

Uso de Leche Descremada como Diluyente de Semen

Para la preservación espermática, se ha utilizado leche descremada o leche entera, con las cuales el semen es diluido directamente y puede ser almacenado a 4°C o congelado en presencia de glicerol. El uso de leche descremada como diluyente de semen fue descrito inicialmente para la especie bovina, uso que se ha ido modificando con el paso del tiempo, pasando por leche esterilizada (Macpherson, 1960) y pasteurizada. Se han ido añadiendo más componentes a la leche descremada comercial, generándose de esta manera los distintos diluyentes comerciales disponibles en la actualidad. La mayoría de los diluyentes comerciales, se basan en la fórmula descrita por Kenney en 1975 (Samper, 2007).

Ya que la leche descremada (libre de lípidos) es tan eficiente como la leche entera al almacenar semen a 4°C o al congelarlo, los lípidos aparentan no ser el constituyente responsable de la protección espermática entregada por la leche. Los constituyentes de la leche con mayor efecto protector aparentan ser las micelas de caseína. De hecho, se ha demostrado que micelas de caseína aisladas desde la leche pueden proteger semen de potro, chivo, carnero y toro durante su almacenamiento a 4 - 5°C. La leche filtrada, conteniendo sólo lactosa y minerales, no ofrece suficiente protección para los espermatozoides de potro durante su almacenamiento (Bergeron y Manjunath, 2006). Sin embargo, la adición de lactosa a un diluyente que contiene caseína mejora la eficiencia del diluyente durante el congelamiento de semen de toro. De esta manera, la lactosa parece mejorar la eficiencia del diluyente de semen, pero no es suficiente para proteger los espermatozoides por sí sola (Bergeron y Manjunath, 2006; Bergeron *et al.*, 2007).

Los extensores de leche descremada – glucosa contienen glucosa como fuente de energía para el espermatozoide, una variedad de proteínas de leche y carbohidratos que tienen un efecto fisiológico de buffer y protección celular. Pese a que las tasas de preñez pueden verse disminuidas en yeguas inseminadas con semen refrigerado al compararse con semen fresco extendido, existen diferencias inherentes y muchas veces significativas, en la fertilidad del semen preservado. Una de las razones para esta disminución de fertilidad puede ser por cambios prematuros similares al proceso de capacitación, que pueden

disminuir la longevidad espermática por la activación de procesos metabólicos celulares. Se sugiere que los espermatozoides se capacitan de manera prematura al incubarse en un diluyente de leche descremada y en el momento de la inseminación de una hembra pueden no fertilizar el ovocito dado el compromiso de su función. La capacitación previa a la inseminación es detrimental, ya que los espermatozoides tienen disminuida su habilidad para alcanzar el óvulo, penetrar las células del cúmulo y unirse a la zona pelúcida (Pommer *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por Akcay (2008) se demostró que, al mantener espermatozoides almacenados a una temperatura de 4° C, un diluyente en base a leche descremada con glucosa provee buena protección en cuanto a la viabilidad espermática e integridad de membrana, pero no para la motilidad. Por el contrario, al suplementar el diluyente de leche descremada con glucosa con un medio salino (medio de Tyrode), éste es más efectivo en cuanto a mantener la motilidad espermática, presumiblemente por su balance iónico (Padilla y Foote, 1991; Akcay, 2008). Resultados similares fueron obtenidos por Rota *et al.* (2004), quienes compararon tres diluyentes basados en leche descremada, de los cuales el que entregó mejores valores de motilidad y tasa de preñez fue un diluyente suplementado con medio de Tyrode y yema de huevo.

Al comparar la fertilidad de semen de potros, medido como motilidad progresiva, extendidos en solución de leche descremada – glucosa con o sin adicionar medio de Tyrode, no existieron diferencias significativas en la motilidad del semen extendido con solución de Tyrode y un 0% de plasma seminal respecto del semen extendido con 20% de plasma seminal sin adición del medio de Tyrode. De esto se puede concluir que al suplementar con una solución salina un semen extendido en medio de leche descremada–glucosa se puede prescindir del plasma seminal sin alterar las características de motilidad progresiva (Rigby *et al.*, 2001).

Al utilizar un diluyente seminal no basado en leche y almacenar semen a 15°C se obtienen mejores características de motilidad espermática que al mantenerlos almacenados a 4°C o 10°C. Al utilizar diluyentes basados en leche, 4°C es una mejor temperatura para el

almacenamiento seminal que 15°C para mantener características de motilidad. Al incorporar extracto de leche purificado a un extensor de semen libre de leche, la temperatura de almacenamiento de 15°C fue la que mejor mantenía la motilidad espermática (Varner, 2003).

Pommer *et al.* (2002) compararon dos medios para incubar espermatozoides en cuanto a la ocurrencia de reacciones del acrosoma. Ambos medios eran diluyentes comerciales: uno de ellos se basaba en leche descremada adicionada con glucosa (SMG) y el otro estaba compuesto por medio de Tyrode, albúmina, lactato y piruvato (TALP). En el medio incubado con SMG se encontró una mayor proporción de reacciones del acrosoma, siendo también mayor la cantidad de calcio (Ca) intracelular presente en las células espermáticas en ese mismo medio. En ambos medios disminuyó considerablemente la motilidad total y la motilidad progresiva de los espermatozoides, siendo la disminución más marcada al incubar los espermatozoides con un ionóforo de Ca. Esto podría explicarse ya que el medio basado en SMG contiene hasta seis veces más Ca que un medio TALP, aumentando así el influjo de Ca hacia dentro de la célula.

El mecanismo preciso mediante el cual la leche descremada brinda protección al semen durante su almacenamiento se desconoce. Se cree que la leche contiene factores que son capaces de secuestrar las BSP que aumentan el eflujo de colesterol desde la membrana espermática. De esta manera, las BSP se unirían a estos elementos presentes en la leche, disminuyendo la proporción de estas proteínas unidas a la membrana espermática (Bergeron y Manjunath, 2006). En toros se ha demostrado que las micelas de caseína presentes en la leche descremada no se unen a la membrana espermática, sino que se unen a las BSP, previniendo de esta manera su unión con los espermatozoides. Así se evita la pérdida de lípidos desde la membrana espermática, preservando las características de motilidad y viabilidad durante su almacenamiento a 4°C (Bergeron *et al.*, 2007).

Se ha demostrado además un efecto antioxidante ejercido por diluyentes basados en leche descremada sobre el semen. La dilución resultó en un aumento en la actividad de las enzimas GSH, SOD y CAT, que son enzimas antioxidantes que se encuentran presentes

normalmente en el semen equino. El mismo efecto se observó en el plasma seminal diluido con leche descremada, pero no cuando los espermatozoides separados del plasma seminal fueron diluidos. Lo anterior sugiere que existiría una interacción positiva entre el plasma seminal y el diluyente, lo que aumenta la capacidad antioxidante, otorgando así una mayor protección de membrana (Aurich, 2005). Esta interacción positiva entre plasma seminal y diluyente podría sugerir que ocurre un aumento en la peroxidación lipídica, siendo entonces el aumento en la actividad enzimática una respuesta al incremento de daño oxidativo (Kankofer *et al.*, 2005). Este aumento en la capacidad antioxidante no es un efecto netamente del diluyente, ya que este por sí solo carece de actividad antioxidante. Los diluyentes de leche descremada pueden contener cofactores o sustancias adicionales que influyen la capacidad antioxidante de las enzimas. Al remover un 90 – 95% de plasma seminal mediante centrifugación, se logró una compensación de la capacidad antioxidante no enzimática por parte de un diluyente basado en leche descremada – yema de huevo, a diferencia de la protección enzimática que no fue compensada por este diluyente (Bustamante Filho *et al.*, 2009). Esto sugiere que al centrifugar y remover la mayoría del plasma seminal, las enzimas antioxidantes son eliminadas y estas no son compensadas mediante la adición de un diluyente de semen. Esto si ocurre con los antioxidantes no enzimáticos, cuya función se compensa con la adición del diluyente.

El principal problema de los extensores de semen basados en leche o yema de huevo es el hecho de que estos productos biológicos están compuestos por una variedad de sustancias. De esta manera, ellos no pueden ser estandarizados y pueden incluso variar entre lotes de un mismo producto. Además, sólo una determinada fracción puede ser necesaria para los efectos benéficos en la función espermática y otros componentes podrían incluso tener efectos detrimentales (Aurich, 2005; Pagl *et al.*, 2006).

El fraccionamiento de leche por diferentes métodos (microfiltrado, ultrafiltrado, congelado – secado) ha permitido aislar fracciones lácteas purificadas. De las fracciones aisladas, el fosfocaseinato y la β – lactoglobulina han demostrado ser las más efectivas para mantener la longevidad del semen refrigerado (Aurich, 2005). Para la especie caprina, el fosfocaseinato es la fracción purificada que mejor mantiene el potencial fertilizante de sus

espermatozoides (Leboeuf *et al.*, 2003). También se ha desarrollado un diluyente de semen equino que reemplaza la yema de huevo por lecitina de soya (Aurich *et al.*, 2007). La fracción proteica presente en la leche descremada, constituida por caseína, fosfocaseinato y glicopéptidos de caseína, aumentan el número de espermios unidos a la zona pelúcida al incubar espermatozoides junto con ovocitos in vitro (Coutinho da Silva *et al.*, 2004).

Al comparar un diluyente de leche descremada químicamente purificado, conteniendo caseinatos definidos y proteínas de suero, con un diluyente comercial basado en leche descremada, se preservó mejor la calidad del semen refrigerado en cuanto a parámetros de motilidad espermática, velocidad de desplazamiento e integridad de membrana. Esta diferencia se hizo más evidente en cuanto a motilidad espermática al mantener el semen refrigerado por más de 24 horas (Pagl *et al.*, 2006). Incluso diluyentes de semen conteniendo los mismos componentes (caseinatos definidos y proteínas de suero) varían en su capacidad para mantener la fertilidad espermática dependiendo del tratamiento previo al que se sometan, como por ejemplo si vienen constituidos o si su presentación es en polvo para constituir (Aurich *et al.*, 2007).

Dentro de las opciones de diluyente de semen basado en leche descremada, existen diferentes alternativas que varían desde las presentaciones comerciales hasta leche descremada calentada. La mayoría de los diluyentes comerciales se basan en la fórmula documentada por Kenney en 1975 o variaciones de la misma, siendo la alternativa más económica la dilución directa con leche descremada previamente calentada en una proporción mínima de una parte de leche por una parte de semen (Blanchard *et al.*, 2003).

...por Catalina Sandoval.