



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMBINADO DE LA  
MENAQUINONA-4 Y L-CARNITINA SOBRE LA  
CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

**AUTOR: MARIA FLOR LEMA GUAMÁN**

**DIRECTOR: DR. ÁNDRES LEONARDO MOSCOSO PIEDRA MSC.**

**CUENCA - ECUADOR**

**2025**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS**

**AGROPECUARIAS**

**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMBINADO DE LA  
MENAQUINONA-4 Y L-CARNITINA SOBRE LA  
CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

**AUTOR: MARIA FLOR LEMA GUAMÁN**

**DIRECTOR: DR. ÁNDRES LEONARDO MOSCOSO PIEDRA MSC.**

**CUENCA - ECUADOR**

**2025**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**

**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**Maria Flor Lema Guamán** portadora de la cédula de ciudadanía N° **0302305750**. Declaro ser el autor de la obra: **“Evaluación del Efecto Combinado de la menaquinona-4 y L-carnitina sobre la Crioconservación del Semen Ovino”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **11 de septiembre de 2025**



F: .....

**Maria Flor Lema Guamán**

**C.I. 0302305750**

## CERTIFICACIÓN

Yo Dr. Andrés Leonardo Moscoso Piedra. Mgs, con cédula de identidad N° 0104156443 en calidad de director del trabajo de titulación con el tema ***“Evaluación del Efecto Combinado de la menaquina-4 y L-Carnitina sobre la Crioconservación de Semen Ovino”*** certifico que el presente trabajo fue desarrollado por María Flor Lema Guamán bajo mi supervisión.

Atentamente,

ANDRES  
LEONARDO  
MOSCOSO  
PIEDRA

Firmado  
digitalmente por  
ANDRES LEONARDO  
MOSCOSO PIEDRA  
Fecha: 2025.09.02  
14:20:40 -05'00'

Dr. Andrés Moscoso Piedra, Mgs.

Director de Tesis



## Resumen

La presente investigación biológica se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Universidad Católica de Cuenca, Ecuador y se enfocó en el proceso de crio preservación de la genética ovina del macho, la cual afecta de forma negativa la funcionalidad y viabilidad espermática, debido principalmente al estrés oxidativo (EO) generado durante el proceso de congelación y descongelación debido a las características bioquímicas de su membrana celular. Este estudio evaluó el efecto de la adición de la L-carnitina (1mM), y Menaquinona-4 (1mM) de forma individual y combinada (1mM x 1mM), post- descongelación en semen ovinos procedente de un mismo carnero del cual se evaluó la vitalidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática, la actividad mitocondrial y el análisis de la cinética espermática mediante el sistema casa (Computer Assisted Sperm Analysis) encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en varios de estos parámetros. Los resultados de Integridad de la Membrana (%Host,  $p = 0,002$ ) reflejan un efecto negativo atribuido al desequilibrio iónico, mientras el alto índice de Inmóviles ( $p = 0,047$ ) refleja exceso de aditivos en la dilución, o la baja Linealidad (%LIN) ( $p = 0,005$ ) está asociada a la falta de cofactores que sostengan la actividad de los antioxidantes. La alta variación de factores internos y externos (repeticiones) que afectan la actividad espermática sugiere que es necesario considerar las dosis y los tiempos de acción de cada antioxidante para así poder alcanzar a comprender los efectos biológicos sinérgicos y antagonistas que tienen entre si frente al estrés oxidativo.

**Palabras clave:** Antioxidante; Ecuador, Efectos Biológicos; Estrés oxidativo; Genética; Investigación Biológica



---

## Abstract

This biological research was conducted at the Reproduction Laboratory of the Universidad Católica de Cuenca, Ecuador, and focused on the cryopreservation of ram genetics, a process that negatively affects sperm functionality and viability due primarily to oxidative stress (OS) generated during freezing and thawing, as a consequence of the biochemical properties of the sperm plasma membrane. The study evaluated the post-thaw effect of L-Carnitine (1 mM) and Menaquinone-4 (1 mM), individually and in combination (1 mM  $\times$  1 mM), on ovine semen collected from a single ram, assessing vitality, viability, plasma membrane integrity, mitochondrial activity, and sperm kinetics using the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were detected in several parameters, where the membrane integrity (%HOST,  $p = 0.002$ ) indicated a negative effect associated with ionic imbalance, the high immotile index ( $p = 0.047$ ) reflected excess additives in the extender, and the reduced linearity (%LIN,  $p = 0.005$ ) was related to the absence of cofactors supporting antioxidant activity. The high variability among internal and external factors (replicates) affecting sperm performance suggests that antioxidant dosage and exposure times must be considered to better understand their synergistic or antagonistic biological effects under oxidative stress conditions.

**Keywords:** Antioxidant; Ecuador; Biological Effects; Oxidative Stress; Genetics; Biological Research.



---

## Introducción

La presente investigación evalúa el efecto antioxidante de la L-carnitina y la menaquinona-4 sobre la crio preservación del semen ovino con el fin de mejorar la funcionalidad y viabilidad de los espermatozoides post-congelación. La criopreservación representa una herramienta fundamental en la biotecnología reproductiva, sin embargo, el proceso de congelación provoca el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), producto del estrés oxidativo (EO), lo que ocasiona daño estructural en membranas, ADN, proteínas y mitocondrias además de reducir la motilidad, viabilidad y fertilidad (Wang et al., 2025).

Para contrarrestar este efecto, se propone dentro de las biotecnologías de la conservación de material genético, la incorporación del uso de antioxidantes en los medios de dilución y crio preservación, donde la L-carnitina permite disminuir la fragmentación del ADN y mejorar la motilidad espermática (Heidari et al., 2022), mientras que la menaquinona-4 (vitamina K2), garantiza la maduración de los espermatozoides, la estabilidad de la membrana plasmática y la calidad espermática post-congelación (He et al., 2019).

La L-carnitina (LC), es una amina cuaternaria hidrosoluble, sintetizada principalmente a partir de la lisina y metionina (Lijun et al., 2025), y desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético espermático al facilitar el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna para su  $\beta$ -oxidación y producción de ATP (Mateus et al., 2023). Se encuentra de forma natural en el semen, particularmente en el testículo y epidídimo, donde actúa como un antioxidante endógeno al reducir el estrés oxidativo (OS), proteger el ADN y preservar la integridad del acrosoma mediante la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Palacios et al., 2024).

La vitamina K (VK) es una molécula liposoluble que se encuentra principalmente en dos formas: vitamina K-1 o filoquinona y vitamina K-2 o menaquinona (MK), ambas con el mismo anillo central de 2-metil-1,4-naftoquinona (Sadler et al., 2024). Actúa como cofactor esencial de la enzima  $\gamma$ -glutamil carboxilaza (GGCX), la cual convierte los residuos de glutamato peptídico en residuos GLA, proceso que requiere la reducción de quinona (VK) a hidroquinona (VKH<sub>2</sub>) mediante la enzima VKORC1 situada en el retículo endoplásmico rugoso (Khaleel et al., 2025).



Además, la VK2 está presente en distintos tejidos extra hepáticos como páncreas, riñones, pulmones y en menor cantidad en los testículos donde se asocia a niveles altos de fragmentación del ADN espermático y apoptosis anormal de los espermatozoides (Khaleel et al., 2025).

A nivel reproductivo permite la maduración de los espermatozoides, debido a su asociación con la  $\gamma$ -glutamil carboxilasa, además esta enzima conjuntamente con su cofactor (VK) participa en la homeostasis del calcio epididimario (Xiong et al., 2024). Debido a su acción antioxidante limita la muerte celular al inhibir la activación de la 12-lipoxigenasa (12-LOX), reduciendo la acumulación de radicales libres y peróxidos que generan daño oxidativo (Sadler et al., 2024).

Durante la crio preservación, los espermatozoides experimenta daños estructurales y morfológicos, que afectan la membrana plasmática, el núcleo, las membranas perinucleares, la actividad mitocondrial, el aumento de las especies reactivas de oxígeno y la función de las proteínas (Tao, y otros, 2025). Además, provoca alteraciones moleculares como fragmentación y degradación del ADN, degradación de ARNm y miARN y cambios en el complejo ADN/protamina (Yáñez-Ortiz, Catalán, Rodríguez-Gil, Miró, & Yeste, 2022).

Los espermatozoides ovinos son más susceptibles al estrés oxidativo (EO), debido a que poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), el incremento de estos hace que las células sean sensibles al choque frío, a la peroxidación lipídica y al aumento de la apoptosis celular en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Larbi et al., 2018). Cabe mencionar que los altos niveles de ROS provocan que la cadena polipeptídica se fracture, lo que reduce la producción de ATP y consecuentemente conduce a una fosforilación axonal anormal, a un aumento de la peroxidación lipídica y a la pérdida de la motilidad (Ibrar, y otros, 2021). Aunque el plasma seminal poseen antioxidantes endógenos como, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, su acción no es suficiente ya que no puede inhibir por completo el exceso de ROS durante el proceso de congelación (Reza et al., 2021).

Las células espermáticas en condiciones normales presentan un 60% de agua y se encuentran en estado isotónico para mantener su volumen fisiológico normal, pero al descender las temperaturas a  $-10^{\circ}\text{C}$  se forman los primeros núcleos de hielo y causan una alteración solución-soluto en ambos

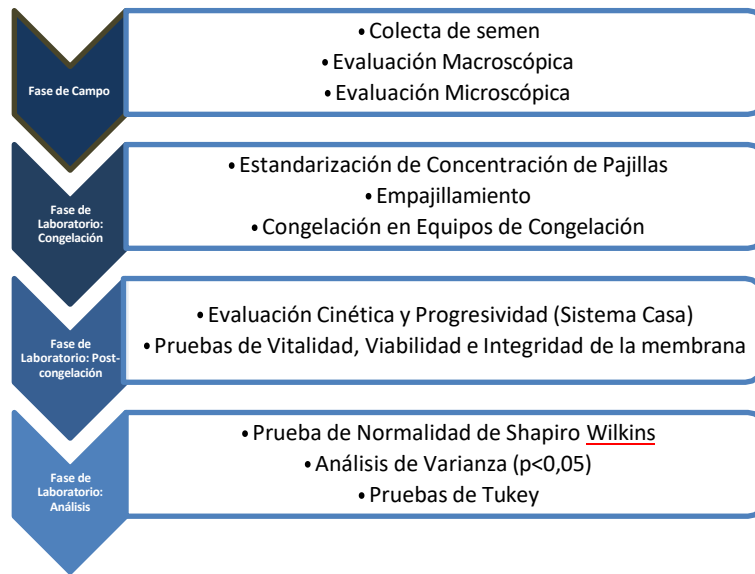


lados de la membrana celular (Karekin et al., 2025). La formación de cristales de hielo y los cambios osmóticos producen pérdida de fosfolípidos, deshidratación celular, cambios en el pH, debilidad de los complejos proteína-lípidos y comprometen la viabilidad y motilidad espermática (Ozimic et al., 2023).

Estudios realizados han demostrado que la adición de L-carnitina en el diluyente crio preservante mejora significativamente la viabilidad, motilidad progresiva, integridad de la membrana y funcionalidad espermática. (Valdez, Moscoso, & Maldonado, 2024) De manera complementaria, Palacios y Peláez (2021) evidenciaron beneficios en los parámetros cinéticos e integridad acrosomal. Por ello, se plantea la hipótesis de que la adición de L-carnitina y MK-4 en la congelación del semen ovino mejora las características cinéticas y la viabilidad espermática post-congelación, por lo tanto, se establece como el objetivo específico de la presente investigación

## **Materiales y métodos**

El presente estudio fue desarrollado en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, donde se evaluaron 8 eyaculados de un semental de raza Katadhin, de 2 años de edad, en donde se adicionó 4 diluciones que formaron partes de 4 Tratamientos respectivamente: T0 (control sin antioxidantes), TL (L-carnitina a 1 mM), TM (menaquinona-4 a 1 mM) y TL×M (combinación de ambos a 1 mM cada uno). Cada Tratamiento fue dispuesto en 6 pajillas respectivamente para cada tratamiento (Total: 24 pajillas). La investigación de carácter experimental constó de 2 fases: de campo y laboratorio, como se observa en la Figura 1.



**Figura 1.** Resumen de la Investigación

### *Fase de Campo*

La fase de campo consistió en la recolección de semen del semental adulto, para lo que se usó una hembra ovina que ayudo a provocar la monta. Se realizaron 2 colectas semanales en 4 semanas. Para la colección de semen se usó una vagina artificial que contenía agua entre 42°C-44°C con una cantidad de 50 ml. Se agregó aire en el interior de la camisa de látex hasta llegar a un centímetro de grosor, lo que facilitó la colecta. En el extremo del cuello de la vagina artificial se colocó un tubo colector estéril falcón de 15ml. El operario se coloca a lado derecho de la oveja y sostiene la vagina artificial en un ángulo de 40°C, el macho realiza el efecto flehmen y hace el golpe de riñón siendo un indicativo de la eyaculación, la muestra seminal se sostiene con la mano a temperatura corporal de 37°C evitando así el contacto con la luz ultravioleta y cambios de temperatura hasta llegar al laboratorio (Valdez, Moscoso, & Maldonado, 2024).

### *Fase de laboratorio*

Posterior a la colecta se procedió a la fase de laboratorio donde se evaluó macroscópica y microscópica el semen, el cual permaneció a baño Maria durante esta fase inicial.



Para la evaluación macroscópica del eyaculado se consideraron los siguientes parámetros: volumen y color. El volumen fue determinado con un tubo Falcon de 15 ml y una pipeta automática de 1000  $\mu$ l. El color del eyaculado se evaluó mediante observación directa en el mismo tubo Falcon.

Para la evaluación microscópica del eyaculado se consideraron los siguientes parámetros: motilidad individual, masal y concentración. Para la motilidad masal (MM) se usó un microscopio de contraste con el lente de 10x en el que se observa movimientos en olas donde se observó la muestra que permaneció sobre una platina térmica. La motilidad individual (MI) se determinó con el lente de 40x, del mismo microscopio. La determinación de la concentración se hizo con un fotómetro SDM1.

Para el empajillamiento se preparó la solución 1:3:1 de Triladyl (Triladyl, agua ultrapura W4502-1L y yema de huevo). Posteriormente, se prepararon los antioxidantes de cada tratamiento. Cada tratamiento (L-carnitina (18  $\mu$ l), Menaquinona-4 (20  $\mu$ l) y la combinación de ambos (28  $\mu$ l y 20  $\mu$ l) y un grupo de control T0 sin adición de antioxidante) fue colocado en un tubo Eppendorf de 2ml, para la posterior incorporación de la solución de Triladyl sobre este. A esta solución se incorporó el material genético en una proporción 1:1 (una parte se semen puro y otra parte de la solución de Triladyl). Se estandarizó cada solución para poder empajillar en pajillas de 0,25ml a una concentración de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides. Se selló las pajillas con alcohol polivinílico.

Para la congelación se utilizó un congelador automático modelo CL5500 (FREEZE CONTROL CRYOBATH, programa #6), para finalmente congelar a  $-196^\circ\text{C}$ . Luego, las pajuelas fueron almacenadas en tanques de nitrógeno líquido durante 24 horas, para ser evaluadas en la fase de post-congelación. Las pajillas de semen, crio preservado y almacenadas a  $-196^\circ\text{C}$  fueron extraídas, descongeladas y evaluadas individualmente en el sistema CASA, prueba de Eosina Nigrosina, Test de Host, prueba de Rodamida y de Yoduro de Propidio.

Para el análisis del sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), se colocó 5  $\mu$ l de semen por tratamiento y se llevó a observar con el lente de 10x. en el cual se evaluaron variables de: 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 (ALH) y frecuencia de batida (BCF).

La prueba de Eosina-Nigrosina (proporción 1:1) permite determinar el porcentaje de vitalidad. La prueba de HOST para la integridad de la membrana. En esta prueba se mezcló 100  $\mu$ l, de solución de HOST con 20  $\mu$ l de semen, y se dejó reposar 45 minutos sobre la platina térmica. Se analizó con el lente de 40x y se identificó los espermatozoides de cola enrollada (+) frente a los no enrollados (-). Así se determinó el porcentaje de individuos con la membrana integra. La prueba de Yoduro de Propidio sirvió para la evaluación de la viabilidad celular. En esta se usó el microscopio de fluorescencia con el lente de 40x. Los espermatozoides muertos se observaron teñidos de color rojo y los vivos sin coloración y con el ADN intacto. La evaluación de la actividad mitocondrial se hizo con la prueba de Rodamida. Se añadió 1  $\mu$ l del reactivo y se incubó por 15 minutos (Mehdipour et al., 2025).

Para el análisis estadístico se realizó pruebas de normalidad de Shapiro Wilkins ( $p < 0,05$ ). El análisis de varianza se ejecutó en base de un diseño de bloques completamente al azar (DBCA-Tratamiento y Colecta), en el programa estadístico Infostat Statistics (Di Rienzo et al., 2020).

## Resultados

Luego de normalizar las muestras mediante la prueba de Shapiro y Wilk ( $p < 0,05$ ); se evidencio en el análisis de varianza (ADEVA) que los parámetros evaluados por las pruebas de Tinción, Viabilidad, Progresividad y Cinética presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) tanto para los tratamientos, como para las repeticiones, como se observa en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Comparación de los parámetros funcionales y cinéticos del semen ovino post-descongelación según el tratamiento antioxidante utilizado.

VARIABLE	TESTIGO	L- Carnitina	MK- 4 + L- Carnitina	MK- 4	Valor p (Tratamiento)	Valor p (Repetición)
HOST %	28.92 ± 8.24c	21.63 ± 4.58b	13.26 ± 5.58 <sup>a</sup>	15.09 ± 5.38 <sup>a</sup>	0.002*	0.110
EOSINA %	62.84 ± 22.95 <sup>a</sup>	57.13 ± 23.34 <sup>a</sup>	53.23 ± 22.45 <sup>a</sup>	50.99 ± 20.45 <sup>a</sup>	0.750	<.001**
YODURO %	66.56 ± 11.06 <sup>a</sup>	65.98 ± 18.39 <sup>a</sup>	64.15 ± 14.61 <sup>a</sup>	52.05 ± 3.04 <sup>b</sup>	0.011*	0.196
RODAMIDA %	41.44 ± 10.18 <sup>a</sup>	44.13 ± 2.78 <sup>a</sup>	38.29 ± 4.19 <sup>a</sup>	45.69 ± 12.06 <sup>a</sup>	0.056	0.540
PROGRESIVOS%	29.06 ± 12.22b	24.93 ± 9.35ab	16.96 ± 10.86 <sup>a</sup>	13.95 ± 8.68 <sup>a</sup>	0.044*	0.030*
NP%	51.33 ± 13.44 <sup>a</sup>	47.82 ± 17.54 <sup>a</sup>	39.56 ± 17.68 <sup>a</sup>	34.82 ± 20.92 <sup>a</sup>	0.276	0.002**
INMOVILES%	19.61 ± 22.06b	20.68 ± 14.19b	43.48 ± 26.33ab	51.23 ± 28.59 <sup>a</sup>	0.047*	0.001**
VCL μm/s	69.43 ± 27.61b	72.38 ± 16.31b	45.07 ± 14.64 <sup>a</sup>	45.41 ± 21.34 <sup>a</sup>	0.013*	0.029*
VAP μm/s	42.29 ± 17.92b	41.03 ± 6.91b	25.08 ± 8.50 <sup>a</sup>	24.25 ± 12.44 <sup>a</sup>	0.004*	0.177
VSL μm/s	30.33 ± 13.92b	32.33 ± 1.25b	16.23 ± 6.70 <sup>a</sup>	15.19 ± 8.92 <sup>a</sup>	<.001**	0.157
STR %	62.68 ± 6.58b	63.51 ± 5.46b	55.38 ± 4.44ab	52.77 ± 11.22 <sup>a</sup>	0.018*	0.756
LIN %	39.56 ± 8.90b	40.18 ± 5.74b	28.75 ± 5.23 <sup>a</sup>	27.76 ± 11.11 <sup>a</sup>	0.005*	0.772
ALH μm	1.75 ± 0.48ab	1.88 ± 0.27b	1.38 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.50 <sup>a</sup>	0.021*	0.020*
BCF Hz	10.47 ± 4.67b	11.88 ± 0.41b	5.78 ± 2.79 <sup>a</sup>	4.96 ± 3.38 <sup>a</sup>	<.001**	0.057

\*Diferentes literales, indican diferencias entre tratamientos ( $p < 0,05$ )



La prueba de integridad funcional de la membrana plasmática (HOST) mostró diferencias significativas ( $p=0.002$ ), se obtuvo el mayor porcentaje para el Testigo con 28.92% respectivamente, mientras que la combinación de MK-4 + L-carnitina presentó los valores estadísticamente inferiores con 13.26% respectivamente.

En cuanto a la viabilidad (% Eosina), la prueba también presentó diferencias significativas ( $p=0.011$ ), los grupos Testigo (66.56%) y la L-carnitina (65.98%) mostraron los valores más altos frente a MK-4 (52.05%) que presentó el valor más bajo, lo que sugiere un efecto negativo propio de esta vitamina.

Respecto a la motilidad progresiva de los espermatozoides, se registraron diferencias significativas ( $p=0.044$ ), el Testigo evidenció mayores porcentajes con 29.06% respectivamente, seguido por la L-carnitina (24.93%). En contraste la MK-4 + L-carnitina (16.96%) y el grupo de MK-4 (13.95%) representaron valores inferiores, lo que indicó afección negativa en el tratamiento con MK-4.

Del mismo modo se encontraron diferencias significativas en los espermatozoides inmóviles ( $p=0.047$ ), con porcentajes más elevados en MK-4 (51.23%), mientras que el Testigo y el grupo con L-carnitina mostraron menores tasas de inmovilidad, lo que guardó relación con el comportamiento general de la muestra.

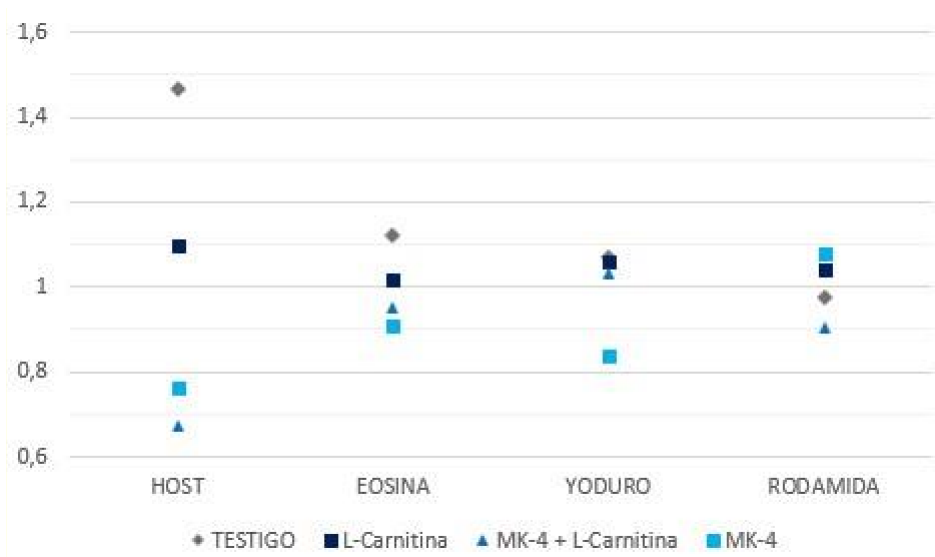
En los parámetros cinéticos espermáticas (VCL, VAP y VSL) también se observaron diferencias significativas ( $p=0.013$ ,  $p=0.004$  y  $p < .001$ ). La L-carnitina mantuvo los valores más altos en estos tres parámetros (72.38  $\mu\text{m/s}$ , 41.03  $\mu\text{m/s}$  y 32.33  $\mu\text{m/s}$ ).

De igual manera, se observaron diferencias significativas en los índices de movimiento STR, ( $p=0.018$ ) y LIN, ( $p=0.005$ ), se observó que los grupos Testigo y L-carnitina conservaron valores más elevados, con 62.68% y 63.41% respectivamente, mientras que la MK-4 mostró reducciones marcadas (52.77% y 27.76%), esto reafirmó su posible interferencia sobre la cinética espermática.

En cuanto a la ALH, también se evidenció diferencias significativas ( $p=0.021$ ), con el valor más alto para la L-carnitina (1.88  $\mu\text{m}$ ) frente al más bajo registrado para MK-4 (1.39  $\mu\text{m}$ ). Finalmente

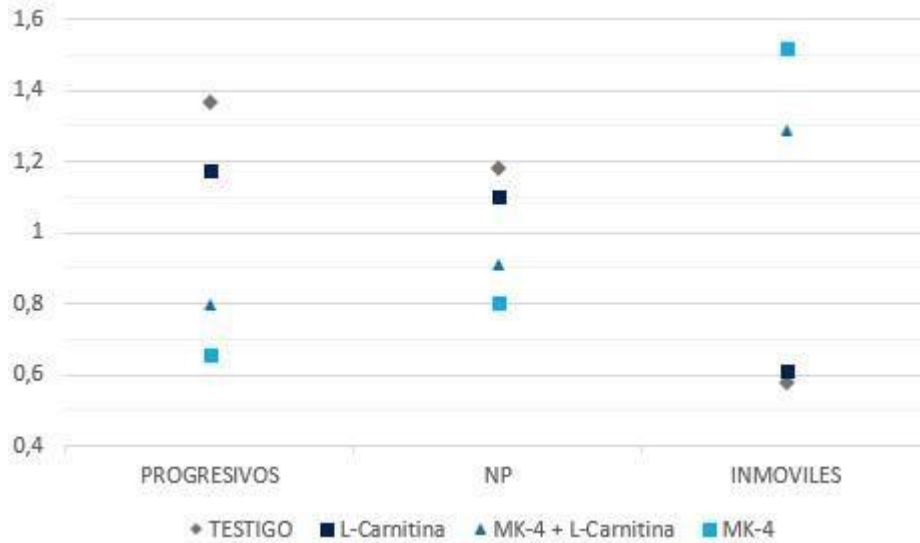
la frecuencia de batido de la cola (BCF) reflejó una diferencia estadística marcada ( $p < .001$ ), al ser mayor en el grupo de L-carnitina con 11.88 Hz respectivamente.

Se realizó un análisis de medias de los datos que permitió visualizar mejor las diferencias estadísticas generales de los tratamientos y sus efectos, y están visualizados en las siguientes figuras: Figura 2. Valores de acuerdo a las diferentes pruebas de Tinción: Host, Eosina, Yoduro y Rodamida, Figura 3. Pruebas de progresivos, no progresivos e inmóviles y Figura 4. Representación del índice STR y índice de LIN.



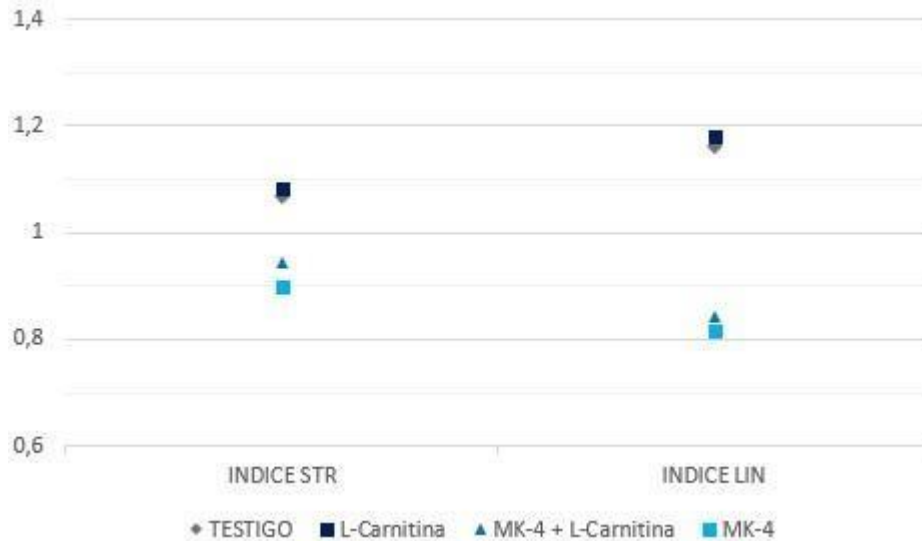
**Figura 2.** Valores de acuerdo a las diferentes pruebas de Tinción: Host, Eosina, Yoduro y Rodamida.

En la Figura 2 se logra visualizar la variación de los resultados en relación a la media aritmética normalizada, el grupo Testigo mantuvo los valores más altos en las pruebas de integridad funcional de la membrana HOST, mientras que la MK4 y la combinación MK-4 + L-carnitina mostraron una disminución marcada e identificaron el efecto negativo de la MK-4 en la mezcla. L-Carnitina sola mantuvo valores intermedios y sugirió cierta capacidad protectora.



**Figura 3** Pruebas de progresivos, no progresivos e inmóviles.

La Figura 3 representa la variación de la progresividad en relación de la media aritmética normalizada y muestra que el tratamiento con L-carnitina presentó el mayor porcentaje de motilidad progresiva con 24.93% respectivamente, mientras que la combinación MK-4 + L-carnitina obtuvo los valores más bajos. En cuanto a los no progresivos, los grupos de MK-4 (solo y combinado) presentaron niveles más bajos, lo que indicó pérdida de movimiento útil y reducción de la capacidad cinética. El grupo que se trató con MK-4 presentó el mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles, lo que pudo deberse a una interferencia de la molécula sobre la viabilidad y la movilidad espermática. Por su parte la L-carnitina sola, mostró valores favorables o equivalentes al testigo, lo que evidenció un efecto nocivo de la menaquinona post-congelación y no a factores biofísicos de la misma.



**Figura 4.** Representación del índice STR y índice de LIN.

En la Figura 4 se observa el comportamiento de los parámetros cinéticos (STR Y LIN) en relación a la media aritmética normalizada, donde se observa nuevamente que los grupos Testigo y L-carnitina conservaron valores más altos en relación a la media, mientras que los tratamientos con MK-4 y MK4+L-carnitina mostraron descensos notables en relación a la media.

## Discusión

Durante el proceso de crío preservación el espermatozoide se ve sometido a condiciones de estrés físico y químico que alteran su estructura y funcionalidad. Uno de los principales efectos producidos es la generación de especies reactivas de oxígeno ROS, moléculas altamente inestables. Aunque niveles bajos de ROS son esenciales para la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la motilidad espermática, su exceso supera la capacidad del sistema antioxidante y produce un efecto destructivo llamado estrés oxidativo EO (Yutao, Xun, & Hongjun, 2025). Por lo tanto, la adición de antioxidantes durante la crío preservación debe realizarse considerando cuidadosamente el equilibrio redox de la dilución, para no interferir con las funciones fisiológicas dependientes de ROS.

En este contexto las células espermáticas se caracterizan por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados PUFA en su membrana, los cuales son susceptibles al ataque de ROS, este ataque inicia reacciones en cadena de peroxidación lipídica, las cuales terminan en la formación de subproductos tóxicos como malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal. Estos procesos dañan tanto la integridad estructural de la membrana como su funcionalidad y reducen la motilidad y capacidad de fertilización al ovulo. A nivel intracelular el EO genera daños significativos a los espermatozoides ya que afecta a las proteínas, a la integridad del ADN y a la función mitocondrial (Yutao, Xun, & Hongjun, 2025).

Un equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes es fundamental para un correcto funcionamiento de las células y tejidos (Maryam et al., 2023).

Valdez, Moscoso, & Maldonado (2024) mencionan que la L-Carnitina en la crio preservación ovina mejora significativamente la motilidad y viabilidad espermática en dosis similares a las empleadas en este estudio. Sin embargo los resultados obtenidos por dichos autores no coinciden con los hallados en este estudio, aunque existe el consenso de que la molécula no es perjudicial para el esperma y que su efectividad depende del contexto de la dilución y la toma de muestras.

La L-carnitina posee propiedades antioxidantes y antiapoptóticas que protegen el ADN y la membrana mitocondrial del espermatozoide al reducir la formación de ROS y estimular enzimas clave como el superóxido dismutasa (SOD), el glutatión (GSH), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Además, participa en el metabolismo energético, al transportar ácidos grasos de cadena larga hacia la mitocondria para su  $\beta$ -oxidación en el ciclo de Krebs, incrementar la producción de ATP necesario para la motilidad espermática, regular la relación acil-CoA/CoA y disminuir la toxicidad intracelular (Mario et al., 2024). Estas funciones contribuyen a preservar la integridad genética durante la crio preservación, evitando la oxidación de bases nitrogenadas, la fragmentación del ADN (Kooshesh et al., 2023) y la deficiencia de protamina (Mateus et al., 2023) lo que explicaría los resultados positivos reflejados en este estudio.

La eficacia de la MK-4 depende estrictamente de la dosis. Estudios realizados en oligodendrocitos y neuronas en desarrollo muestran que la vitamina K 1 y MK-4 en concentraciones subnanomolares



de MK-4  $<10$  nM y de K 1  $\sim 25$  nM, inhiben significativamente la activación de 12-LOX y reducen la acumulación de ROS sin alterar su morfología celular (Li et al., 2009). En contraste dosis muy altas como 1mM pueden inducir un comportamiento pro-oxidante reflejado en daño mitocondrial y peroxidación lipídica.

Respecto a los tratamientos con Menaquinona-4 sola, estudios reportados por (Farfán et al., 2025) indican altas limitaciones para obtener resultados positivos, como lo menciona también Goto (2022), quien indica que la VK2 requiere protección estricta de la luz durante su utilización para garantizar su efectividad, ya que la exposición fototóxica provoca un incremento de ROS y reduce la viabilidad celular al romper los enlaces de la molécula de MK4.

(Ma et al., 2019) mencionan que para que la MK4 cumpla su actividad biológica, depende de las enzimas  $\gamma$ - glutamil carboxilasa (GGCX) y la vitamina K epóxido reductasa (VKORC1). Por un lado la GGCX ayuda a que la MK-4 active sus proteínas dependientes de la vitamina K, que participan en la regulación del calcio intracelular, en la integridad de las membranas (Host y Yoduro), en la prevención de la apoptosis y la maduración de los espermatozoides epididimarios; mientras que VKORC1 recicla la Mk-4 oxidada y la vuelve a su forma activa y asegura la disponibilidad continua en el ciclo de la vitamina K; sin embargo, este proceso necesita un entorno celular activo con suficiente energía (NADPH) e integridad del retículo endoplasmático y mitocondrial (Oldenburg et al., 2015).

Por último, se puede entender que el uso simultáneo de dos antioxidantes en la misma dilución puede generar efectos negativos si no se considera los equilibrios iónicos y la adición enzimática exógena o endógena. En este estudio, la adición excesiva de antioxidantes genera efectos adversos en los parámetros cinéticos de la mezcla, por lo que es fundamental incorporar enzimas y cofactores necesarios para optimizar la acción antioxidante y ajustar su dosis y tiempo de aplicación. Procesos como la capacitación y la hiperactivación espermática aumentan la fluidez y permeabilidad de la membrana generando un patrón de movimiento más ondulante y menos lineal, lo que reduce transitoriamente el %LIN (Aghazarian et al., 2021). El índice de linealidad (LIN) se ve afectado por cambios biológicos que producen daño mitocondrial (EO), al alterar la calidad espermática y producir menos movimientos lineales, ocasionados por la peroxidación lipídica en la membrana



---

de los espermatozoides (Félix et al., 2023). Coincidiendo con esta investigación, donde LIN es el parámetro más sensible a las variaciones entre tratamientos.

### **Conclusiones**

Si bien la L-carnitina a dosis de 1mM favoreció los parámetros de progresividad, integridad de la membrana plasmática, viabilidad y cinética, su combinación con Menaquinona 4 a la misma concentración afectó directamente a la membrana plasmática y actividad mitocondrial. Además, se observó que la menaquinona por si sola generó mayor daño espermático que cuando se administró combinada con L-carnitina; lo que reforzó las bondades de L-carnitina.

Los parámetros más sensibles a las variaciones entre tratamientos fueron la linealidad (LIN) y el porcentaje de espermatozoides inmóviles y reflejaron el impacto de los tratamientos sobre la integridad mitocondrial y la peroxidación lipídica de la membrana.

En general, los resultados mostraron que la eficacia de los antioxidantes dependió de la dosis, la estabilidad de la molécula y la disponibilidad de cofactores en el medio y enfatizando la necesidad de un control riguroso en la formulación de soluciones antioxidantes durante la criopreservación.



---

## Referencias bibliográficas

Aghazarian, A., Huf, W., Pflüger, H., & Klatte, T. (2021). Standard semen parameters vs. sperm kinematics to predict sperm DNA damage. *World Journal of Men's Health*, 39(1), 116–122.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31749338/>

Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2020).

*InfoStat (Versión 2020) [Software estadístico]*. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>

Farfán, K., Alvarado, J., & Moscoso, P. (2025). Determinación del efecto post congelación de microdosis de menaquinona-4 en semen ovino. *MQRInvestigar*, 9(3), 1–19.

<https://doi.org/10.56048/MQR20225.9.3.2025.e903>

Félix, R., Antunes, L., Vera, C., & Oliveira, E. (2023). The protective effect of endogenous melatonin on gilthead seabream sperm during cryopreservation. *Aquaculture*, 477, 739997.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739997>

Goto, S. S. (2022). Prodrugs for skin delivery of menahydroquinone-4, an active form of vitamin K2, could overcome the photoinstability and phototoxicity of vitamin K. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102548>

He, M., Bao, L., Bao, Y., Shuo, S., Da, Y., Tian, C., ... Winnie, W. (2019). Vitamin K2-dependent GGCX and MGP are required for homeostatic calcium regulation of sperm maturation. *Science*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.03.030>

Heidari, M., Qasemi-Panahi, B., Moghaddam, G., Daghigh-Kia, H., & Masoudi, R. (2022). L-carnitine improves quality parameters and epigenetic patterns of buck's frozen-thawed semen.

*Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107092>

Ibrar, K., Zubing, C., Hongyu, L., Adnan, K., S. U., Muhammad, Z., ... Yunhai, Z. (2021).

Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess



---

sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>

Karekin, E., Yulian, F., Todor, & Ch. (2025). Probing the impact of commercial cryoprotectants and freezing technique on the motility of human spermatozoa cryopreserved onto extremely water-repellent soot-coated surfaces. *Cryobiology*, 118.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2025.105195>

Khaleel, I., Al-Maliki, R., & Al-Tameem, A. (2025). DNA fragmentation and vitamin K2 levels in sperm maturation and apoptosis. *Indonesian Journal on Health Science and Medicine*, 2(1).

<https://doi.org/10.21070/ijhsm.v2i2.117>

Kooshesh, L., Nateghian, Z., & Aliabadi, E. (2023). Evaluation of L-carnitine potential in improvement of male fertility. *Journal of Reproduction & Infertility*, 24(2), 69–84.

<https://doi.org/10.18502/jri.v24i2.12491>

Larbi, A., Anass, B., Maia, M. d., Boubker, N., & Bouchra, E. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>

Li, J., Wang, H., & Rosenberg, P. (2009). Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 87(7). <https://doi.org/10.1002/jnr.22029>

Lijun, J., Yunlei, L., Yunhe, Z., Xintong, H., Jiangpeng, G., Sihua, J., ... Yanyan, S. (2025). The effect of L-carnitine on frozen-thawed rooster sperm quality and fertility potential. *Theriogenology*, 237, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2025.02.016>

Ma, H., Zhang, B., Liu, B., Shi, S., Gao, D., Zhang, T., ... Shum, W. (2019). Vitamin K2-dependent GGCX and MGP are required for homeostatic calcium regulation of sperm maturation. *iScience*, 210–225. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.03.030>



Mario, I., Jorunn, A., Mette, H., Trine, H., & Oliwia, W. (2024). Association of endogenous seminal L-carnitine levels with post-thaw semen parameters in humans. *Wiley Online Library*.  
<https://doi.org/10.1155/2024/4327010>

Maryam, Z., Fariba, Z., Vahid, N., Rajaei, F., Mana, K., & Amir, H. (2023). Effect of antioxidant on sperm freezing. *Journal of Inflammatory Diseases*, 4(26), 217–226.  
<https://brieflands.com/articles/jid-156329>

Mateus, F., Moreira, S., Martins, A., Oliveira, P., Alves, M., & Pereira, M. (2023). L-carnitine and male fertility: Is supplementation beneficial? *Journal of Clinical Medicine*, 12(8).  
<https://doi.org/10.3390/jcm12185796>

Mehdipour, M., Mohammadi, H., & Salih, S. (2025). Mitochondrial specific antioxidant MitoPBN mitigates oxidative stress and improves mitochondrial function in cryopreserved ram sperm. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95820-2>

Oldenburg, J., Watzka, M., & Bevans, C. (2015). VKORC1 y VKORC1L1: ¿Por qué los vertebrados tienen dos reductasas de vitamina K 2,3-epóxido? *Nutrients*, 7(8), 6250–6280.  
<https://doi.org/10.3390/nu7085280>

Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734.  
<https://doi.org/10.3390/cimb45060300>

Palacios, M., & Peláez, G. (2021). Efecto de la suplementación de L-carnitina a diluyentes a base de leche desnatada sobre la criosupervivencia de esperma equino.  
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/37278>

Palacios, P., Peláez, G., Soria, M., Méndez, S., Galarza-Álvarez, L., Dorado, J., ... Galarza, A. (2024). L-carnitine enhances the kinematics and protects the sperm membranes of chilled and



---

frozen-thawed Peruvian Paso horse spermatozoa. *Cryobiology*, 115.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104884>

Reza, M., Nader, A., & Mohsen, S. (2021). Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 225.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106671>

Sadler, R., Shoveller, A., Shandilya, R., Charchoglyan, A., & Wagter-Lesperance, L. (2024). Más allá de la cascada de la coagulación: La vitamina K y su impacto multifacético en la salud humana y de los animales domésticos. *Current Issues in Molecular Biology*, 7(46), 7001–7031.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104884>

**Conflicto de intereses:**

Los autores declaran que no existe conflicto de interés posible.

**Financiamiento:**

No existió asistencia financiera de partes externas al presente artículo.

**Agradecimiento:**

N/A

**Nota:**

El artículo no es producto de una publicación anterior.

**Maria Flor Lema Guamán** portadora de la cédula de ciudadanía N° **0302305750**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Evaluación del Efecto Combinado de la menaquinona-4 y L-carnitina sobre la Crioconservación del Semen Ovino** ” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **11 de septiembre de 2025**



F: .....

**Maria Flor Lema Guamán**

**C.I. 0302305750**