldi *et al.* 2008; Saez Lancellotti *et al.* 2010), ya que fisiológicamente, se trata del

tiempo promedio post-ovulación en el que los ovocitos de la coneja se encuentran presentes en el oviducto esperando a ser fecundados. Otro método ensayado para la capacitación *in vitro* del semen de conejo, emplea un medio comúnmente utilizado en bovino, que es el medio FERT (medio TALP modificado) que contiene heparina (Arias-Álvarez *et al.* 2017; Arias-Álvarez *et al.* 2018). La heparina provoca cambios en la motilidad y un aumento en la fosforilación de las proteínas en residuos de tirosina durante la capacitación bovina (Chamberland *et al.* 2001), que son procesos asociados a la capacitación de los espermatozoides. En estos trabajos la capacitación se llevó a cabo durante una incubación de 6 horas. Recientemente, se ha ensayado el mismo medio con distintas horas de capacitación (4, 6 y 8 horas) para mejorar el proceso, encontrándose resultados de capacitación a 6 y 8 h equiparables en términos de viabilidad espermática, motilidad y evidenciando procesos moleculares como la fosforilación en residuos de tirosina, indicadores de la capacitación de los espermatozoides (Gimeno-Martos *et al.* 2023). Este medio (TALP modificado), suplementado con glucosa y Hepes en vez de heparina, también ha sido utilizado para inducir la capacitación *in vitro* en los espermatozoides de conejo, observando cambios asociados a la capacitación tras 8 horas y a la reacción acrosómica tras 12 horas de incubación, sin estudios de FIV (Castellini *et al.* 2020).

En conjunto, los datos de las diferentes investigaciones apuntan a que el espermatozoide de conejo es complejo y difícil de capacitar *in vitro*, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios que profundicen tanto en el medio a utilizar como en el tiempo de incubación necesarios para optimizar el proceso de FIV y, en definitiva, mejorar las TRA en esta especie con la finalidad de que el conejo pueda seguir utilizándose como biomodelo en la investigación de procesos reproductivos básicos y aplicados.

BIBLIOGRAFÍA

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: pilar.grebollar@upm.es