

**Determination of the Post-Thaw Effect of Microdoses of Menaquinone-4
on Ram Semen**
**Determinación Del Efecto Post Congelación De Microdosis De
Menaquinona-4 En Semen Ovino**

Autores:

Farfán-Alvarado, Karen Dayana
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
Estudiante de la Carrera de Medicina Veterinaria
Cuenca-Ecuador



karen.farfan.51@est.ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0009-0002-8187-158X>

Ing. Alvarado-Alvarado, Juan Carlos
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
Docente
Cuenca-Ecuador



jalvaradoa@ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0000-0002-7240-179X>

Dr. Moscoso-Piedra, Andrés Leonardo
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
Docente
Cuenca-Ecuador

amoscosop@ucacue.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-4017-0165>

Fechas de recepción: 06-JUL-2025 aceptación: 06-AGO-2025 publicación: 30-SEP-2025



<https://orcid.org/0000-0002-8695-5005>

<http://mqrinvestigar.com/>



Resumen

El semen de los ovinos posee en su membrana plasmática una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Su inestabilidad los vuelve precursores para generar especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando un estrés oxidativo (EO) producto del shock térmico y del oxígeno atmosférico, antes y durante la crioconservación. De esta manera aumentan así su sensibilidad al daño inducido por la peroxidación lipídica (LPO), en donde los antioxidantes añadidos vendrían a contrarrestar y proteger. Se propuso el empleo del antioxidante homólogo de la VK, perteneciente al grupo de las MKn, Menaquinona-4 (MK-4) para inhibir estos efectos nocivos y por ello en el laboratorio de reproducción de la Universidad Católica de Cuenca se evaluaron tres microdosis de MK-4 (0.5µM, 1µM y 2µM) y su efecto en el semen ovino después de la congelación. Se pudo observar efectos disímiles en relación al testigo para cada dosis, igualando en algunos casos los parámetros donde la integridad de la membrana a 2µM iguala al Testigo; más en la progresividad la menor dosis 0.5µM obtiene mejores resultados; por lo que se determinó que la variabilidad de efectos de la molécula está relacionada a la falta de la enzima UBIAD1 en las gónadas de los donantes, debido a que la carencia de retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en las células espermáticas imposibilita el aprovechamiento del antioxidante; por lo que la funcionalidad del mismo está directamente relacionado a la disponibilidad enzimática del esperma, lo que justifica la variabilidad de resultados al añadir la molécula.

Palabras clave: PUFA; EO; LPO; ROS; UBIAD1

Abstract

The ovine semen presents particularly high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in its plasma membrane. This composition causes high instability, making sperm cells prone to reactive oxygen species (ROS) formation. Oxidative stress (OS), triggered by thermal shock and atmospheric oxygen during cryopreservation, increases susceptibility to lipid peroxidation (LPO). Antioxidant supplementation acts and reacts as a protective strategy against this damage. This study proposed Menaquinone-4 (MK-4), a vitamin K homolog from the Menaquinone group, as a potential sperm antioxidant. We tested in the Reproduction Laboratory at Universidad Católica de Cuenca three microdoses of MK-4 (0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M) to assess its effect on post-thaw ovine semen. Results showed dose-dependent variability compared to the control. At 2 μ M, membrane integrity parameters were similar to the control. However, the 0.5 μ M dose improved progressive motility. These differences suggest that MK-4 efficacy depends on the enzymatic capacity of sperm cells. The absence of UBIAD1 enzyme in donor gonads, due to the lack of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in sperm cells, limits MK-4 utilization. Therefore, antioxidant performance depends on intracellular enzyme availability. This biochemical limitation explains the inconsistent results across doses. MK-4 may offer cryoprotective benefits under specific cellular conditions, particularly in sperm with active metabolic machinery. Findings highlight the importance of considering enzymatic context when using fat-soluble antioxidants in cryopreservation protocols. Further research is needed to optimize MK-4 concentrations and evaluate its in vivo impact on fertility parameters.

Keywords: PUFA; EO; LPO; ROS; UBIAD1



Introducción

La crioconservación permite conservar material genético de forma segura durante largos periodos de tiempo (Benson et al., 2012), siendo una técnica que permite aumentar el número de crías en la población (Juliani & Henry 2008; Carvajal et al., 2018; Spanner et al., 2024) y donde la inseminación laparoscópica técnica muy eficiente en ovinos nos permite potencializar el mejoramiento genético (Carvajal et al., 2018; Spanner et al., 2024).

Para que estas técnicas sean eficientes se requiere el uso de diluyentes que protejan las células espermáticas de las bajas temperaturas utilizando extender como Triladyl (minitube) permite la preparación de un disolvente en base de yema de huevo y agua ultrapura, que son empleados con el fin de evitar daños en las maniobras de crioconservación (Cueto, et al., 2016). Esto debido a que los espermatozoides de los ovinos poseen una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en su membrana plasmática y que durante la crioconservación al estar expuestos a un shock térmico y al oxígeno atmosférico, aumentan la sensibilidad al daño inducido por la peroxidación lipídica (LPO) (Bansal & Bilaspuri 2011).

Este fenómeno conocido como estrés oxidativo (EO) reduce la calidad del semen, y se da cuando la aparición de “especies reactivas de oxígeno” (ROS) es mayor que la capacidad antioxidante de la célula, dando como resultado un daño en la membrana celular asociado a la LPO, provocando cambios en la fluidez e integridad de los espermatozoides, perjudicando de manera directa a la membrana plasmática y generando una capacidad reducida de motilidad y viabilidad (Kaltsas, 2023). En conclusión, un alto contenido de ácidos grasos, una deficiencia de enzimas antioxidantes intracelulares y una capacidad limitada para reparar el ADN son razones por las que los espermatozoides de los carneros son susceptibles al EO (Khosravizadeh et al., 2022).

En base a esto es importante la reducción de los efectos adversos como la hipertonicidad extensora, cristalización de hielo y peroxidación, cuando se emplean procesos de congelación y descongelación. (El-Seadawy et al. 2022), y por ello se utilizan ciertos dilutores comerciales para mejorar la capacidad de los mismos, no obstante, conociendo la susceptibilidad de los mismos se usa antioxidantes o llamados también captadores de radicales libres que ayudan a mejorar las funciones celulares, que según el origen se clasifican



en dos tipos: exógenos (carotenoides) y endógenos (enzimáticos o no enzimáticos) (Ortega 2021); donde los antioxidantes añadidos vendrían a suplir la capacidad de reducir la LPO en los medios (Arando 2019), y donde la Menaquinona-4 (MK-4) sería un aditivo enzimático que funciona de forma endógena, no carotenoide.

Bajo este contexto, esta investigación propuso la hipótesis de que la variación en los parámetros cualitativos y cinéticos del semen ovino, adhiriendo MK-4 en tres diferentes microdosis, nos permitiría establecer la dosis óptima del uso de la molécula, anticipando que dicha molécula (antioxidante) reduzca el estrés oxidativo garantizando así la viabilidad de los espermatozoides para poder crioconservar el semen y lograr que estos sean viables.

Donde el objetivo primordial es cuantificar la calidad espermática post congelación dosificada con tres microdosis de MK-4, estableciendo la variación cualitativa sobre la permeabilidad de la membrana y la cinética del semen. El mismo estudio no solo busca determinar sus efectos, sino también, establecer la dosis óptima del antioxidante para perfeccionar el empajillado y que el semen de los pequeños rumiantes se pueda crioconservar garantizando la viabilidad y vitalidad de los espermatozoides.

Para esto tenemos que considerar que la vitamina K (VK) es un micronutriente esencial liposoluble, presente de dos formas: vitamina K1 o filoquinona, encontrándose en los vegetales y en sus aceites, mientras que la vitamina K2 o menaquinonas son sintetizadas por bacterias presentes en carnes, lácteos y alimentos fermentados. Cabe recalcar que la K1 es la forma dietética más predominante en nuestro medio (Walther et al. 2013).

A partir de esto tenemos que las células poseen mitocondrias, orgánulos de doble membrana esenciales para el metabolismo energético celular. En su membrana interna, estas estructuras contienen cinco complejos enzimáticos; los complejos I-IV conforman la cadena de transporte de electrones (ETC) (Toki et al., 2022), cuya función es generar un gradiente de protones responsable del potencial de membrana mitocondrial (PMM). Este potencial es utilizado por el complejo V (ATP sintasa) para la síntesis de ATP, proceso fundamental para mantener la viabilidad celular. Sin embargo, como subproducto de esta actividad metabólica, las mitocondrias generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que, en condiciones de sobreproducción, inducen el estrés oxidativo (EO), disfunción mitocondrial y depleción energética (Wang et al., 2008).



Nakagawa (2013), en su estudio demostró que la MK-4, una forma lipofílica de la VK, puede sintetizarse endógenamente a partir de otros homólogos de vitamina K de manera biológica. Este proceso sucede por la enzima biosintética UBIAD1, cuya importancia ha sido confirmada a través de modelos experimentales, como en el pez cebra, donde se evidenció que mutaciones en el gen que codifica dicha enzima, generan defectos en la angiogénesis. Además, se observó que la suplementación con MK-4 puede contribuir a corregir esta anomalía, lo que sugiere un papel conjunto de UBIAD1 y MK-4 en procesos vasculares, también, que esta enzima en realidad es CQ10. Asimismo, se identificó que la MK-4 actúa como cofactor de la enzima γ -glutamyl carboxilasa (GGCX) e induce la expresión del receptor X de esteroides (SXR), aplicándose así en la regulación transcripcional.

Mientras que, Toki et al., (2022) en su estudio realizado en células de ratón, reveló que la menahidroquinona-4 (MKH) se encuentra altamente distribuida en el cerebro pero en su forma de MK-4. Menciona también que la MK-4 no puede actuar como cofactor de (GGCX) sin que se haya reducido a MKH la cual funciona como un eliminador de ROS mitocondrial. La MKH es administrada para reducir la MK-4 exógena, y también por la biosíntesis de VK mediante la enzima UBIAD1. Por ello diseñaron y sintetizaron dos derivados de éster de MKH y MK-4, denominados MKH-DMG (menadiol-4-bis-N,N-dimetilglicinato) y MKH-SUC (menaquinona-4 succinil) con el fin de facilitar su administración y mejorar su biodisponibilidad en el sistema nervioso central. Además, integraron rotenona (ROT), un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones (ETC), para evaluar el efecto protector de estos compuestos frente a la disfunción mitocondrial inducida experimentalmente. Los resultados indicaron que estos ésteres de MKH podrían representar una estrategia terapéutica eficaz para combatir el estrés oxidativo y preservar la integridad mitocondrial.

En este contexto, los estudios coinciden en que la MK-4 se encuentra altamente concentrada en el cerebro en su forma reducida de MKH, donde desempeña funciones neuroprotectoras, particularmente frente al daño inducido por ROS siendo un coadyuvante en las enfermedades neurodegenerativas como, Parkinson, Alzheimer, etc.

En las mesetas andinas situadas a 3 600 m, la hipoxia y el estrés oxidativo, sanguíneo y seminal comprometen la eficiencia reproductiva ovina y deterioran parámetros espermáticos



clave Cofré et al. (2018) trasladaron carneros nativos y provenientes de baja altitud a 3 600 m durante cuatro días, registrando un aumento de biomarcadores de estrés oxidativo en sangre y líquido seminal, así como reducciones significativas en el volumen eyaculado, la concentración espermática, la motilidad progresiva y la viabilidad celular. La suplementación oral diaria con vitamina C y vitamina E durante treinta días previno dicho deterioro y produjo incrementos en volumen seminal, concentración de espermatozoides, motilidad progresiva y viabilidad, por lo que los autores postulan que la administración de estos antioxidantes constituye una estrategia sencilla y económica para mejorar la calidad seminal de carneros expuestos temporalmente a grandes altitudes.

Material y métodos

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Cuenca situada en la provincia del Azuay, Cuenca Ecuador. El grupo experimental consistió en 8 muestras de eyaculado de un carnero de raza Katahdin, de fertilidad probada colectadas dos veces por semana. Cada eyaculado se dividió en 4 alícuotas donde se les agregaron tres microdosis del antioxidante, MK-4 (0.5 uM, 1.0 uM, 2.0 uM) más un grupo testigo (T) sin el producto, que fueron congeladas y evaluadas a las 24 horas después de cada proceso de crioconservación.

Para la colecta del semen, se utilizó una vagina artificial (*IMV technologies*) de ovino y una cordera maniquí, para provocar la monta que fue condicionada en el macho. El semen fue colectado en un tubo falcón de 15ml y fue llevado de manera inmediata al Laboratorio de Reproducción Animal cubriéndolo de los rayos ultravioleta.

Se evaluaron las características macroscópicas del semen fresco, obteniendo: un volumen promedio de $1,2 \pm 0,2$ ml (en cada colecta), de color blanco lechoso, olor neutro y libre de impurezas. Se evaluó las características microscópicas, obteniendo una motilidad masal mayor al 80% y una concentración espermática entre 4000×10^6 esperm./ml a 4500×10^6 esperm./ml. Cuantificado por un fotómetro SMD (Minitube) para ovinos.

Para la predilución se trabajó con extender Triladyl® (Minitube), donde su fórmula se basa principalmente en la agregación de yema de huevo, atribuyéndole propiedades protectoras



gracias a su alto contenido de lipoproteínas y fosfolípidos que estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide. Además, contiene el buffer TRIS (tris-hidroximetil aminometano), ácido cítrico, fructosa, agua bidestilada, glicerol como crioprotector penetrante, junto con un grupo de antibióticos que previenen la contaminación bacteriana. Protegiendo al espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación, estabilizando el pH que además aporta nutrientes energéticos como azúcares que favorecen la motilidad espermática, y ha demostrado ser más efectivo que otros extender (sintéticos) de origen vegetal al preservar la viabilidad, integridad de la membrana, motilidad y pH post congelación del semen ovino (Paucar et al., 2025).

Realizando una dilución inicial 1:1 (1 parte del volumen total de la muestra obtenida de semen puro y 1 parte del mismo volumen del diluyente), y finalmente, aforando en una dilución final (solución madre) con el mismo producto.

El semen se envasó en pajillas de 0.25 ml (I.M.V.) y su congelación se realizó mediante el congelador (*Freeze Control Cryobath CL5500*). aplicando el programa 6, específicamente diseñado para semen ovino/caprino, arrancando con una temperatura de 20°C. La temperatura se redujo progresivamente a 10°C en 30 minutos, y luego a -50°C en los siguientes 90 minutos. El proceso concluyó con una caída libre de temperatura hasta alcanzar los -130°C. Finalmente, las pajillas se resguardaron en un termo de nitrógeno líquido MvE 20 a -196 °C

Las evaluaciones de las mismas se realizaron 24h post congelación. Para la correcta descongelación, las pajillas fueron colocadas en baño maría a 37°C durante 40s. Finalmente, para las evaluaciones del semen con antioxidante (MK0.5=0.5 µM, MK1=1.0 µM, MK2=2.0 µM) y testigo (T), que fueron analizados mediante: *Análisis del sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis)* observando varios parámetros espermáticos entre estos, los espermatozoides progresivos (PR), no progresivos (NP), inmóviles (IM), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), velocidad lineal (VSL), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), amplitud lateral de la cabeza (BCF) y frecuencia de batida (BCF), además de evaluar su viabilidad e integridad de la membrana.

Para las evaluaciones de Análisis de la viabilidad espermática, se emplearon las siguientes tinciones: Tinción de *Eosina Nigrosina*, se utilizó el método tradicional, colocando 3µL de



la tinción y 3µL de la muestra seminal sobre un portaobjeto,(frotis) dejando reposar aproximadamente 5 min.

Evaluación de la *Integridad funcional de la membrana (Host)*, se utilizó 100 µL de la solución, incorporando 20 µL de la muestra seminal en un tubo eppendorf la cual permaneció en la platina térmica a 37 °C, durante 45 minutos para su evaluación fue con ayuda del microscopio Olympus BX51 (40x).

Tinción de *Yoduro de Propidio*, se desarrolló utilizando 1 µL de tinción junto a 50 µL de la muestra seminal, reposando durante 5 minutos sobre la platina térmica y protegiéndola de la luz, las evaluaciones con dicha tinción fueron con ayuda de un microscopio de fluorescencia (lente de 40x y con el filtro número 2).

Evaluación con *Rodamina* se utilizó 3µL de la solución y 50µL de la muestra seminal, dejando en reposo durante 15 minutos en platina térmica, se evaluó en un microscopio de fluorescencia (lente de 40x y con el filtro número 3). Mencionando que, para cada una las evaluaciones se realiza un frotis, además, se observó distintos campos para realizar un conteo de 100 células espermáticas determinando cada uno de los porcentajes.

Una vez establecido la normalidad de los datos, los análisis estadísticos se realizaron con el programa Jamovi (The Jamovi Project, 2024), bajo un ANOVA en base de un diseño completamente al azar, bloqueado por repeticiones.

Resultados

Se puede observar en la Tabla 1, la evaluación de la viabilidad y la cinética del semen, donde los valores inferiores a $p=0,05$; presentan diferencias estadísticas entre los tratamientos y se destacan a continuación:

Con relación a la prueba de viabilidad de Host se puede observar que al aumentar la dosis de menaquinona estos se disminuyen significativamente con respecto al grupo T (32,63%+/- 11,89), siendo el valor de la MK2 (13,00+/-10,08) el inferior.

En la prueba de la funcionalidad mitocondrial medida con Rodamina, se observó un aumento progresivo con MK 0.5 (38,80%) hasta MK 2 (63,14%), lo que refleja un incremento en la actividad mitocondrial. Sin embargo, el grupo T presentó un valor intermedio (49,63%), sugiriendo así que al aumentar la dosis de MK-4, (MK1) y (MK2) mejoran la funcionalidad

mitocondrial respecto al control, aunque este incremento podría no traducirse directamente en mejor movilidad, sino más bien en un incremento del metabolismo mitocondrial.

La velocidad curvilínea (VCL) fue significativamente menor en MK1 y MK2 (45,41 y 32,47 $\mu\text{m/s}$ respectivamente), en comparación con el control (69.43%), indicando una reducción en la fuerza y energía del desplazamiento.

Por otra parte, se redujo significativamente la velocidad promedio del movimiento espermático (VAP) en los grupos tratados. MK2 presentó el valor más bajo (15.46%), frente al control (42.29%).

La velocidad lineal (VSL) también se vio afectada negativamente por el tratamiento. MK2 mostró un promedio de 9.00%, mucho menor que los 30,33% del grupo T.

Se identificó una disminución significativa en la rectitud del movimiento (STR), con valores inferiores en MK2 (49.53%) frente al grupo T (62.68%).

De forma similar, la linealidad del desplazamiento (LIN) disminuyó significativamente en los grupos tratados, siendo más notorio en MK2 (22,13%) frente al grupo T (39,56%).

Los valores de amplitud lateral de la cabeza (ALH) fueron más bajos en MK2 (1,09%) comparado con el grupo T (1,75%), indicando una menor oscilación de la cabeza espermática, lo cual se asocia con menor energía motriz.

Se observó una disminución significativa en la frecuencia de batido de la cola (BCF), siendo más pronunciada en MK2 (2,27%) en comparación con el grupo T (10,47 %), lo que refleja una marcada reducción en la actividad flagelar.

Tabla 1. Viabilidad y cinética de la espermática.

Variabl e	MK 0.5	MK 1	MK 2	T	Valor p	Valor p (rep)
Eosina	62,25 ± 25,78	56,50 ± 24,53	54,63 ± 25,49	64,75 ± 27,09	0.52	0.001
Host	17,25 ± 7,05 ^a	15,50 ± 5,32 ^a	13,00 ± 10,0 ^a	32,63 ± 11,89 ^b	0.00	0.163

Yoduro	58,29	± 74,88	± 77,71±	84,88	± 0.08	0.001
	16,81	29,58	42,13	27,18	1	
Rodami	38,80 ± 6,69 ^a	59,14±10,7	63,14±24,	49,63	± 0.00	0.003
da		8 ^{bc}	3 ^c	13,47 ^{ab}	4	
P	17,94	± 13,95	± 7,92	± 29,06	± 0.00	
	7,33 ^b	8,68 ^{ab}	2,78 ^a	12,22 ^c	1	0.037
NP	39,89	± 34,82	± 17,00	± 51,33	± 0.01	
	17,38 ^b	20,92 ^b	9,42 ^a	13,44 ^b	7	0.253
INM	38,48	± 51,23	± 75,08±11,	8,45 ± 8,84 ^a	0.00	
	26,72 ^b	28,59 ^b	9 ^c		1	0.179
VCL	59,85	± 45,41	± 32,47	± 69,43	± 0.00	
	25,86 ^b	21,34 ^a	6,99 ^a	27,61 ^b	1	0.001
VAP	34,48	± 24,25	± 15,46	± 42,29	± 0.00	
	17,70 ^b	12,44 ^a	4,47 ^a	17,92 ^b	1	0.001
VSL	23,87	± 15,19	± 9,00	± 30,33	± 0.00	
	14,65 ^b	8,92 ^a	3,64 ^a	13,92 ^b	1	0.001
STR	57,97	± 52,77	± 49,53	± 62,68 ± 6,58 ^c	0.00	
	9,82 ^{bc}	11,22 ^{ab}	6,34 ^a		2	0.002
LIN	32,67	± 27,76	± 22,13	± 39,56 ± 8,90 ^c	0.00	
	10,55 ^{bc}	11,11 ^{ab}	6,51 ^a		3	0.071
ALH	1,63 ± 0,04 ^{bc}	1,39 ± 0,50 ^b	1,09	± 1,75 ± 0,48 ^c	0.00	
			0,19 ^a		1	0.001
BCF	8,06 ± 6,65 ^c	4,96 ± 3,38 ^b	2,27	± 10,47 ± 4,67 ^c	0.00	
			1,32 ^a		1	0.001

*Diferencias estadísticas entre grupos (p<0,05)

El efecto de los antioxidantes se puede observar en los Progresivos (P), donde el T tuvo un 29.06% y conforme la dosis fue incrementando este fue disminuyendo. Al aplicar microdosis del antioxidante se observó una marcada reducción de su viabilidad, cayendo a 7.92%, en el MK2.



En cuanto a los no progresivos (NP), que representaban un 51.33% en el grupo T, también experimentaron un descenso notable, alcanzando un 17% con el uso del antioxidante MK2. Por otro lado, la porción de espermatozoides inmóviles (INM) se vio drásticamente afectada, incrementándose del 8.45% T a 75.08% con el tratamiento MK2, reflejándose en estos valores una baja significativa en la motilidad.

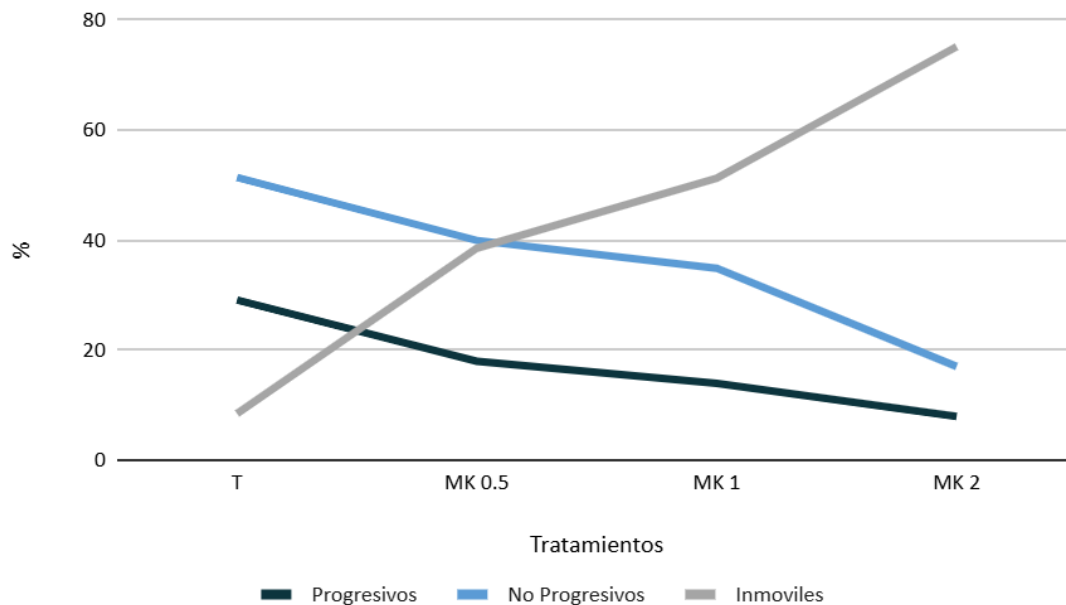


Figura 1. Efecto del Antioxidante en la Progresividad Espermática

Para las evaluaciones del comportamiento espermático en relación con los antioxidantes, se realizaron diversas pruebas como Eosina-Nigrosina reveló que, que el grupo (T) inició con un 64.75% de viabilidad, la aplicación del antioxidante MK2 provocó un descenso a 54.63%, lo que sugiere una reducción en la población de espermatozoides viables. Por su parte, la prueba de Yoduro de Propidio, que evalúa la integridad de la membrana plasmática, mostró que el grupo T presentó un 84.88% de espermatozoides con membranas comprometidas; sin embargo, con el antioxidante MK0.5 este porcentaje descendió notablemente a 58.29%, indicando una mejora en la integridad de la membrana. En cuanto a la Integridad Funcional de la Membrana mediante la prueba HOST, el grupo T inició con un 32.63% de espermatozoides funcionalmente intactos, pero este valor se redujo drásticamente a 13% con la adición de los antioxidantes MK2, este valor es un indicador del impacto negativo en esta función vital. Finalmente, la evaluación de la Integridad y Potencial de la Membrana

Mitocondrial con Rodamina mostró que, mientras el grupo T registró un 49.63%, la incorporación del antioxidante MK2 incrementó significativamente este porcentaje a 63.13%, lo que denota una mejora en la actividad mitocondrial de los espermatozoides.

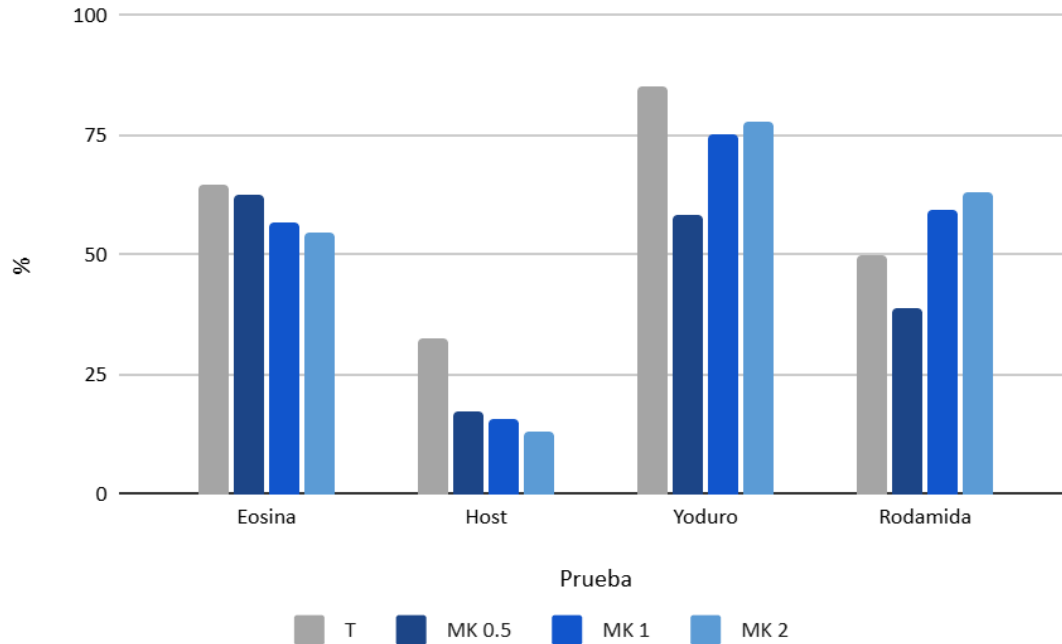


Figura 2. Viabilidad e Integridad funcional de las membranas espermáticas.

Los resultados obtenidos evidencian que la administración de MK-4 generó efectos mixtos sobre la viabilidad y la cinética espermática. A nivel de viabilidad, se observó una disminución significativa en la funcionalidad de la membrana plasmática evaluada mediante la prueba hipo osmótica HOST, especialmente a concentraciones más altas MK2 los valores oscilaron entre $13,00 \pm 10,08$ frente a espermatozoides funcionalmente intactos del grupo T $32,63\% \pm 11,89$, lo cual sugiere un deterioro funcional clave para la supervivencia espermática y su capacidad de fertilización. En contraste, la funcionalidad mitocondrial medida con Rodamina incrementó su efecto estimulante positivo al aumentar la dosis de MK-4. El grupo T presentó valores intermedios de $49,63 \pm 13,47$, mientras que los grupos tratados con MK0.5, MK1 y MK2 alcanzaron $38,80 \pm 6,69$, $59,14 \pm 10,78$ y $63,14 \pm 24,35$, respectivamente.

En cuanto a la cinética, se registró una disminución significativa en la velocidad curvilínea (VCL), velocidad promedio (VAP), y velocidad lineal (VSL), así como en la rectitud (STR),

linealidad (LIN), amplitud lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de la cola (BCF). La proporción de espermatozoides progresivos y no progresivos disminuyó drásticamente, mientras que los inmóviles aumentaron considerablemente, siendo más evidente en el grupo MK2. Estos resultados indican que, aunque la MK-4 mejora ciertos aspectos estructurales mitocondriales, su efecto a nivel funcional y de motilidad espermática resulta perjudicial en dosis más altas, comprometiendo la capacidad fecundante del esperma.

Discusión

En base a los resultados obtenidos, la presencia de MK-4 se esclareció mediante las investigaciones realizadas por Nakagawa (2013) y Toki et al., (2022) en sus estudios experimentales realizados en células fibroblastos de ratón que demostraron que la MK-4 está presente en cada una de las células de todos los tejidos del cuerpo, principalmente el cerebro, encontrándose a partir de la forma de K1. Por ello, según Nakagawa (2013), la MK-4 se origina a partir de homólogos de VK, tanto por la ingestión exógena como por síntesis endógena a partir de las menaquinonas (MK-n) mediante la enzima UBIAD1, demostrándose que la MK-4 actúa como cofactor del GGCX e induce a la expresión genética del SXR entendiendo así que MK-4 tiene un papel importante como coadyuvante en enfermedades neurodegenerativas, reduciendo las ROS.

Por otro lado, Toki et al., (2022) explican que la MK-4 no es quien actúa como cofactor del GGCX hasta que no se haya reducido (sintetizada) a su forma activa a MKH, mediante la enzima UBIAD1 que se encuentra en el retículo endoplasmático y en la mitocondria. Siendo esencial porque regula la formación local de MK-4 en tejidos específicos, como el cerebro o las células de NIH3T3 como lo determinaron dichos autores, permitiendo así que la célula tenga acceso a MK-4 y que esta sea posteriormente reducida a MKH, para ejercer su función antioxidante. Siendo la MKH quien elimina las ROS mitocondriales, protegiendo así la integridad funcional de estas organelas.

La MKH actúa cediendo electrones a los radicales libres, transformándolos en moléculas menos reactivas. Específicamente, inhibe la peroxidación lipídica de membranas, protege el ADN mitocondrial y preserva la integridad mitocondrial, lo cual se traduce en mayor viabilidad celular y menor muerte inducida por EO.



En lo que respecta al sistema gonadal de los ovinos no hay estudios que evidencien que MK-4 está presente en los espermatozoides, mientras que en el sistema gonadal de ratas Wistar, Ito et al., (2011) revelaron que la MK-4 está presente en varios tejidos incluyendo los testículos de estos mamíferos. Mismos que se les fueron otorgados por 5 semanas, de forma exógena MK-4, esclareciendo así que la MK-4 estimula la producción de testosterona en células tumorales del testículo a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA).

En una segunda investigación de Nakagawa et al., 2014 demostró que la enzima UBIAD1 es la única responsable de producir MK-4 en los tejidos de los ratones. De hecho, eliminar completamente la enzima UBIAD1 resulta en la muerte del embrión. Aunque la suplementación oral con MK-4 o CoQ10 (una coenzima) solo logró rescatar parcialmente a los embriones, esto sugiere que UBIAD1 tiene un papel crucial en el desarrollo embrionario a través de la producción de MK-4.

Respecto a su utilidad de MK-4 como antioxidantes, en la mosca *Drosophila* la VK funciona como cadena transportadora de electrones (ETC) mitocondrial durante la producción de ATP. Respecto a la enzima UBIAD1, ésta es catalizadora de la biosíntesis no mitocondrial de CoQ10 en células de pez cebra y humanas. Mientras que la UBIAD1, es una enzima biosintética de MK-4 localizada en varias bases subcelulares: retículo endotelial, complejo de Golgi y mitocondrias. Determinando así porque en este estudio experimental la MK-4 mejora el ATP mitocondrial de los espermatozoides afectando en la viabilidad y cinética de los mismos.

Los resultados indican que la MK-4 no ejerció un efecto antioxidante directo, ya que no fue convertida en MKH, su forma reducida y activa como captadora de radicales libres Toki et al., (2022). No obstante, se observó una mejora en parámetros relacionados con la funcionalidad mitocondrial, como la síntesis de ATP. Esto sugiere que la MK-4 podría haber actuado estabilizando la membrana mitocondrial y favoreciendo el mantenimiento del potencial transmembrana, sin requerir su reducción a MKH. Sin embargo, este aumento en la actividad mitocondrial no se tradujo en una mejora de la viabilidad de la cinética espermática; al contrario, ambos parámetros se vieron comprometidos. Esto podría deberse a un aumento concomitante del estrés oxidativo, alteraciones en la membrana plasmática o desbalances iónicos derivados de la incorporación de MK-4 en otras estructuras celulares

Nakagawa et al., en sus dos estudios 2013, 2014. Así, se concluye que, en espermatozoides maduros, la MK-4 puede actuar como modulador bioenergético, pero no necesariamente como protector antioxidante.

Conclusiones

La MK-4 no mejora la viabilidad y cinética de los espermatozoides maduros al aplicarse directamente, actuando catabólicamente en las mitocondrias. Debido a que los espermatozoides carecen de los organelos (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) donde la MK-4 junto con la enzima UBIAD1 mediante la síntesis, generan su forma activa antioxidante MKH. Aunque esta conversión ocurre en otras células, la ausencia de dicha maquinaria en los espermatozoides maduros limita su capacidad antioxidante. Por lo tanto, la MK-4 no ofrece los mismos beneficios observados en otros tejidos cuando se aplica a espermatozoides ya diferenciados.

Referencias bibliográficas

- Arando, A. (2019). *Nuevas estrategias para la criopreservación de esperma ovino mediante el uso de antioxidantes, gradientes y vitrificación* [Tesis de Doctorado, Universidad de Córdoba]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=236379>
- Bansal, Amrit Kaur & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*, 686137. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Benson, JD., Woods, EJ., Walters, EM. & Critser, JK. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8). 10.1016/j.theriogenology.2012.06.007
- Carvajal-Serna, M. Cortés-López, HA. Manrique-Perdomo, C. Grajales-Lombana, HA. (2018). Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Rev. Med. Vet.*, 18, 49-61. <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5171>
- Cofré, E., Peralta, O. A., Raggi, A., De Los Reyes, M., Sales, F., González-Bulnes, A., & Parraguez, V. H. (2018). Ram semen deterioration by short-term exposure to high altitude is prevented by improvement of antioxidant status. *Animal*, 12(5), 1007-1014.

Cueto, MI, Gibbons, AE Bruno Galarraga, MM. & Fernandez, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino* (Vol. 22). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/106147>

El-Seadawy, IE., Kotp, MS., El-Maaty, AMA., Fadl, AM., El-Sherbiny,HR. & Abdelnaby, EA. (2022). The impact of varying doses of moringa leaf methanolic extract supplementation in the cryopreservation media on sperm quality, oxidants, and antioxidant capacity of frozen-thawed ram sperm. *Tropical Animal Health and Production*, 54(344). <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03344-y>

Juliani, G & Henry, M. (2008). Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozóides eqüinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60, 1103-1109. <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/CKCvVygSYySRBhsdPqMpnxN/?format=pdf>

Kaltsas, A. (2023). Oxidative Stress and Male Infertility: The Protective Role of Antioxidants. *Medicina*, 59(1769). <https://doi.org/10.3390/medicina59101769>

Khosravizadeh, Z., Khodamoradi, K., Rashidi, Z., Jahromi, M., Shiri, E., Salehi, E. & Talebi, A. (2022). Sperm cryopreservation and DNA methylation: possible implications for ART success and the health of offspring. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 39(8). <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02545-6>

Nakagawa, K. (2013). Biological Significance and Metabolic Activation of Vitamin K, *Yakugaku Zasshi* 1, 133(12). <https://doi.org/10.1248/yakushi.13-00228-1>

Nakagawa, K., Sawada, N., Hirota, Y., Uchino, Y., Suhara, Y., Hasegawa, T., ... & Okano, T. (2014). Vitamin K2 biosynthetic enzyme, UBIAD1 is essential for embryonic development of mice. *PLoS One*, 9(8), e104078.

Ortega, M. (2021). *Estudio de antioxidantes como preservantes de semen caprino para mejorar los procesos reproductivos controlados*. [Tesis de grado, Universidad de las Fuerzas Armadas]. <https://repositoriobe.espe.edu.ec/server/api/core/bitstreams/999ae8cb-99ff-4b9c-b324-db259dd4714c/content>

Paucar, JEP, Alvarado, JC, Moscoso, AL, & Maldonado, ME (2025). Evaluación de tres dilutores comerciales sobre el semen de ovino post-congelación. *Polo del Conocimiento*, 10 (1), 2542-2566.



Spanner, E.A. de Graaf, S.P. & Rickard, J.P. (2024). Factors affecting the success of laparoscopic artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*, 264(107453). <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2024.107453>

Toki, E., Goto, S., Setoguchi, S., Terada, K., Watase, D., Yamakawa, H., Yamada, A., Koga, M., Kubota, K., Iwasaki, K., Karube, Y., Matsunaga, K., & Takata, J. (2022). Delivery of the reduced form of vitamin K2(20) to NIH/3T3 cells partially protects against rotenone induced cell death. *Scientific reports*, 12(1). 10.1038/s41598-022-24456-3

The jamovi project. (2024). jamovi (Version 2.4) [Computer Software]. <https://www.jamovi.org>

Walther, B., Karl, P., Stand, S. Boyaval, P.&. (2013). Menaquinones, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements. *Advances in Nutrition*, 4. <https://doi.org/10.3945/an.113.003855>

Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., ... y Cheng, H. (2008). Destellos de superóxido en mitocondrias individuales. *Cell*, 134 (2), 279-290.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe conflicto de interés posible.

Financiamiento:

No existió asistencia financiera de partes externas al presente artículo.

Nota:

El artículo no es producto de una publicación anterior.