

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**Mitocepción en semen fresco de bovino: análisis del efecto
mitocondrias sobre la calidad espermática del semen fresco en bovino
raza *Bos Taurus* y sus repercusiones en la mortalidad**

Claudia Emilia De La Torre Morales

Carrera: Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, 4 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Mitocepción en semen fresco de bovino: análisis del efecto
mitocondrias sobre la calidad espermática del semen fresco en bovino
raza *Bos taurus* y sus repercusiones en la mortalidad**

Claudia Emilia De La Torre Morales

Nombre del profesor, Título académico

Lenin Vinuesa, DMVZ, Msc, PhD

Quito, 4 de mayo de 2025

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Claudia Emilia De La Torre Morales

Código: 00214594

Cédula de identidad: 1724234784

Lugar y fecha: Quito, 1 de mayo de 2025

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, por haberme guiado, fortalecido y acompañado en cada paso de este camino. Su presencia ha sido mi refugio en los momentos de dificultad y mi inspiración en los de logro.

A mi mamá, agradezco profundamente todo su amor incondicional, sus sacrificios y su apoyo constante. Eres mi mayor pilar y la base firme sobre la cual he construido este sueño. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Este logro también es tuyo.

A mi familia, especialmente a mis queridos abuelitos, gracias por su sabiduría, oraciones, y palabras de ánimo. Su cariño ha sido un impulso invaluable en este proceso, y sin ustedes no sería lo que soy hoy.

A mis fieles compañeros de vida, mis mascotas, por brindarme consuelo silencioso, compañía y paz en los momentos más difíciles. Su presencia ha sido un alivio y una alegría diaria.

Agradezco profundamente al Dr. Ramiro Díaz, mi tutor de tesis, por su orientación, paciencia y compromiso durante el desarrollo de este proyecto. También al Dr. Andrés Caicedo por su colaboración y apoyo que hicieron posible esta investigación.

Finalmente, a mis compañeros de carrera, gracias por compartir risas, aprendizajes y crecimiento. Su amistad ha sido uno de los mayores regalos de esta etapa.

A todos ustedes, gracias.

RESUMEN

Esta investigación evalúa el efecto de la mitocepción sobre la calidad espermática en semen fresco de *Bos taurus*, explorando una alternativa biotecnológica para superar las limitaciones de la inseminación artificial convencional, que alcanza tasas de preñez de solo 65.96% en el primer intento.

Se aislaron mitocondrias de células madre mesenquimales de gelatina de Wharton y se transfirieron a muestras de semen bovino en dos ensayos realizados entre 2024 y 2025. Se utilizaron diferentes concentraciones (0.5, 1 y 1.5 μL) y se evaluaron nueve parámetros mediante análisis CASA.

Los resultados mostraron efectos significativos ($p < 0.05$) en la calidad espermática con las concentraciones de 1 μL y 0.5 μL , observándose mejoras en la concentración de espermatozoides, motilidad total y progresiva, y reducción de inmovilidad. Se identificó un equilibrio crucial en la dosificación, donde concentraciones excesivas podrían generar retroalimentación negativa por aumento de especies reactivas de oxígeno.

La mitocepción demuestra ser una estrategia prometedora para optimizar parámetros críticos espermáticos en bovinos. Esto representa un potencial para desarrollar protocolos mejorados de reproducción, aumentar tasas de preñez, reducir costos de múltiples inseminaciones y explorar aplicaciones en otras especies ganaderas. Este enfoque ofrece soluciones innovadoras a los desafíos de fertilidad en la ganadería moderna.

Palabras claves: Mitocepción, calidad espermática, *Bos taurus*, motilidad espermática, biotecnología reproductiva.

ABSTRACT

This research evaluates the effect of mitoception on sperm quality in fresh semen of *Bos taurus*, exploring a biotechnological alternative to overcome the limitations of conventional artificial insemination, which achieves pregnancy rates of only 65.96% on the first attempt.

Mitochondria were isolated from mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and transferred to bovine semen samples in two trials conducted between 2024 and 2025. Different concentrations (0.5, 1, and 1.5 μ L) were used, and nine parameters were evaluated using CASA analysis.

The results showed significant effects ($p < 0.05$) on sperm quality with concentrations of 1 μ L and 0.5 μ L, observing improvements in sperm concentration, total and progressive motility, and reduced immobility. A crucial balance in dosage was identified, where excessive concentrations could generate negative feedback due to increased reactive oxygen species.

Mitoception proves to be a promising strategy for optimizing critical sperm parameters in bovines. This represents potential for developing improved reproduction protocols, increasing pregnancy rates, reducing costs of multiple inseminations, and exploring applications in other livestock species. This approach offers innovative solutions to fertility challenges in modern livestock farming.

Keywords: Mitoception, sperm quality, *Bos taurus*, sperm motility, reproductive biotechnology.

ÍNDICE

Introducción	10
Desarrollo del tema	12
a. Mitocondrias	12
b. Número de espermatozoides	13
c. Concentración espermática	14
d. Motilidad espermática	14
e. Motilidad progresiva	15
f. Motilidad rápida	15
g. Motilidad lenta	16
h. Motilidad en círculo	16
i. Motilidad local	16
j. Inmovilidad	17
k. Sistema CASA	17
l. Hipótesis.....	19
Objetivos del estudio.....	19
Objetivos específicos	19
Objetivo específico 1.....	19
Objetivo específico 2.....	19
Objetivo específico 3.....	19
Materiales y métodos	19
Resultados	22
Discusión.....	24
Conclusiones	27
Referencias bibliográficas	28
Glosario	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis estadístico y evaluación de las muestras tratadas con mitocondrias y sin mitocondrias del primer ensayo	23
Figura 2. Análisis estadístico y evaluación de las muestras tratadas con mitocondrias y sin mitocondrias del primer ensayo	24

INTRODUCCIÓN

En el mundo ganadero, la inseminación artificial con el uso de semen congelado se ha convertido en uno de los métodos de reproducción más importantes y usados en el medio. Sin embargo, la tasa de vacas preñadas tras la primera inseminación artificial logra una tasa exitosa de preñez del 65.96% utilizando un protocolo de IATF (Salgado, et al.2015); requiriendo varios intentos hasta conseguir una preñez óptima que a su vez representa un gasto adicional para el ganadero.

Por lo cual, el análisis del espermatozoide bovino se ha convertido en un aspecto crucial para cumplir con una productividad y éxito económico requerido (Gu et al., 2019). El análisis del semen bovino se realiza a través de dos exámenes: uno macroscópico, que evalúa el volumen, color, pH y olor, y microscópico, que mide la motilidad y la concentración espermática.

Entre estos factores, la motilidad espermática es clave para la fertilidad, ya que depende directamente del funcionamiento de las mitocondrias. Las principales fuentes de energía de los espermatozoides, que según Bucci et al. (2023), a través del ATP intracelular generado brinda energía al flagelo mediante el uso de la vía, predominante en toros, de fosforilación oxidativa proporciona funcionalidad en el movimiento durante su avance en el oviducto de la hembra y lograr alcanzar la fertilización.

Sin embargo, la congelación del semen puede provocar daños mitocondriales, afectando su función. Dentro de la Escuela de Veterinaria, se desarrolló una línea de investigación enfocada en el análisis del semen criopreservado y no criopreservado, donde se determinó que no es necesario descongelar el semen para su uso. Además, se evidenció que los espermatozoides descongelados sufrieron una muerte mitocondrial considerable (Díaz et al., por publicar).

Para contrarrestar esto, surge el concepto de mitocepción, un enfoque innovador basado en la transferencia de mitocondrias desde células donantes a espermatozoides receptores

(Caicedo et al.,2015). Este procedimiento biotecnológico busca mejorar la calidad espermática mediante el restablecimiento de la funcionalidad mitocondrial, proporcionando no solo mayor energía celular sino también protección a la membrana lipídica de los espermatozoides para conseguir una viabilidad espermática óptima.

Para saber si la mitocepción hacia el espermatozoide es exitosa, el uso del sistema de análisis de esperma asistido por computadora (CASA) realiza un análisis a través de una evaluación automatizada y detallada de motilidad, concentración e inmovilidad de los espermatozoides realizado por gota de ml de semen bajo el microscopio que evaluará la efectividad del mismo. En la reproducción bovina, la transferencia de mitocondrias sanas al semen fresco podría potenciar la fertilidad y optimizar la eficiencia en los procesos de inseminación artificial. En este contexto, este estudio lleva un enfoque de analizar y comparar los parámetros entre muestras mitoceptadas y no mitoceptadas, con el objetivo de mejorar la calidad espermática en el ámbito ganadero.

DESARROLLO DEL TEMA

A continuación, se presentan, en líneas generales, las definiciones y características de cada uno de los parámetros que fueron utilizadas para establecer los análisis realizados en el presente estudio.

a. Mitocondria

La mitocondria de las células madre mesénquimales (CMM) es un orgánulo celular clave para la señalización y respuesta a estímulos (Khattar et al. 2022; Vignais et al. 2017). Esta mitocondria cumple con roles importantes ya que brinda soporte a la diferenciación de estas células multipotentes y a mecanismos regenerativos tales como la transferencia de mitocondria (Balcázar et al., 2020; Berridge et al., 2025; Caicedo & Singh, 2024; Caicedo et al., 2024; Velarde et al., 2020).

La purificación de estas mitocondrias mediante métodos de gradiente de densidad y ultracentrifugación inmuno-afin ha permitido obtener fracciones viables y funcionales. Una vez aisladas, dichas mitocondrias muestran capacidad para activar vías de reparación tisular, modular la inflamación y promover la biogénesis mitocondrial en células huésped, destacándose como agentes bioterapéuticos prometedores (Cabrera et al., 2019; Caicedo et al., 2017, 2021; Peñaherrera et al., 2023)

Su transferencia artificial a gametos tiene un alto potencial debido a sus potenciales efectos antioxidantes y protectores. En ovocitos de baja calidad metabólica o con mutaciones, la incorporación de mitocondrias derivadas de CMM incrementa puede mejorar el patrimonio mitocondrial y desarrollo a futuro del embrión (Cabrera et al. 2022). Estos hallazgos posicionan a las mitocondrias de CMM como candidatas ideales para intervenciones reproductivas avanzadas, al ofrecer una combinación

única de eficiencia energética, baja huella oxidativa y capacidad de señalización regenerativa.

En conjunto, la evidencia disponible respalda el uso de mitocondrias de CMM en espermatozoides, abriendo nuevas perspectivas en medicina regenerativa y reproductiva.

b. Semen bovino

El semen bovino está compuesto por espermatozoides y plasma seminal que desempeña el papel en la reproducción bovina al transportar el material genético paterno, que va a depender de factores como edad, raza y condiciones fisiológicas del toro para tener un determinado valor de volumen eyaculado y concentración espermática.

El plasma seminal es el medio donde los espermatozoides se encuentran suspendidos en una mezcla de proteínas, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, prostaglandinas, fructosa electrolitos y compuestos oxidativos que ayudan a nutrir y cumplir sus actividades espermáticas (Almadaly et al., 2023). Para el semen bovino, el plasma seminal brinda una notable capacidad para soportar procesos de criopreservación, atribuida a la composición de la membrana plasmática y a factores protectores (Zoca et al., 2021).

c. Número de espermatozoides

El número de espermatozoides en bovinos se refiere a la concentración espermática presente en un eyaculado, siendo un parámetro para evaluar la fertilidad y capacidad reproductiva del animal. La concentración normal de toros adultos oscila entre 800 a 2000 millones de espermatozoides por mililitro de eyaculado con un volumen promedio de 5 a 8 ml para considerar un eyaculado exitoso (Bradley & Klein, 2020). Junto a esto, se debe considerar factores como edad, raza, estado

nutricional y la frecuencia de recolección.

Para la evaluación precisa del número de espermatozoides se utilizan técnicas como espectrofotometría, cámara de recuento de Neubauer o el sistema computarizado de análisis seminal (CASA, MiniTube.) que permite determinar objetivamente la selección de reproductores y la posterior preparación de dosis seminales para cada programa de inseminación artificial.

d. Concentración espermática

La concentración espermática es un parámetro que representa el número de espermatozoides en millones por mililitro en una cantidad de volumen específica, con esto se indica directamente la capacidad espermatogénica del testículo y es un factor determinante para la fertilidad de cada toro. La concentración espermática se correlaciona en significancia con la circunferencia escrotal y la madurez del toro, siendo necesario un mínimo de 500 millones/ml para considerar el animal apto para considerarlo reproductor (Saavedra et al., 2012).

e. Motilidad espermática

La motilidad espermática es un parámetro fundamental en la evaluación de la calidad seminal, ya que determina el potencial fecundante del eyaculado. Esta característica se refiere a la capacidad de los espermatozoides para desplazarse de manera progresiva y eficiente a lo largo del tracto reproductivo femenino, hasta alcanzar el ovocito en las trompas de Falopio.

Una motilidad adecuada refleja una correcta integridad estructural y funcional de la célula espermática, así como una actividad metabólica óptima, dependiente en gran medida del funcionamiento mitocondrial.

Para considerar una motilidad espermática dentro de valores óptimos los toros

deben obtener entre 70% a 90% de motilidad individual progresiva, que en promedio requiere un mínimo de 50% grupal para considerar el eyaculado apto para procesamiento y posterior inseminación (Bulla-Arias et al., 2023).

f. Motilidad progresiva

La motilidad progresiva indica la capacidad que poseen los espermatozoides para desplazarse de manera rectilínea o ligeramente curvilínea, hacia el sitio de fecundación. Se considera que valores entre $89.74 \pm 0.91\%$ en semen fresco de un toro reproductor es óptimo para una fertilidad adecuada (Díaz et al., 2020).

Además, la motilidad progresiva que contienen los espermatozoides, está correlacionado positivamente con la capacidad de penetración del mucus cervical y las tasas de fertilidad en vitro, siendo así un confirmatorio de la fertilidad del semen considerado como parte del mejoramiento genético bovino (Von Frey et al., 1988)

g. Motilidad rápida

La motilidad rápida es considerada como un subparámetro para la evaluación de la calidad del semen, y su característica es cómo los espermatozoides que tienen un desplazamiento acelerado y vigor frente al resto, junto a esto son los espermatozoides que pueden recorrer distancias superiores a 25 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ en trayectorias rectilíneas o ligeramente rectilíneas. Este tipo de motilidad refleja tanto un funcionamiento metabólico adecuado como una función flagelar óptima (Contri et al., 2019 pp. 627-635).

Dentro del análisis CASA (MiniTube), la motilidad rápida se define dentro de parámetros cinemáticos específicos, donde la velocidad curvilínea ($\text{VCL} > 75 \mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea ($\text{VSL} > 60 \mu\text{m/s}$) y frecuencia de batido cruzado ($\text{BCF} > 25 \text{ Hz}$) se consideran para tener un valor de la motilidad rápida del espermatozoide

(Amann & Waberski, 2012). Con estos valores se correlaciona la fertilidad que llegan a tener los espermatozoides y predecir la tasa de concepción, considerando que la motilidad rápida es susceptible al estrés oxidativo durante procesos de manipulación y criopreservación.

h. Motilidad lenta

La motilidad lenta es un parámetro que se caracteriza por la presencia de movimientos progresivos a una velocidad reducida en relación a parámetros óptimos. Se considera que una motilidad lenta es para aquellos espermatozoides que se desplazan a velocidades inferiores a 20 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ con alcance de distancia cortas e ineficientes para atravesar el mucus cervical.

i. Motilidad circular

La motilidad en círculo es considerada como un patrón de movimiento anormal de los espermatozoides, caracterizado por una trayectoria rotatoria o en espiral, en lugar de un desplazamiento rectilíneo.

Cuando se presenta una motilidad en círculo suele ser asociado con una alteración estructural del flagelo que genera asimetría en el axonema o daños en la pieza intermedia, lugar donde se encuentran las mitocondrias; factores como desplazamiento de microtúbulos o daños en la membrana plasmática contribuyen a la aparición de este tipo de motilidad (Peris-Frau et al., 2020)

j. Motilidad local

La motilidad local en bovinos, es referida como un patrón de movimiento caracterizado por una actividad flagelar sin desplazamiento efectivo, donde los espermatozoides permanecen esencialmente en el mismo lugar.

Este parámetro se lo considera como un indicativo de alteraciones en la función

mitocondrial, estructura del flagelo, o en el medio seminal existan condiciones que generen daño celular leve (Raad et al., 2024).

Mediante la evaluación del CASA, se define que los espermatozoides con velocidad curvilínea inferior a 10 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ no poseen una capacidad de fertilización adecuada y, por tanto, tienen una eficiencia reproductiva inferior (Singh et al., 2016).

k. Inmovilidad

La inmovilidad espermática en los bovinos es considerada como un parámetro crítico en la evaluación del semen, que es definido cómo la ausencia total del movimiento flagelar, indicando una pérdida de la capacidad motriz y, por ende, del potencial fecundante del espermatozoide. Esta condición refleja que existieron factores cómo alteraciones metabólicas, daños estructurales en el flagelo o disrupción de la integridad de la membrana plasmática causando una muerte celular (Alvarenga et al., 2016)

Factores cómo el estrés térmico, estrés oxidativo y daños durante su manejo y posterior criopreservación pueden contribuir a un aumentó en la tasa de inmovilidad de espermatozoides de un toro (Ugur et al., 2019).

l. CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis)

El sistema CASA (Minitube.) es una tecnología avanzada de evaluación seminal automatizada que emplea la combinación de microscopía óptica, captura de imágenes digitales y un software especializado que analiza de forma objetiva y precisa múltiples parámetros espermáticos.

El sistema CASA, mide parámetros cinéticos como velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), linealidad (LIN), rectitud

(STR) y frecuencia de batido cruzado (BCF) junto a parámetros morfométricos; Además, parámetros como la subpoblación de espermatozoides de motilidad progresiva rápida y patrones de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), ayudan a tener una relación significativa con la fertilidad in vitro (Barquero et al., 2021). Con este sistema CASA, se logra consolidar de forma organizada parámetros que permiten tener la información clasificada para una selección y mejoramiento genético de reproductores.

Hipótesis

Ho: La mitocepción no produce mejoras significativas en los parámetros de viabilidad y funcionalidad espermática en semen fresco de bovino *Bos taurus* en comparación con semen fresco no tratado.

Ha: La mitocepción produce mejoras significativas en los parámetros de viabilidad y funcionalidad espermática en semen fresco de bovino *Bos taurus* en comparación con semen fresco no tratado.

Objetivos del estudio

Objetivo general:

Evaluar y analizar el efecto de la mitocepción sobre la calidad espermática en semen fresco de la raza *Bos taurus*, observando los cambios en sus parámetros a través de la comparación entre muestras tratadas y no tratadas.

Objetivos específicos:

1. Determinar la influencia de la mitocepción en los parámetros de concentración, motilidad total, progresiva e inmovilidad espermática mediante técnicas de análisis de esperma asistido por computadora (CASA).
2. Establecer cuál es la dosis efectiva mitocepción en la funcionalidad espermática para optimizar y potenciar la calidad espermática.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La sistematización para el procedimiento de extracción y aislamiento de mitocondrias consistió en

Aislamiento de mitocondrias provenientes de las CMM:

El cultivo de CMM y aislamiento de mitocondrias se realizó en el Laboratorio de la Escuela de Medicina de la USFQ por parte del equipo “Biomedical Discovery” antes de su exposición a los espermatozoides.

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Las CMM fueron aisladas desde la gelatina de Wharton (CMM-WJ) de origen humano y donadas por el Laboratorio del Dr. Maroun Khoury en la Universidad de los Andes en Chile. Las CMM se obtuvieron de cordones umbilicales de recién nacidos a término, con consentimiento informado y conforme a protocolos aprobados previamente. Las CMM-WJ se cultivaron en α -MEM (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino calificado (FBS), 1 % penicilina/estreptomicina. Se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad, y se subcultivaron con tripsina al 70–80 % de confluencia.

Aislamiento de mitocondrias de CMM-WJ

El aislamiento mitocondrial se efectuó según Cabrera et al. (2019) empleando el Mitochondria Isolation Kit for Tissue (Cat. 89801, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se procesaron $10\text{--}20 \times 10^6$ células donantes (marcadas o no con MitoTracker™ Red, dependiendo del ensayo). Tras la homogeneización y los pasos diferenciales indicados por el fabricante, se añadió una fase de purificación adicional: el pellet crudo se centrifugó a $3\,000 \times g$, 15 min, 4 °C, y el sobrenadante se descartó. Se repitió un segundo lavado con idénticos parámetros para eliminar restos del reactivo C del kit, garantizando la obtención de fracciones mitocondriales puras.

El pellet final se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo del donante sin suero. La concentración proteica mitocondrial se determinó mediante el ensayo Bradford (Pierce™ Coomassie Plus, Cat. 1856210, Thermo Fisher). Los rendimientos habituales oscilaron entre 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Las suspensiones se conservaron a 4 °C y se emplearon dentro de las 4 h siguientes en los experimentos de transferencia (MitoCeption).

Recolección del semen

La recolección del semen se llevó a cabo en la empresa Genética 3000, ubicado en el cantón Mejía, en julio de 2024 y enero de 2025.

Para la recolección de semen, se utilizó un protocolo de extracción de semen en toros probados de la raza *Bos taurus*. Posterior a la recolección, se evaluaron las características macroscópicas (pH, color, consistencia y olor) y microscópicas (movilidad en masa, movilidad progresiva y concentración espermática). Con base en el volumen y la concentración obtenida, las muestras fueron diluidas en el medio OptiXcell (IMV Technologies, España).

Primer ensayo (julio de 2024):

Se emplearon 5 mL de semen fresco diluido con OptiXcell (IMV Technologies, España) el cual fue mezclado con una concentración mitocondrial de 9.5 ng/ μ L, para ser distribuidos en tres grupos experimentales, con doce observaciones:

- **Control:** 0,5 mL de semen diluido.
- **Muestra 1 μ L:** 0,5 mL de semen + 1 μ L de suspensión mitocondrial.
- **Muestra 1,5 μ L:** 0,5 mL de semen + 1,5 μ L mitocondrias

Segundo ensayo (enero de 2025):

Se emplearon 10 mL de semen fresco diluido con OptiXcell (IMV Technologies, España) el cual fue mezclado con una concentración mitocondrial de 37 ng/ μ L, para ser distribuidos en cuatro grupos, con cuatro observaciones

- **Control:** 2,5 mL de semen diluido.
- **Muestra 0,5 μ L:** 2,5 mL de semen + 0,5 μ L de mitocondrias.
- **Muestra 1 μ L:** 2,5 mL de semen + 1 μ L de mitocondrias.
- **Muestra 1,5 μ L:** 2,5 mL de semen + 1,5 μ L de mitocondrias.

Todas las muestras fueron centrifugadas a $500 \times g$ durante 5 minutos. Posteriormente, se analizaron con el sistema CASA (Microtube), evaluando 10 campos por muestra para determinar los parámetros espermáticos.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media $\pm$ DE. La comparación entre grupos (control vs. UVR) se realizó con prueba t de Student o U de Mann-Whitney según la normalidad (Shapiro-Wilk), usando GraphPad Prism v10.3.1; $p < 0,05$ se consideró significativo.

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos se condujeron conforme a la Declaración de Helsinki y la normativa ecuatoriana vigente. El Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito (CEISH-USFQ) revisó el protocolo y determinó que no requería aprobación adicional (N.º 065IN-2021-CEISH-USFQ, 7 mayo 2021) para la extracción de mitocondrias y uso de las mismas.

4. RESULTADOS

Los resultados del presente estudio se establecieron sobre 9 parámetros de la calidad espermática de toros probados; se evaluaron y analizaron estadísticamente con base en la variable dependiente e independiente. Posteriormente se valoró su relación en significancia estadística. De acuerdo con el análisis obtenido entre el primer (Figura 1) y segundo ensayo (Figura 2), se observaron coincidencias y variaciones relevantes en los niveles de significancia estadística.

En ambos ensayos, el número total de espermatozoides (Fig. 1a) (Fig. 2j) presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), La concentración espermática, en cambio, mostró un comportamiento diferencial: mientras que en el primer ensayo (Fig. 1b) no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), en el segundo ensayo (Fig. 2k) evidenció una diferencia significativa ($p < 0.05$),

En cuanto a la motilidad lenta (Fig. 1f) (Fig. 2o) y motilidad local (Fig. 1g) (Fig. 2p), ambas mostraron diferencias significativas ($p<0,05$) en el segundo ensayo, aunque solo la motilidad lenta fue significativa en el primer ensayo.

En cuanto a la motilidad circular (Fig. 1h) (Fig. 2q) en ambos ensayos, la muestra control presentó los resultados significativos más favorables. Por su parte, la motilidad total (Fig. 1c) (Fig. 2ll), la motilidad progresiva (Fig. 1d) (Fig. 2m) y la inmovilidad espermática (Fig. 1i) (Fig. 2r) revelaron diferencias significativas ($p<0.05$) en ambos ensayos, Finalmente, la motilidad rápida (Fig. 1e) (Fig. 2n) no presentó diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos ensayos ($p<0.05$).

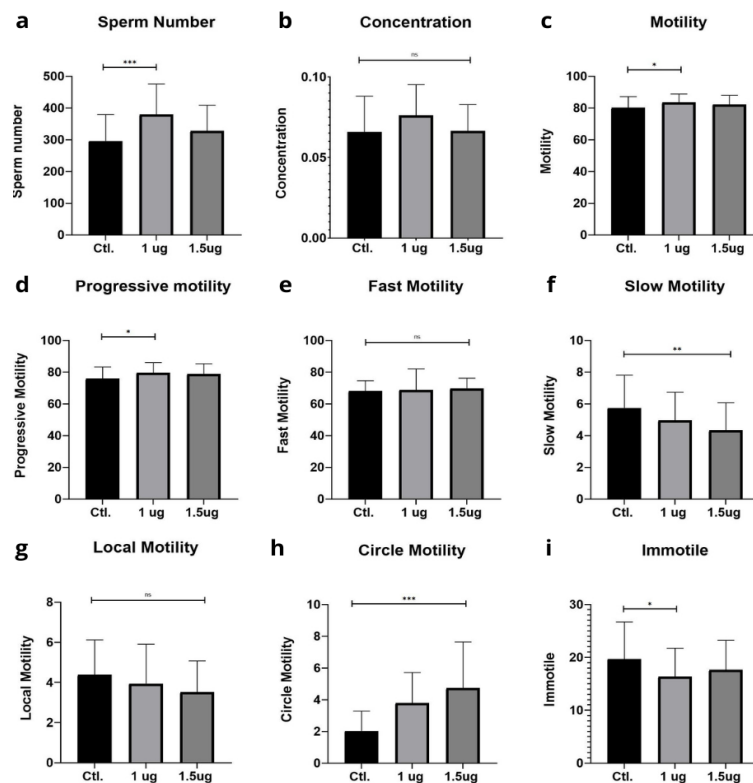


Figura 1: Análisis estadístico y evaluación de las muestras tratadas con mitocondrias y sin mitocondrias del primer ensayo. Número total de espermatozoides con diferencia estadística significativa para la muestra 1 μL ; b. Concentración espermática sin diferencias estadísticamente significativas; c. Motilidad espermática total con diferencia estadística significativa para 1 μL ; d. Motilidad progresiva con diferencia estadística significativa para 1 μL ; e. Motilidad rápida sin diferencias estadísticamente significativas; f. Motilidad lenta con diferencia estadística significativa para muestra 1,5 μL ; g. Motilidad local sin diferencias estadísticamente significativas; h. Motilidad circular con diferencia estadística significativa para muestra control; i. Inmovilidad espermática con diferencia estadística significativa para muestra 1 μL .

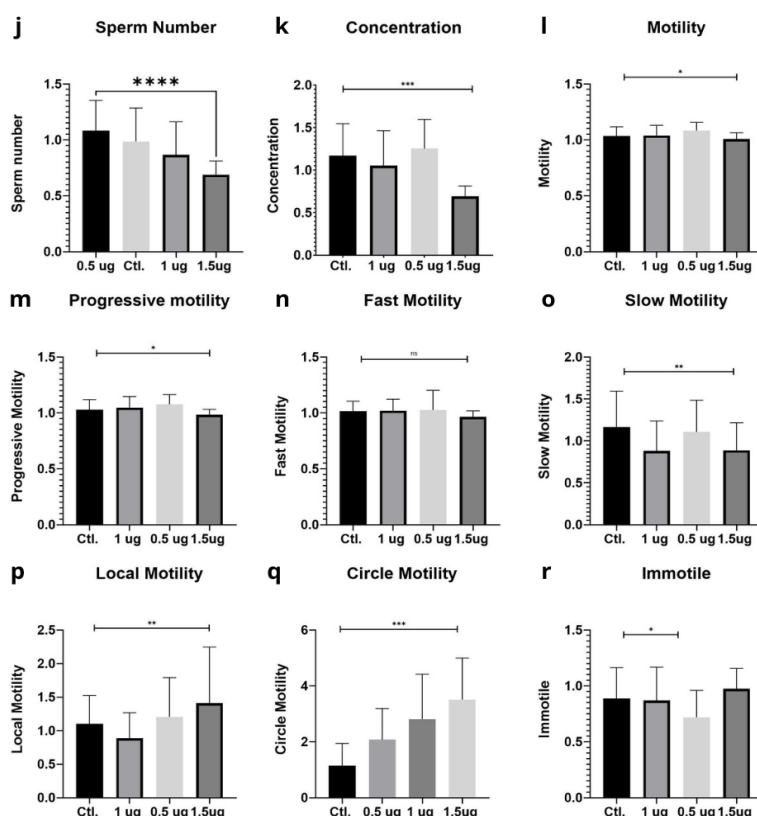


Figura 2: Análisis estadístico y evaluación de las muestras tratadas con mitocondrias y sin mitocondrias del segundo ensayo. j. Número total de espermatozoides con diferencia estadística significativa para muestra 0.5 μL ; k. Concentración espermática con diferencias estadística significativas para muestra 0.5 μL ; l. Motilidad espermática total con diferencia estadística significativa a para muestra 0.5 μL ; m. Motilidad progresiva con diferencia estadística significativa a para muestra 0.5 μL ; n. Motilidad rápida sin diferencias estadísticamente significativas para muestra 0.5 μL ; o. Motilidad lenta con diferencia estadística significativa a para muestra 1 μL ; p. Motilidad local con diferencias estadística significativas a para muestra 1 μL ; q. Motilidad circular con diferencia estadística significativa para muestra control; r. Inmovilidad espermática con diferencia estadística significativa a para muestra 0.5 μL .

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se ofrece una evaluación del efecto de la mitocepción sobre la calidad espermática en semen fresco de toros probados de raza *Bos taurus* sobre nueve parámetros estudiados. Se utilizaron diferentes concentraciones de mitocondrias (0.5 μL , 1 μL de suspensión mitocondrial, 1 μL , 1.5 μL), que, al ser comparados, los resultados obtenidos reflejan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en diversos parámetros que podrían tener implicaciones en la reproducción bovina.

Los resultados obtenidos reflejan que la adición de mitocondrias tuvo un impacto en el parámetro de número de espermatozoides, especialmente en la muestra 1 μL del primer ensayo y en la muestra 0.5 μL del segundo ensayo con diferencia significativa. Esto coincide con Caicedo et al. (2017) en la incorporación de mitocondrias funcionales

pueden restaurar la bioenergía celular y potencial el funcionamiento celular.

La motilidad total y progresiva espermática presentó diferencia significativa en las muestras tratadas tanto con 1 μ L de suspensión mitocondrial y 0.5 μ L, de la primera ensayo y en el segundo ensayo respectivamente, esto podría sugerir que son las concentraciones óptimas para una suplementación mitocondrial y reflejar una congruencia entre una relación directa entre la funcionalidad mitocondrial y los patrones de motilidad espermática en bovinos (Morales y Meyer, 2018).

En cuanto a motilidad rápida, no presentó una diferencia significativa entre las muestras tratadas y no tratadas, tanto en el primer y segundo ensayo, lo que podría indicar que la mitocepción no beneficia al espermatozoide para incrementar su motilidad.

Los parámetros, indicativos de un problema en la motilidad del espermatozoide, arrojaron resultados interesantes. En la motilidad lenta, se presentó una diferencia significativa para la muestra 1.5 μ L y 1 μ L, del primer y segundo ensayo, con los valores más bajos en comparación al resto de muestras. Esto podría estar relacionado con la explicación de Contri et al. (2019) hacia la atribución de mitocondrias como fuente de ATP a través de la fosforilación oxidativa para sostener la motilidad flagelar y prolongar su funcionalidad metabólica.

En cuanto a la motilidad local, se observó una diferencia significativa solamente en el segundo ensayo, en la muestra 1 μ L, como el valor que presenta una menor alteración en la funcionalidad mitocondrial o relacionada al flagelo (Farrell et al., 1998).

En contraste, la movilidad circular se presentó una diferencia significativa para las muestras control en ambos ensayos, lo que podría indicar que la adición de mitocondrias, para este parámetro, aumenta la predisposición a sufrir alteraciones en el patrón de movimiento y como Martinez-Rodero et al., (2020) en su estudio asocian a este tipo de motilidad como defectos estructurales en el flagelo y, por tanto, disminución en la fertilidad.

Finalmente, el parámetro de inmovilidad presentó diferencias significativas para las muestras 1 μL , y 0.5 μL , en el primer y segundo ensayo, respectivamente. La reducción en la inmovilidad de los espermatozoides es explicada por Rodríguez-Gil y Bonet (2016) al haber demostrado que si los espermatozoides son suplementados con energía adicional se puede prolongar la viabilidad y funcionalidad espermática.

Un hallazgo notable dentro del estudio es en las diferencias sobre la dosificación de mitocondrias, donde las muestras tratadas con 1 μL de suplementación mitocondrias y 0.5 μL obtuvieron los resultados más destacados.

Esto podría indicar que existe un equilibrio delicado en la suplementación mitocondrial, donde concentraciones excesivas podrían desencadenar mecanismos de retroalimentación negativa a nivel celular, limitando los beneficios o incluso generando efectos contraproducentes.

Islam et al. (2021) mencionan en su investigación que el ATP mitocondrial es activado conjuntamente con ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) generando un daño a la mitocondria por el estrés oxidativo, significando que a mayor cantidad de mitocondrias mayor daño celular se producirá.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio sugieren que la mitocepción tiene efectos variables, pero potencialmente beneficiosos sobre la calidad espermática en semen fresco de bovino *Bos taurus*. Los parámetros como motilidad total, progresiva y en la reducción de inmovilidad mostraron especial relevancia. Sin embargo, estos efectos son dependientes a la concentración de mitocondrias utilizadas y presentan variabilidad entre muestras.

Estos hallazgos aportan información valiosa para el desarrollo de nuevas estrategias de mitocepción a futuro y para la optimización en la reproducción bovina.

Uso de inteligencia artificial

El uso de inteligencia artificial mediante herramientas como ChatGPT y Claude fueron utilizadas para el mejoramiento de la sintaxis y corrección gramatical del texto, sin intervenir en la elaboración del contenido académico.

Recomendaciones

Al ser un estudio centrado en los parámetros de calidad espermática y los efectos que tiene la mitocepción sobre los espermatozoides, presenta ciertas limitaciones que deben ser consideradas. Debido a tiempo y disponibilidad, es necesario realizar una evaluación de fertilidad y el efecto que pudo haber tenido la criopreservación para analizar la fertilidad del estudio. Además, se requiere de estudios complementarios para validar su aplicabilidad práctica y establecer protocolos estandarizados de mitocepción para maximizar los beneficios observados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbaiza-Barnechea, M. D., & Cabrera-Villanueva, P. C. (2021). Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 13(1), e787.
<https://doi.org/10.24188/recia.v13.n1.2021.787>
- Almadaly, E. A., Abdel-Salam, A. S., Sahwan, F. M., Kahilo, K. A., Abouzed, T. K., & El-Domany, W. B. (2023). Fertility-associated biochemical components in seminal plasma and serum of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Frontiers In Veterinary Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1043379>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Ramires Neto, C. (2016). Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(3). 521-530.
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2012). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Barquero, Vinicio, Sevilla, Francisco, Calderón-Calderón, Josué, Madrigal-Valverde, Mónica, Camacho, Marlen, Cucho, Hernán, & Valverde, Anthony. (2021). Condiciones óptimas del análisis CASA-Mot del semen de verraco: efecto de la tasa de fotogramas para diferentes cámaras y campos de recuento espermático. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5), e19832. Epub 27 de octubre de 2021. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.1982>
- Balcázar, M., Cañizares, S., Borja, T., Pontón, P., Bisiou, S., Carabasse, E., Bacilieri, A., Canavese, C., Diaz, R. F., Cabrera, F., & Caicedo, A. (2020). Bases for treating skin aging with artificial mitochondrial transfer/transplant (AMT/T). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 919.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00919>
- Berridge, M. V., Zobalova, R., Boukalova, S., Caicedo, A., Rushworth, S. A., & Neuzil, J. (2025). Horizontal mitochondrial transfer in cancer biology: Potential clinical relevance. *Cancer Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2025.03.002>
- Bucci, D., Spinaci, M., Bustamante-Filho, I. C., & Nesci, S. (2022). The sperm mitochondria: clues and challenges. *Animal Reproduction*, 19(4). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2022-0131>

- Bulla-Arias, E. M., Montoya-Andrade, K. P., Munevar-Romero, M. D., & Ulloa-Torres, S. (2023). Análisis de la correlación entre las características fenotípicas y seminales en toros reproductores *Bos indicus*. *Ciencia y Agricultura*, 20(3), 16776. <https://doi.org/10.19053/01228420.v20.n3.2023.16776>
- Bradley, & Klein. (2020). Fisiología reproductiva del macho. En *Cuningham Fisiología veterinaria* (6.^a ed., p. 453). Elsevier.
- Cabrera, F., Castañeda, V., Morales, E., Velarde, F., Ortega, M., Leon-Sosa, A., Jorgensen, C., & Caicedo, A. (2022). Early evidence of the artificial transfer/transplant of mitochondria to oocytes and zygotes by MitoCeption. *Mitochondrion*, 65, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2022.05.006>
- Cabrera, F., Ortega, M., Velarde, F., Parra, E., Gallardo, S., Barba, D., Soto, L., Peña, G., Pedroza, L. A., Jorgensen, C., Khoury, M., & Caicedo, A. (2019). Primary allogeneic mitochondrial mix (PAMM) transfer/transplant by MitoCeption to address damage in PBMCs caused by ultraviolet radiation. *BMC Biotechnology*, 19(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0534-6>
- Caicedo, A., Fritz, V., Brondello, J., Ayala, M., Dennemont, I., Abdellaoui, N., De Fraipont, F., Moisan, A., Prouteau, C. A., Boukhaddaoui, H., Jorgensen, C., & Vignais, M. (2015). MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep09073>
- Caicedo, A., Aponte, P. M., Cabrera, F., Hidalgo, C., & Khoury, M. (2017). Artificial mitochondria transfer: current challenges, advances, and future applications. *Stem Cells International*, 2017, 7610414. <https://doi.org/10.1155/2017/7610414>
- Caicedo, A., Morales, E., Moyano, A., Peñaherrera, S., Peña-Cisneros, J., Benavides-Almeida, A., Pérez-Meza, Á. A., Haro-Vinueza, A., Ruiz, C., Robayo, P., Tenesaca, D., Barba, D., Zambrano, K., Castañeda, V., & Singh, K. K. (2024). Powering prescription: Mitochondria as “Living Drugs” - Definition, clinical applications, and industry advancements. *Pharmacological Research*, 199, 107018. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.107018>
- Caicedo, A., & Singh, K. K. (2024). Mitochondria makeover: unlocking the path to healthy longevity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 28(6), 477–480. <https://doi.org/10.1080/14728222.2023.2277240>

- Caicedo, A., Zambrano, K., Sanon, S., Luis Vélez, J., Montalvo, M., Jara, F., Moscoso, S. A., Vélez, P., Maldonado, A., & Velarde, G. (2021). The diversity and coexistence of extracellular mitochondria in circulation: A friend or foe of the immune system. *Mitochondrion*, 58, 270–284.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.02.014>
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., & Carluccio, A. (2019). *Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa*. *Theriogenology*, 72(5), 627-635.
- Díaz, H. P. V., Espinoza, J. E. P., & Malca, E. A. (2020). Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(4), 1611-1618. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17159>
- Gu, N., Zhao, W., Wang, G., & Sun, F. (2019). Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproductive Biology And Endocrinology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0510-y>
- Khattar, K. E., Safi, J., Rodriguez, A.-M., & Vignais, M.-L. (2022). Intercellular Communication in the Brain through Tunneling Nanotubes. *Cancers*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/cancers14051207>
- Morales, C. R., & Meyers, S. (2018). The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal Reproduction Science*, 194, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.024>
- Peñaherrera, S., Ruiz, C., Castañeda, V., Livingston, K., Barba, D., Burzio, V. A., Caicedo, A., & Singh, K. K. (2023). Exploring the role of mitochondria transfer/transplant and their long-non-coding RNAs in regenerative therapies for skin aging. *Mitochondrion*, 70, 41–53.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.02.012>
- Peris-Frau, P., Soler, A. J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D. A., Fernández-Santos, M. R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Montoro, V., & Garde, J. J. (2020). Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(8), 2781. <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>
- Raad, M. V., Firouzabadi, A. M., Niaki, M. T., Henkel, R., & Fesahat, F. (2024). The impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology And Endocrinology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-024-01252-4>

- Rodríguez-Gil, J. E., & Bonet, S. (2015). Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, 85(1), 4-11.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.005>
- Saavedra, G. D., Mas, A., Sanes, J. M., Vallejo, P., Matas, C., & Seva, J. I. (2012). Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos postmortem en el toro de lidia. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 28(0). <https://doi.org/10.6018/j/188671>
- Salgado Otero, R., Vergara Avilez, M., & Vergara Garay, O. (2015). Impacto de la Utilización de Inseminación Artificial con Detección de Celo e Inseminación Artificial a Término Fijo en Vacas Mestizas Manejadas Bajo el Sistema Doble Propósito. *Revista Científica*, XXV(1), 57-62.
- Singh, R. K., Kumaresan, A., Mir, M. A., Kumar, P., Chhillar, S., Tripathi, U. K., Rajak, S. K., Nayak, S., & Mohanty, T. K. (2016). Computer assisted sperm analysis: Relationship between the movement characteristics of buffalo spermatozoa and sire fertility. *Indian Journal Of Animal Research*, OF.
<https://doi.org/10.18805/ijar.10768>
- Ugur, M. R., Abdelrahman, A. S., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers In Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Velarde, F., Castañeda, V., Morales, E., Ortega, M., Ocaña, E., Álvarez-Barreto, J., Grunauer, M., Eguiguren, L., & Caicedo, A. (2020). Use of human umbilical cord and its byproducts in tissue regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 117.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00117>
- Vignais, M.-L., Caicedo, A., Brondello, J.-M., & Jorgensen, C. (2017). Cell connections by tunneling nanotubes: effects of mitochondrial trafficking on target cell metabolism, homeostasis, and response to therapy. *Stem Cells International*, 2017, 6917941. <https://doi.org/10.1155/2017/6917941>
- Von Frey, G. W., Vidal, M. R., María, S. A. S., & De los Reyes, S. M. (1988). Penetración de espermatozoos bovinos en mucus cervical y su relación con algunas características seminales en diferentes sistemas de descongelación. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 3(2).
<https://doi.org/10.5354/acv.v3i2.4507>

Zoca, G. B., Celeghini, E. C. C., Pugliesi, G., De Carvalho, C. P. T., Assumpção, M. E. o. D., Siqueira, A. F. P., Oliveira, L. Z., Lançoni, R., & De Arruda, R. P. (2021). Influence of seminal plasma during different stages of bovine sperm cryopreservation. *Reproduction In Domestic Animals*, 56(6), 872-883. <https://doi.org/10.1111/rda.13928>

GLOSARIO

Tabla 1

Definiciones de términos utilizados en el estudio

<i>Término</i>	Definición
CASA	Sistema computarizado que analiza de forma automática y precisa la motilidad y calidad del esperma.
Criopreservación	Conservación de células o tejidos a muy bajas temperaturas para mantener su viabilidad a largo plazo.
Inmuno-afin	Técnica que utiliza anticuerpos para aislar o purificar moléculas específicas.
Mitocepción	Incorporación de mitocondrias externas en células receptoras para mejorar su función celular.
ROS	Moléculas inestables que pueden dañar células al generar estrés oxidativo.