

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITO DA ADIÇÃO DE COENZIMA Q10 E MELATONINA EM DILUENTE
PROPOSTO PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

STELLA MARIS TEOBALDO TIRONI

BOTUCATU - SP

Janeiro/2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MELATONINA E COENZIMA Q10 EM DILUENTE
PROPOSTO PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Dra. Eunice Oba

BOTUCATU - SP

Janeiro/2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Tironi, Stella Maris Teobaldo.

Efeito da adição de coenzima Q10 e melatonina em diluente proposto para congelação de sêmen ovino / Stella Maris Teobaldo Tironi. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Maria Inês Lenz Souza

Capes: 50504002

1. Antioxidantes. 2. Carneiros. 3. Inseminação artificial. 4. Prenhez. 5. Análise do sêmen.

Palavras-chave: Antioxidante; Carneiro; Inseminação artificial; Prenhez; Qualidade seminal.

STELLA MARIS TEOBALDO TIRONI

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MELATONINA E COENZIMA Q10 EM
DILUENTE PROPOSTO PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Membro e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

Membro

Reprodução Animal - Departamento de Medicina Veterinária
UEM - Umuarama - PR

Prof. Dr. Alberto Lopes Gusmão

Membro

Reprodução Animal - Departamento de Zootecnia
UFBA - Salvador - BA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ/UNESP - Botucatu - SP

Data da defesa: 26 de novembro de 2021.

DEDICATÓRIA

A realização do doutorado exige extrema capacidade de proatividade, conhecimento, espírito de liderança e, com certeza, capacidade de adaptação, frente aos desafios e impossibilidades que vão ocorrendo durante o percurso. Dedico essa tese a todas as pessoas que, emocional e/ou profissionalmente contribuíram com meu crescimento, para que mais esse objetivo fosse alcançado, trazendo consigo muitos aprendizados. E o aprendizado é uma das poucas coisas que jamais poderão tirar de nós.

Um dia perguntaram a um rapaz o que significava sucesso. E ele respondeu: “Sucesso, para mim, é você deitar na cama todos os dias da sua vida sabendo que você fez o seu melhor”.

Joel Jota

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, fonte única e inesgotável de paz e sabedoria. Juntamente, agradeço aos **meus pais**, Cesar Roberto Tavares Tironi e Ivone Teobaldo Tironi, que desde pequenininha me implantaram a sementinha do “você consegue, você é capaz”. E a toda **minha família**, por todo apoio, desde a tomada de decisão, com diversos incentivos, viagens para me ver, demonstrações de amor e carinho. Em especial, minhas tias **Maria Elisa Teobaldo** e **Cecília Teobaldo** e minha sábia irmã mais velha, **Lia Mara Teobaldo Tironi** que, por tanto me conhecer, soube exatamente o que dizer quando o medinho batia em mim.

A toda equipe do **Laboratório de Endocrinologia** ao qual fui vinculada: Alessandra, Andressa, Bibi, Edjalma, Letícia, Luan, Lucas, Nayara, Suzane e Vivi. Muito obrigada por toda ajuda e amparo. Chegar a um local novo, sem saber de nada, nem conhecer ninguém não é das mais fáceis missões. E vocês, sempre que eu precisava, iam me mostrando o caminho.

Ao **Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal** da UNESP, não só pelas ótimas instalações, laboratórios e equipamentos. Mas também todos os professores e funcionários, que prontamente sempre me auxiliavam, quando necessário.

Aos professores **Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez**, **Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro** e **Prof. Dr. Pedro Paulo Maia Teixeira**, pela recomendação e encorajamento, para que este doutorado fosse iniciado. E também, em especial, à professora **Prof^a. Dr.^a Maria Inês Lenz Souza**, agora também minha coorientadora, pela gigante confiança depositada em mim.

Prof^a. Dr.^a. Eunice Oba, obrigada pelos puxões de orelha, obrigada por todo tempo e dinheiro investido em mim. Com a sua orientação, eu aprendi a voar, sem medo, arriscar, e fazer o meu melhor. Muito obrigada.

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, que tanto me ajudou no delineamento experimental do meu trabalho, tenho certeza que se algo aqui deu certo, muita responsabilidade está atribuída aos seus conselhos iniciais.

Prof. Dr. Rogério Antonio de Oliveira, agradeço pelo tempo dedicado ao delineamento experimental e análise estatística do meu projeto, pontos cruciais também para bons resultados.

Prof. Dr. Renan Denadai e Prof. Dr. José Antonio Della'Aqua Junior, saibam que vocês também foram indispensáveis, detalhando cada ponto, para que o meu projeto tivesse bom delineamento e metodologia. Sempre prontos a ajudar, me dando suporte, para que eu encontrasse possíveis erros e não desistisse antes de fazer o melhor possível.

A **Prof^a Dr^a Camila Freitas Dell'Aqua** pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo e por toda ajuda durante o experimento.

Senhor Helcio Souza, Adriele Mendes Nogueira e Julio Zangarelli, da Fazenda Monjolão, não há palavras para agradecer tamanho apoio de vocês, não só em ceder os animais utilizados no experimento, mas por não pouparem sequer esforço em colaborar com a realização do mesmo.

Agradeço a todos da **Banca de Qualificação e Defesa** por terem aceitado participar e colaborar com este experimento.

Agradeço também ao **Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC)** da ESALQ/USP - Piracicaba, que não só disponibilizaram os animais para a inseminação artificial, como também fizeram história em minha vida, por contar com uma equipe ímpar de trabalho. Tenho certeza que todos ali terão um futuro brilhante.

E claro, meu imenso agradecimento à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001** pelo financiamento da bolsa durante o processo de doutorado e à **Botupharma Indústria e Comércio de Produtos Veterinários** pela doação dos diluentes e todo apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	06
CAPÍTULO 1 - ADIÇÃO DE COENZIMA Q10 E MELATONINA EM DILUENTE PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO	08
1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Espécies reativas de oxigênio e função espermática.....	10
2.2 Antioxidantes.....	12
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
4. REFERÊNCIAS	15
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo geral.....	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO 2 - Adição de coenzima Q10 e melatonina em diluente seminal de ovinos	19
Resumo	20
1. Introdução	21
2. Material e métodos	21
2.1 Amostras.....	22
2.2 Diluição seminal e delineamento experimental.....	22
2.3 Congelação de sêmen.....	23
2.4 Avaliação espermática	23
2.5 Análise estatística.....	23
3. Resultados	23
4. Discussão	25
Referências	27
Use of coenzyme Q-10 in semen freezing and its effect on sperm quality and pregnancy rate in sheep	29
Abstract	29
1. Introduction	30
2. Material and methods	30
2.1 Animals.....	31
2.2 Seminal collection.....	31

2.3 Seminal dilution.....	31
2.4 Seminal freezing.....	31
2.5 Sperm evaluation.....	32
2.6. Fertility test.....	32
2.6.1 Females.....	32
2.6.2 Synchronization protocol.....	33
2.6.3 Artificial insemination.....	33
2.6.4 Pregnancy diagnosis.....	33
2.7 Statistical analysis.....	34
3. Results.....	34
4. Discussion.....	38
Referências.....	39

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores obtidos pelo CASA de motilidade total (MT) do sêmen descongelado nos momentos 0, 1, 2 e 3h, incubados a 37°C de 2 carneiros com 5 ejaculados de cada (n=10).....24

Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores obtidos pelo CASA de motilidade progressiva (MP) do sêmen descongelado nos momentos 0, 1, 2 e 3h, incubados a 37°C de 2 carneiros com 5 ejaculados de cada (n=10).....24

Tabela 3. Média e desvio padrão dos valores obtidos pelo CASA de porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) do sêmen descongelado nos momentos 0, 1, 2 e 3h, incubados a 37°C de 2 carneiros com 5 ejaculados de cada (n=10).....24

Artigo 2

Table 1. Mean of thawed semen parameters evaluated by CASA at 0h and 2h moments, incubated at 37°C of 8 rams with 3 ejaculates each (n=24).....35

Table 2. Mean and standard deviation, per animal, of thawed semen of 8 rams with 3 ejaculates each (n=24), considering the average of all treatments and moments evaluated by CASA.....36

Table 3. Mean and standard error of thawed semen of 8 rams with 3 ejaculates each (n=24), evaluated by flow cytometry, at 0 e 2h moments, incubated at 37°C, considering the average number of animals per treatment.....37

Table 4. Pregnancy percentage and frequency of 198 ewes inseminated by laparoscopy, demonstrated by treatment and by ram.....38

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1.** Formação do radical superóxido (O_2^-) a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio (O_2).....11
- Figura 2.** Esquema da formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da superóxido dismutase (SOD)11
- Figura 3.** Formação do radical hidroxil ($OH\cdot$) pela reação de Fenton.....12
- Figura 4.** Formação do radical hidroxil ($OH\cdot$) pela reação de Haber-Weiss.....12

LISTA DE ABREVIÇÕES

µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ALH	Amplitude lateral da cabeça
BCF	Frequência de batimento de cauda
CASA	Sistema computadorizado de análise espermática
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
LIN	Linearidade
LPO	Lipoperoxidação
MDA	malondialdeído
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitro
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
P4	Progesterona
RAP	Porcentagem de espermatozoides rápidos
SC	Subcutânea
STR	Retilinearidade
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TTR	Teste de termoresistência
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade linear

RESUMO

Stella Maris Teobaldo Tironi. EFEITO DA ADIÇÃO DE COENZIMA Q10 E MELATONINA EM DILUENTE PROPOSTO PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO. Botucatu, 2022. 41 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, SP, Universidade Estadual Paulista.

Durante a congelação seminal o estresse oxidativo pode influenciar negativamente a qualidade espermática. O objetivo desse experimento foi observar o efeito da adição de Coenzima Q10 (CoQ10) e Melatonina no diluente seminal sobre a qualidade espermática e taxa de prenhez em ovinos. Experimento 1: Foram utilizados o ejaculado de 2 carneiros mestiços, em 5 repetições, formando 7 tratamentos: Controle (diluente puro), C1 (0,175mM de CoQ10), C3 (0,35mM de CoQ10), C7 (0,7mM de CoQ10), M0,5 (0,5mM de melatonina), M1 (1mM de melatonina), M2 (2mM de melatonina). O sêmen foi avaliado pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA) nos momentos 0, 1, 2 e 3h, considerando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP). Experimento 2: Foram utilizados os ejaculados de 8 carneiros da raça Dorper, em triplicata, testando-se 4 tratamentos: Controle (diluente puro), C1 (0,175mM de CoQ10), C3 (0,35mM de CoQ10) e C7 (0,7mM de CoQ10). Foi realizada análise espermática completa pós-descongelação pelo CASA e análise de integridade e estabilidade de membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, potencial mitocondrial e produção de ânions superóxido por citometria de fluxo, nos momentos 0 e 2h. Foram inseminadas 198 ovelhas por meio de laparoscopia, divididas em dois tratamentos: controle (n=98) e C7 (n=100), com posterior diagnóstico de gestação. No experimento 1, todos os tratamentos foram estatisticamente inferiores ao controle para o parâmetro MT. Para os parâmetros MP e RAP, C1 mostrou-se estatisticamente igual ao controle, e os demais tratamentos foram estatisticamente inferiores, quando comparados ao controle. Todos os tratamentos de Melatonina foram significativamente inferiores, para todos os parâmetros avaliados, em todos os momentos. Com relação aos momentos, foi observado diferença entre todos os momentos de avaliação, para todos os parâmetros com queda linear entre os momentos. Conclui-se que os tratamentos de CoQ10 foram ligeiramente superiores aos de Melatonina. No experimento 2, os parâmetros MT, VAP e RAP do controle demonstraram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os momentos 0h e 2h. C3 mostrou-se superior estatisticamente para o parâmetro VAP, analisado pelo CASA. Os animais 4, 7 e 8 demonstraram-se superiores para os parâmetros MT, MP e RAP, sendo selecionados para a etapa de inseminação artificial. No momento 0h da citometria de fluxo, C7 demonstrou maior porcentagem de células com alto potencial mitocondrial ($p < 0,05$). No momento 2h, C1 e C7 foram estatisticamente superiores e C3 inferior, comparados ao controle. Foi observada maior taxa de prenhez para C7 (52%) quando comparado ao controle (38%). Conclui-se que a CoQ10 é capaz de proteger a célula espermática e, conseqüentemente, aumentar a taxa de prenhez em ovinos.

Palavras-chave: antioxidante; carneiro; inseminação artificial; prenhez; qualidade seminal; sêmen congelado.

ABSTRACT

Stella Maris Teobaldo Tironi. COENZYME Q10 AND MELATONIN EFFECTS IN SEMINAL EXTENDER ON RAM SEMEN FREEZING. Botucatu, 2022. 41 f. Thesis (Doctoral). São Paulo State University (Unesp), College of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus Botucatu, São Paulo.

Oxidative stress can affect sperm quality during freezing. The aim of this experiment was to observe the effect of Coenzyme Q10 (CoQ10) and Melatonin addition in seminal extender on the sperm quality and pregnancy rate in sheep. Experiment 1: Ejaculates of 2 crossbred rams were used in 5 repetitions, forming 7 treatments: Control (pure seminal extender), C1 (0,175mM of CoQ10), C3 (0,35mM of CoQ10), C7 (0,7mM of CoQ10), M0,5 (0,5mM of melatonin), M1 (1mM of melatonin), M2 (2mM of melatonin). Semen was evaluated by computer-assisted sperm analysis (CASA) at 0, 1, 2 and 3h, considering total motility (TM), progressive motility (PM) and percentage of rapid spermatozoa (PRS). Experiment 2: Ejaculates of 8 Dorper rams were used in triplicate, testing 4 treatments: Control (pure seminal extender), C1 (0,175mM of CoQ10), C3 (0,35mM of CoQ10) and C7 (0,7mM of CoQ10). Complete sperm analysis was performed after thawing by CASA and analysis of integrity and stability of plasma and acrosomal membranes, lipid peroxidation, mitochondrial potential and superoxide anions production by flow cytometry at 0 and 2h. Altogether, 198 ewes were inseminated by laparoscopy, divided into two treatments: control (n=98) e C7 (n=100), with subsequent pregnancy diagnosis. In experiment 1, all treatments were statistically inferior to control for TM parameter. Group C1 was statistically equal to control and other treatments were statistically inferior when compared to control for parameters PM and PRS. All treatments with melatonin were significantly lower, for all parameters evaluated at all moments. Regarding the moments, a difference was observed between all the evaluation moments for all parameters with a linear fall between the moments. It is concluded that CoQ10 were slightly superior to those of melatonin. In experiment 2 the parameters of TM, VAP and PRS of control group showed a statistical difference ($p < 0,05$) between moments 0 and 2h. C3 group was statistically superior for the VAP parameter, analyzed by CASA. Animals 4, 7 and 8 were superior for the parameters TM, PM and PRS, being selected for artificial insemination stage. At moment 0h in flow cytometry, C7 group showed a higher percentage of cells with high mitochondrial potential ($p < 0,05$). At 2h, C1 and C7 groups were statistically higher and C3 lower compared to the control. A higher pregnancy rate was observed for C7 (52%) when compared to the control (38%). It is concluded that CoQ10 is able to protect sperm cell and increase the pregnancy rate in sheep consequently.

Keywords: antioxidant; RAM; artificial insemination; pregnancy rate; seminal quality; frozen semen.

CAPÍTULO 1

ADIÇÃO DE COENZIMA Q10 E MELATONINA EM DILUENTE PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

1. INTRODUÇÃO

O espermatozoide ovino possui grande sensibilidade ao choque térmico, sendo que apenas 40-50% destes resistem ao processo de congelação/descongelação (WATSON, 2000). Isso ocorre devido a maior taxa de ácidos graxos poli-insaturados e saturados, responsáveis pela fluidez da membrana plasmática, fazendo com que a relação colesterol-fosfolipídios seja menor nessa espécie. Esse fato faz com que o espermatozoide sofra maior injúria e desorganização da membrana durante o processo de congelação, além de ficar mais susceptível à atuação de radicais livres (BICUDO et al., 2009).

Essa dificuldade em manter a célula espermática com potencial fertilizante após o processo de congelação advém de algumas características como a mudanças na estrutura e função dessas células durante e após a congelação. Algumas das características afetadas nesse processo são: motilidade, atividade respiratória, *status* da membrana celular e a qualidade do DNA.

Alguns desses danos físicos e químicos que ocorrem na membrana espermática são decorrentes da peroxidação lipídica realizada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (BÜYÜKLEBLEBICI et al., 2014), que são necessárias para o funcionamento celular, participando de processos importantes, como a capacitação e hiperativação espermáticas, reação acrossomal e interação espermato-ocitária. Entretanto, a geração de altas concentrações de ROS no sêmen está associada a alterações no funcionamento celular, declínio da qualidade espermática e fragmentação do DNA.

Sendo assim, deve se avaliar substâncias que inibam ou minimizem o estresse oxidativo, como por exemplo, os antioxidantes, capazes de inibir, reduzir, prevenir ou interceptar a oxidação ou reparar a ação dos oxidantes e, conseqüentemente, aumentar a capacidade fecundante dos espermatozoides (COSTA et al., 2016), tais como a Coenzima Q10 e a Melatonina.

A Coenzima Q10 (CoQ10) é solúvel em gordura e representa um importante antioxidante lipídico na cadeia respiratória mitocondrial. Isso pois a CoQ10 fornece fosfolipídios na membrana celular e protege a membrana plasmática do espermatozoide (ERNSTER; DALNER, 1995).

A melatonina, hormônio natural, participa de várias etapas da fisiologia espermática, melhora a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides quando adicionado a diluentes seminais (MEDRANO et al., 2017).

Diante do exposto, o objeto deste estudo foi avaliar se o efeito da capacidade antioxidante da CoQ10 e da Melatonina, adicionadas a meios diluentes, melhoraria a qualidade do sêmen de ovinos após a descongelação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas de oxigênio e função espermática

Os espermatozoides, células altamente especializadas, são divididos morfológicamente em cabeça, onde se aloja o DNA; peça intermediária onde estão as mitocôndrias, essenciais para a produção de energia necessária para a movimentação das células espermáticas; e cauda (flagelo), responsável pela motilidade celular (BRITO, 2007).

As células são recobertas em sua totalidade por uma membrana plasmática, formada por duas camadas de fosfolípidios, composta por diversas proteínas, lipídios, glicolipídios e glicoproteínas intercaladas nesta estrutura (SINGER; NICHOLSON, 1972).

Fisiologicamente, a célula espermática passa por alterações na membrana, principalmente durante a capacitação espermática e reação acrossomal, no momento da fertilização. Desse modo, o processo de congelamento também induz alterações, deixando o espermatozoide sujeito a fatores estressantes como: formação e dissolução de cristais de gelo, desidratação, aumento da concentração dos solutos, transição de fase dos fosfolípidios da membrana, estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores (BORTOLOZZO et al., 2008).

Mais especificamente, o processo de congelamento causa fluidez e aumento da permeabilidade das membranas e da produção de ROS, fazendo com que a célula aja como se estivesse iniciando o processo de capacitação espermática, só que neste momento, precocemente (THOMAS et al., 2006). Além disso, estas células não possuem quantidade suficiente de antioxidantes e substâncias capazes de manter o equilíbrio entre os sequestradores e geradores de ROS (SHAFIEI et al., 2015).

Os metabólitos reativos do oxigênio são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, sendo altamente energéticos e instáveis (MAIA et al., 2010). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de ROS (radicais livres de oxigênio, que possuem um ou mais elétrons livres), que são instáveis e altamente reativas, agindo, geralmente, nos ácidos graxos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Dentre as ROS, podemos citar o ânion superóxido, gerado pela adição de um elétron ao O_2 na cadeia respiratória, que ocorre na membrana mitocondrial espermática, conforme Figura 1.



Figura 1. Formação do radical superóxido (O_2^-) a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio (O_2) (SILVA et al., 2013).

O radical superóxido é pouco reativo, porém, participa da formação de outro radical livre de alto potencial reativo, o peróxido de hidrogênio, conforme Figura 2 (NOGUEIRA et al., 2013).



Figura 2. Esquema da formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da superóxido dismutase (SOD) (SILVA et al., 2013).

O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, por não apresentar um elétron desemparelhado, porém, possui alta toxicidade para as células (FERREIRA; MATSUBAR, 1997).

Por fim, o radical hidroxila (OH^\cdot), considerado o mais reativo em sistemas biológicos. Formado a partir do H_2O_2 , conforme Figuras 3 e 4, possui capacidade de atravessar as membranas, reagindo com moléculas como lipídeos insaturados e DNA (TURRENS, 2003).

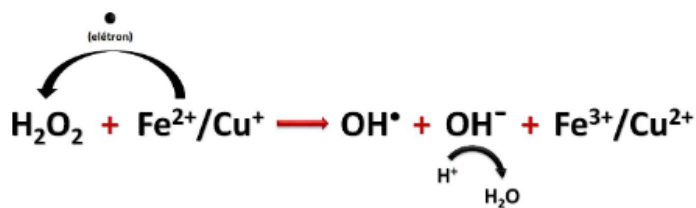


Figura 3. Formação do radical hidroxil (OH•) pela reação de Fenton (SILVA et al., 2013).

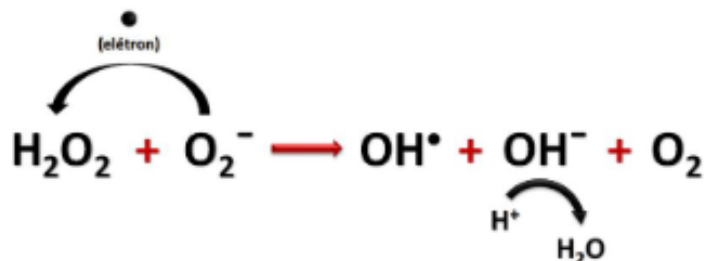


Figura 4. Formação do radical hidroxil (OH•) pela reação de Haber-Weiss (SILVA et al., 2013).

Há evidências de que a capacitação espermática é um processo oxidativo, no qual pequenas quantidades de ROS são necessárias para que ela aconteça (GUERRA et al., 2004). Eventos induzem o espermatozoide a um estado de hiperativação. Nestas condições, ele passa pelo processo de reação acrossomal fisiológica, adquirindo a habilidade de fecundar (SAALU, 2010).

Maia et al. (2010) avaliaram o envolvimento das ROS na capacitação espermática em bovinos e ovinos e observaram que os níveis de H₂O₂ foram aumentados após indução à capacitação espermática.

As ROS estão relacionadas a danos na membrana e no DNA espermático, o que pode afetar a motilidade destas células, sua capacidade fertilizante, prejudicar a distribuição do material genético paterno, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e morte celular (EL-BELTAGI; MOHAMED, 2013).

2.2 Antioxidantes

Vários pesquisadores têm estudado a adição de antioxidantes nos diluidores seminais, como o ácido ascórbico, quercetina e a melatonina, para manter o equilíbrio oxidativo, visando melhorar a qualidade espermática do sêmen pós-congelado (SOUZA et al., 2016; MEDRANO et al., 2017; BORGES et al., 2020).

É nítida a importância das ROS na reprodução, agindo direta e fisiologicamente na capacitação e reação acrossomal dessas células, entretanto, a sua produção exagerada é prejudicial ao espermatozoide (RODELLO, 2010).

O ejaculado possui um sistema “redox”, que combina a ação antioxidante do plasma seminal e dos espermatozoides. Existem antioxidantes que agem de maneira enzimática, como a superóxido dismutase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase; e de forma não enzimática, como a glutathione reduzida – GSH, urato, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, quercetina, melatonina, coenzima Q10, carotenoides e ubiquinonas (RODELLO, 2010).

A Coenzima Q10 (CoQ10) é um antioxidante lipossolúvel, que atua em diversos sistemas biológicos promovendo energia, através do transporte de elétrons e prótons na membrana mitocondrial. Segundo Nohl et al. (1998) esta coenzima pode ser encontrada em todas as membranas celulares de mamíferos na forma reduzida (ubiquinol) e na forma oxidada (ubiquinona), prevenindo a peroxidação lipídica (CAROCHO; FERREIRA, 2013) e neutralizando radicais lipídicos (TURUNEN et al., 2004).

Alguns antioxidantes estão presentes naturalmente no plasma seminal, como por exemplo a CoQ10 e a melatonina. Eles protegem os espermatozoides contra as ROS oriundas de espermatozoides anormais, eliminam ROS formadas por leucócitos, previnem a fragmentação do DNA, reduzem as crioinjúrias e bloqueiam a capacitação espermática prematura (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Na célula espermática, a maior concentração de CoQ10 ocorre nas mitocôndrias presentes na peça intermediária, local de intensa produção de energia. Portanto, todo o processo de síntese de ATP do gameta masculino é dependente da disponibilidade deste cofator, e uma deficiência do mesmo pode resultar em redução da motilidade espermática (DATTA et al., 2009).

A adição desse composto já foi estudado no sêmen congelado de touros e caprinos, prevenindo a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA espermático, além de manter os parâmetros cinéticos, aumentar o percentual de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática (DATTA et al., 2009; GUALTIERI et al., 2014).

Essa ação protetora está relacionada à manutenção ou aumento da motilidade espermática e prevenção tanto da fragmentação da cromatina, quanto da LPO (CARNEIRO, 2017). Contudo, há deficiência de estudos avaliando os efeitos da utilização da CoQ10 sobre a qualidade espermática na espécie ovina.

A melatonina é uma indolamina que possui alta solubilidade em lipídeos, sendo assim, passa facilmente por difusão da circulação periférica para outros fluidos ou células. Tem sido observado que a melatonina neutraliza ROS e nitrogênio, expressando essa função em concentrações fisiológicas ou farmacológicas (CARPENTIERI et al., 2012).

A melatonina atua como antioxidante natural, protegendo os espermatozoides contra o estresse oxidativo. Ela é capaz de interagir com uma variedade de ROS, bem como possui capacidade de reciclar diversos antioxidantes oxidados, entre eles as vitaminas C e E, glutathione e NADH (CEBRIÁN-PEREZ et al., 2014).

Na célula espermática, a melatonina tem sido associada à prevenção da capacitação precoce e apoptose, aumento da concentração intracelular de ATP, motilidade total e progressiva do sêmen e das taxas de fertilização *in vitro*, preservação da integridade do DNA e melhora da morfologia espermática em ovinos (CASAO et al., 2010; ORTIZ et al., 2011; SOUZA, MORAES e TONIOLLI, 2017; PENTEADO et al., 2020).

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O espermatozoide é uma célula altamente especializada, porém bastante sensível às alterações do ambiente. Essa célula possui sistema de obtenção de energia aeróbio, através da produção de ATP gerada nas mitocôndrias. Com a metabolização de oxigênio neste momento, são produzidas também as espécies reativas de oxigênio, potentes oxidantes para a célula.

Muitas das vezes, a célula consegue equilibrar essa reação oxidativa, utilizando seus próprios agentes antioxidantes naturais. Entretanto, quando isso não ocorre em quantidade suficiente, principalmente durante o processo de congelação seminal, instala-se o estresse oxidativo. É com esse intuito, que muitos autores vem testando a adição de antioxidantes ao diluente seminal. Dentre eles, podemos citar a Coenzima Q10, antioxidante

lipossolúvel, que atua em diversos sistemas biológicos promovendo energia, através do transporte de elétrons e prótons na membrana mitocondrial, prevenindo a LPO e neutralizando radicais lipídicos, e a Melatonina, capaz de interagir com uma variedade de ROS, além de possuir capacidade de reciclar diversos antioxidantes oxidados, entre eles as vitaminas C e E, glutatona e NADH.

4. REFERÊNCIAS

BICUDO, S.D.; RODELLO, L.; BITTENCOURT, R.F.; MONTEIRO, C.D.; CROCOMO, L.F.; FALLEIROS, M.B.; BISCARDE, C.E.A.; OLIVEIRA, T.M. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n.6, p.167-181, 2009.

BORGES, M.S'A., BORN, J.L.B., CONTI, L.M., SEGABINAZZI, L.G., NICHI, M., KAWAI, G.K.V., LEITE, R.F., PEIXOTO, K. DA C., DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O., CRESPILO, A.M. Paradoxical effect of quercetin antioxidant on goat sperm parameters after cryopreservation. **Cryoletters**, London, v. 41, n. 3, p. 128-134, 2020.

BORTOLOZZO F.P.; BERNARDI M.L.; BENNEMANN P.E.; WENTZ I. **Inseminação artificial em suínos**. In: Gonçalves P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2ª ed. Roca, São Paulo, 2008.

BRITO L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques Equine Practice**. v.6, n.4, p.249–64, 2007.

BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; EKEN, A.; SARIÖZKAN, S.; TAŞDEMİR, U.; ENDIRLIK, B. Ü. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 150, p. 77–83, 2014.

CARNEIRO, João Alexandre Matos. **Ação da coenzima Q10 sobre a viabilidade espermática de garanhões resistentes ou sensíveis à congelação**. 2017. 63f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CARPENTIERI, A., DE BARBOZA, G. D., ARECO, V., LÓPEZ, M. P., E DE TALAMONI, N. T. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, 2012.

CASAO, A.; CEBRIÁN, I.; ASSUMPÇÃO, M.E.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J.A.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of

testosterone and antioxidant enzymes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, p.59–67, 2010.

CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; CASAO, A.; GONZÁLEZ-ARTO, M.; HAMILTON, T.R.S.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T. Melatonin in sperm biology: breaking paradigms. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.11-21, 2014.

COSTA, J.M.S.; SOUZA W.L.; MORAES E.A.; TORRES L.R.C.; LIMA D.I.B.; COELHO V.G.; SOUSA P.H.F. Effect of Trolox C and ascorbic acid on the binding capacity of sperm ram after cryopreservation. 42nd Annual Conference of the IETS, Louisville, KY. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, p.154-155, 2016.

DATTA, U.; SEKAR, M.C.; HEMBRAM, M.L.; DASGUPTA, R. Developments of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa *in-situ* at – 10°C with electrolyte free medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, p.467-473, 2009.

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44-57, 2013.

ERNSTER, L.; DALLNER, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Diseases**. v.1271, p.195-204, 1995.

FERREIRA A.L.A.; MATSUBAR, A.L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.43, p.61-68, 1997.

GUALTIERI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; RIZOS, D.; LONGOBARDI, S.; TALEVI, R. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. **Theriogenology**, v.82, p.592-598, 2014.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SIRCHERLE, C.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extender with antioxidants. **Small Ruminant Research**. v.23, n. 1-, p. 112-118, 2010.

MEDRANO, A.; CONTRERAS, C.F.B.; HERRERA, F.M.; ALCANTAR-RODRIGUEZ, A.M. Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.6, n.6, p.241, 2017.

NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B.; BENDERE, S.C.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Eletrônica Veterinária**. v.15, p.1-15, 2013.

NOHL, H.; GILLE, L.; KOZLOV, A.V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, p.666-675, 1998.

ORTIZ, A.; ESPINO, J.; BEJARANO, I.; LOZANO, G.M.; MONLLOR, F.; GARCÍA, J.F.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A.B. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.132–139, 2011.

PENTEADO, V. F.; CUNHA, P. T.; FARIA, J. B.; VODZIK, G. R.; ULGUIM, S. H. P. T.; NEVES, A. P.; FELTRIN, C. Avaliação seminal de ovinos sobre diferentes concentrações de melatonina diluída em tris gema-ovo. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 2, 2020.

RODELLO, Leandro. **Prevenção do estresse oxidativo pela utilização de Trolox, Catalase e Glutathione no processo de congelamento de sêmen ovino**. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2010.

SAALU, L.C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v.13, n. 9, p.413- 422, 2010.

SHAFIEI, M.; FOROUZANFAR, M., HOSSEINI, S.M., ESFAHANI, M.H.N. Efeito da superóxido dismutase mimética e catalase na qualidade do sêmen de caprinos pós-caudo. **Theriogenology**, v. 83, p.1321-1327, 2015.

SILVA, L.F.M.C., ARAUJO, E.A.B., OLIVEIRA, S.N., DALANEZI, F.M., ANDRADE-JUNIOR, L.R.P., SOUZA, F.F., CRESPILO, A.M. et al. Mecanismos de ação dos principais antioxidantes utilizados na criopreservação espermática de garanhões. **Vet, e Zootec.**, v.24, n.3, p.418-434, 2017.

SINGER, S.J., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science**, v.175, p.720-731, 1972.

SOUZA W.L., MORAES E.A., COSTA J.M.S., SOUSA P.H.F., LOPES JUNIOR E.S., OLIVEIRA R.P., TONIOLLI R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36, n.7, p.657-664, 2016.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelamento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.5, p.471-478, 2017.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**. v.552, p.335-344, 2003.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1660, p.171-199, 2004.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 481-492. 2000.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

➤ Avaliar os efeitos de antioxidantes sobre a sobre a qualidade espermática quando adicionados a diluente comercial para congelação de sêmen ovino.

5.2 Objetivos Específicos

➤ Determinar o efeito da adição de Coenzima Q10 e Melatonina no diluente proposto para congelamento de sêmen ovino nos parâmetros cinéticos avaliados pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA) e sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana, potencial mitocondrial, produção de ânions superóxido e peroxidação lipídica, avaliados pelo citômetro de fluxo;

➤ Verificar se a adição de Coenzima Q10 no diluente seminal aumenta a taxa de prenhez em ovinos.

CAPÍTULO 2

Short Communication

Adição de coenzima Q10 e melatonina em diluente seminal de carneiros submetidos à congelação

(Artigo redigido segundo as normas da Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia: <https://www.scielo.br/journal/abmvz/about/#instructions>)

Stella M. T. Tironi^{a,*}, Renan Denadai^a, Lucas M. do Carmo^a, Alessandra G. Souza^a, Bruno Gimenez^a, José A. D. Junior^a, Rogério Oliveira^b, Maria I. L. Souza^c, Eunice Oba^a

^a *Departamento de Cirurgia veterinária e Reprodução animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.*

^b *Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.*

^c *Departamento de morfofisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.*

*Autor correspondente. Tel.: +55 44 99965-8843.

Endereço de e-mail: stella.tironi@unesp.br (Stella M. T. Tironi).

Resumo

O sêmen congelado de ovinos ainda possui baixa qualidade, tendo como um dos fatores o estresse oxidativo. O objetivo deste experimento foi verificar a adição de Coenzima Q10 (CoQ10) e Melatonina no diluente para congelação de sêmen ovino.

Foi utilizado sêmen de dois carneiros mestiços, em 5 repetições, divididos em 7 tratamentos: Controle (diluente puro), M0,5 (diluente adicionado de 0,5 mM de melatonina), M1 (1 mM de melatonina), M2 (2 mM de melatonina), C1 (diluente adicionado de 0,175 mM de CoQ10), C3 (0,35 mM de CoQ10) e C7 (0,7 mM de CoQ10). O sêmen foi analisado no sistema computadorizado de análise espermática após descongelação, nos momentos 0, 1, 2 e 3h.

Todos os tratamentos foram estatisticamente inferiores ao controle para o parâmetro MT. Para os parâmetros MP e RAP, C1 mostrou-se estatisticamente igual ao controle, e os demais tratamentos foram estatisticamente inferiores, quando comparados ao controle. Todos os tratamentos de Melatonina foram inferiores, para todos os parâmetros avaliados, em todos os momentos. Com relação aos momentos de avaliação, foi observado diferença entre todos os momentos de avaliação, para todos os parâmetros, com queda linear entre os momentos.

Conclui-se que, embora a adição de CoQ10 e Melatonina não foram eficazes em manter ou melhorar a qualidade espermática após o teste de termoresistência. Adicionalmente, os tratamentos de CoQ10 foram ligeiramente superiores aos de Melatonina.

Palavras-chave: antioxidante; ovino; reprodução; sêmen congelado; termoresistência.

1. Introdução

A utilização de sêmen congelado é uma biotécnica largamente utilizada e traz como vantagens a facilidade de transporte e armazenamento por períodos prolongados, permite a comercialização e utilização dos mais diversos doadores, conforme o interesse do produtor, além de oferecer um controle de propagação de doenças e contaminantes (FERNANDES, 2012).

O procedimento de congelação e descongelação gera modificações na estrutura da célula espermática, induzidas em alguns casos, pela ocorrência de eventos oxidativos. A perda de motilidade após o processamento do sêmen foi descrita como sendo decorrente principalmente do estresse oxidativo, desencadeando uma menor resistência das células a essas substâncias (MAIA; BICUDO, 2009).

Todos os sistemas biológicos geram espécies reativas de oxigênio (ROS) naturalmente, como: ânions superóxido (O_2^-), hidroxiperoxila (HO_2^+), hidroxila (OH^+), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nitroso (NO^-). Elas são necessárias para o funcionamento das células e processo de fertilização, porém, quando produzidos em excesso sobrecarregam as defesas antioxidantes dos espermatozoides, prejudicando o funcionamento fisiológico das células levando ao estresse oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Existem dois sistemas capazes de proteger as células dos efeitos deletérios da formação de ROS: enzimático e não enzimático. A Coenzima Q10 e Melatonina são substâncias antioxidantes não enzimáticas. Datta et al. (2009) verificaram maior percentual de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática utilizando 30 mg/mL de Coenzima Q10 (0,35 mM) em caprinos. Em ovinos, entretanto, há pouca informação a respeito da utilização e dos efeitos da CoQ10 sobre espermatozoides da espécie.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante da Melatonina e da Coenzima Q10 adicionadas ao diluente seminal sobre a qualidade espermática do sêmen de ovinos.

2. Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com as premissas e aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista de Botucatu (FMVZ -

UNESP), atendendo aos princípios éticos e de bem-estar animal (protocolo nº 244/2018).

O experimento foi conduzido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo.

2.1 Amostras

Foram utilizados os ejaculados de dois carneiros adultos mestiços, saudáveis e aptos a reprodução (CBRA, 2013). Os animais foram mantidos confinados, recebendo água e suplemente mineral *ad libitum*, silagem de milho e suplementação com farelo de soja e milho.

A colheita do sêmen foi realizada utilizando vagina artificial modelo curto, aquecida a 42°C, com auxílio de uma ovelha em estro, como manequim. Foram realizadas cinco colheitas de cada animal com intervalo de 48 horas entre elas, durante o período reprodutivo da espécie.

2.2 Diluição seminal e delineamento experimental

O sêmen dos dois carneiros foi fracionado em diluente contendo os antioxidantes a serem testados, de acordo com cada concentração dos tratamentos. O diluente base utilizado foi o Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brazil).

Foram testados sete tratamentos: Controle (diluente puro); C1 (0,175 mM de CoQ10); C3 (0,35 mM de CoQ10); C7 (0,7 mM de CoQ10); M0,5 (0,5 mM de melatonina); M1 (1 mM de Melatonina) e M2 (2 mM de melatonina), utilizando metodologia de Succu et al. (2011). As doses foram escolhidas com base no trabalho de Datta et al. (2009) e Succu et al. (2011), que verificaram maior percentual de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática utilizando 0,35 mM de CoQ10 em caprinos; e maiores resultados para viabilidade espermática, motilidades total e progressiva, porcentagem de espermatozoides rápidos e integridade de DNA, adicionando 1mM em diluente seminal para ovinos. Este trabalho testou as doses mencionadas acima, metade e o dobro, para cada antioxidante.

Para concentração, diluição, avaliação e envasamento, o sêmen foi manipulado na proporção 1:400, conforme Rodello (2006).

2.3 Congelação do sêmen

O sêmen foi congelado por método automático, utilizando a congeladora automática TK3000® (TK Tecnologia, Uberaba, Brasil), conforme metodologia utilizada por Rodello (2006).

2.4 Avaliação espermática

O sêmen foi descongelado e avaliado pelo sistema computadorizada de análise espermática (Hamilton Thorn Research – IVOS® 12, Beverly, Massachusetts, USA) em quatro momentos, sendo 0, 1, 2 e 3h, utilizando uma metodologia que levou em consideração os parâmetros cinéticos: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de células com movimento rápido (RAP), conforme descrito por Salgado (2020).

Durante a primeira e a segunda avaliação, a amostra descongelada no momento 0h, foi mantida incubada em micro tubo aquecido em banho-maria seco a 37°C até ser avaliada no momento 2h.

2.5 Análise estatística

Para análise estatística dos parâmetros analisados pelo CASA foram calculados média e desvio padrão, considerando os tratamentos e os momentos. Para analisar quais tratamentos diferenciam estatisticamente entre si, foram testadas as diferenças observadas por meio de contrastes dos parâmetros e aplicando-se o Teste Tukey-Kramer. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico SAS versão 9.3, considerando o nível de significância do teste igual a 5% ($p < 0.05$).

3. Resultados

Com relação aos parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos observou-se que a maioria dos tratamentos com coenzima Q10 e melatonina foram inferiores ao controle, como pode ser observado nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Porcentagem média e desvio padrão dos valores obtidos pelo CASA de motilidade total (MT) do sêmen ovino descongelado nos momentos 0, 1, 2 e 3h, incubados a 37°C de 2 carneiros com 5 ejaculados de cada (n=10).

Tratamentos/ Momentos	Controle	C1	C3	C7	M0,5	M1	M2	Média dos momentos
0h	69±1,8	56±3,7	55±3,8	56±4,5	51±3,2	50±3,5	43±3,9	54±4,3 ^a
1h	55±5,7	49±4,6	47±3,6	46±3,4	39±2,8	33±6,9	29±3,0	43±4,3 ^b
2h	45±4,1	39±4,5	40±3,3	36±4,0	32±3,7	24±3,5	28±4,5	35±4,3 ^c
3h	39±4,4	35±4,7	29±2,9	24±3,2	27±2,9	27±5,4	17±3,8	28±4,3 ^d
Média do tratamento	52±4,4 ^a	45±4,4 ^b	42±4,4 ^b	41±4,4 ^b	37±4,4 ^b	33±4,4 ^b	29±4,4 ^b	

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os tratamentos, quando comparados ao controle. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística entre os momentos 0, 1, 2 e 3h. (p < 0,05) C1= 0,175 mM de coenzima Q10, C3= 0,35 mM de coenzima Q10, C7= 0,7 mM de coenzima Q10, M0,5= 0,5 mM de melatonina, M1= 1 mM de melatonina e M2= 2 mM de melatonina, CASA= Sistema computadorizado de análise espermática.

Tabela 2. Porcentagem média e desvio padrão dos valores obtidos pelo CASA de motilidade progressiva (MP) do sêmen descongelado nos momentos 0, 1, 2 e 3h, incubados a 37°C de 2 carneiros com 5 ejaculados de cada (n=10).

Tratamentos/ Momentos	Controle	C1	C3	C7	M0,5	M1	M2	Média dos momentos
0h	37±5,8	30±6,6	31±7,7	31±11,5	29±5,2	29±7,9	24±5,6	30±1,3 ^a
1h	30±10,7	28±7,7	26±4,9	24±6,0	20±4,5	19±11,0	17±5,0	24±1,3 ^b
2h	26±6,4	23±8,7	22±7,3	22±7,1	19±9,7	14±6,7	15±6,6	20±1,3 ^c
3h	24±9,9	21±10,3	15±5,8	14±5,5	16±8,4	16±12,7	8±7,3	16±1,3 ^d
Média do tratamento	29±1,5 ^a	26±1,5 ^a	24±1,5 ^b	23±1,5 ^b	21±1,5 ^b	19±1,5 ^b	16±1,5 ^b	

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os tratamentos, quando comparados ao controle. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística entre os momentos 0, 1, 2 e 3h. (p<0,05) C1= 0,175 mM de coenzima Q10, C3= 0,35 mM de coenzima Q10, C7= 0,7 mM de coenzima Q10, M0,5= 0,5 mM de melatonina, M1= 1 mM de melatonina e M2= 2 mM de melatonina, CASA= Sistema computadorizado de análise espermática.

Tabela 3. Porcentagem média e desvio padrão dos valores obtidos pelo CASA de porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP) do sêmen descongelado nos momentos 0, 1, 2 e 3h, incubados a 37°C de 2 carneiros com 5 ejaculados de cada (n=10).

Tratamentos/ Momentos	Controle	C1	C3	C7	M0,5	M1	M2	Média dos momentos
0h	49±5,2	38±8,4	39±8,5	40±11,6	37±6,5	35±7,8	30±8,1	38±2,1 ^a
1h	38±13,9	35±11,8	32±7,6	30±8,3	24±5,6	23±15,7	20±6,6	29±2,1 ^b
2h	32±7,7	28±12,0	26±8,7	25±8,9	22±10,9	16±8,0	18±9,0	24±2,1 ^c
3h	28±11,6	23±11,0	17±6,8	17±8,9	18±8,9	18±15,0	9±9,2	19±2,1 ^d
Média do tratamento	37±2,2 ^a	31±2,2 ^a	29±2,2 ^b	28±2,2 ^b	25±2,2 ^b	23±2,2 ^b	19±2,2 ^b	

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre os tratamentos, quando comparados ao controle. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística entre os momentos 0, 1, 2 e 3h. (p<0,05) C1= 0,175mM de coenzima Q10, C3= 0,35mM de coenzima Q10, C7= 0,7mM de coenzima Q10, M0,5= 0,5mM de melatonina, M1= 1mM de melatonina e M2= 2mM de melatonina, CASA= Sistema computadorizado de análise espermática.

Quando analisada a média dos tratamentos em todos os momentos observou-se que para o parâmetro MT, todos os tratamentos foram inferiores estatisticamente, quando comparados ao controle.

Para os parâmetros MP e RAP, C1 mostrou-se estatisticamente igual ao controle. Para estes mesmos parâmetros, C3, C7, M0,5, M1 e M2 foram estatisticamente inferiores, quando comparados ao controle.

Analisando-se separadamente os tratamentos de Melatonina, quando comparados ao Controle, todos os tratamentos foram significativamente inferiores, para todos os parâmetros avaliados, em todos os momentos.

Para Melatonina, observou-se também certa linearidade na queda dos valores, ao passo que a concentração dessa substância foi aumentada. Ou seja, quanto maior a adição de melatonina, menores os valores dos parâmetros avaliados, demonstrando queda da qualidade espermática.

Com relação aos momentos 0, 1, 2 e 3h, para MT, MP e RAP pode-se observar que todos os momentos tiveram diferença estatística, tanto quando comparados com o momento 0h como também quando comparados entre si, observando-se linearidade na queda dos valores analisados, de acordo com o passar dos momentos.

Adicionalmente, o estudo demonstrou que após 1h de estresse térmico já é possível observar diferença por ação das ROS, em comparação ao momento 0h.

4. Discussão

O espermatozoide ovino possui maior predisposição às injúrias e desorganização da membrana durante o processo de congelação, estando mais susceptível à atuação de radicais livres. Este fato está atrelado a maior taxa de ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana plasmática (BICUDO et al., 2009).

Neste estudo, todos os tratamentos tiveram resultados de motilidade total inferiores ao controle. Durante a congelação, a célula espermática encontra-se com quantidade de citoplasma reduzida e, conseqüentemente, a quantidade de antioxidantes e substâncias capazes de manter o equilíbrio oxidativo também. Ou seja, a quantidade insuficiente de antioxidantes no citoplasma celular pode ter afetado diretamente a motilidade espermática (SHAFIEI et al., 2015).

Comparando as concentrações de CoQ10 utilizadas neste trabalho, C1, ou seja, a menor concentração testada, se equiparou ao controle, enquanto as demais tiveram resultados inferiores. Isso foi observado também por Saeed et al. (2016), ao verificarem melhorias na qualidade seminal ao adicionar baixas concentrações de CoQ10 (20 μ M e 30 μ M), melhorando motilidade e viabilidade espermática em bovinos e bubalinos.

Essa ação protetora da CoQ10 está relacionada à manutenção ou melhora da motilidade espermática e prevenção tanto da fragmentação da cromatina, quanto da peroxidação lipídica (CARNEIRO, 2017).

Todos os tratamentos e parâmetros analisados de melatonina foram inferiores ao controle, ou seja, declinaram a qualidade espermática. Os resultados foram inversamente proporcionais à quantidade adicionada ao diluente. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Borges et al. (2020) que, ao adicionarem maiores concentrações de Quercetina, também antioxidante, menor era cinética espermática e a integridade de membrana em caprinos.

Entretanto, acredita-se que não houve efeito tóxico da melatonina, uma vez que Succu et al. (2011) obtiveram bons resultados utilizando dosagem idêntica. Neste caso, pode ter ocorrido um efeito individual antioxidante/animal, assim como encontrado por CARNEIRO (2017) em garanhões, onde o antioxidante testado expressou seu efeito benéfico apenas em animais de baixa qualidade espermática, não sendo demonstrado neste experimento, uma vez que todos os animais estavam aptos à reprodução.

Com relação aos momentos analisados, observou-se uma queda linear na qualidade espermática inversamente proporcional aos momentos. Como esperado, isso ocorre pois o processo de congelamento causa fluidez e aumento da permeabilidade das membranas e da produção de ROS durante e após o processo de congelamento. Isso faz com que a célula entenda que ela está entrando em processo de capacitação espermática só que, neste momento, precocemente, diminuindo então a qualidade espermática (THOMAS et al., 2006).

Os tratamentos de CoQ10 mostraram-se superiores aos de melatonina, demonstrando tendência ($p = 0,05$) em melhorar a qualidade espermática, sendo necessário mais estudos para compreender o efeito a adição dessas

substâncias sobre a célula espermática em ovinos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

Bicudo, M.D., Rodello, I., Bittencourt, R.F., Monteiro, C.D., Crocomo, L.F., Falleiros, M.B., Biscarde, C.E.A., Oliveira, T.M., 2009. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. Ver. Bras. Reprod. Anim., 6,167-181.

Borges, M.S'A., Born, J.L.B., Conti, L.M., Segabinazzi, L.G., Nichi, M., Kawai, G.K.V., Leite, R.F., Peixoto, K.C., Dell'Aqua, J.A., Papa, F.O., Crespilho, A.M., 2020. Paradoxical effect of quercetin antioxidant on goat sperm parameters after cryopreservation. Cryoletters, London, 41,(3),128-134.

Carneiro, João Alexandre Matos. Ação da coenzima Q10 sobre a viabilidade espermática de ganhões resistentes ou sensíveis à congelação. 2017. 63f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2017.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed. Belo Horizonte, 2013.

Datta, U., Sekar, M.C., Hembram, M.L., Dasgupta, R., 2009. Developments of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa *in-situ* at – 10°C with electrolyte free medium. J. Assist. Reprod. Genet., 26, 467-473.

Fernandes, G. O. Efeito de antibacterianos na qualidade espermática e na microbiota do sêmen ovino. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

Maia, M.S., Bicudo, S.D., 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Ver. Bras. Reprod. Anim., 33,183-193.

Rodello, Leandro. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2006.

Saeed, A.M., El-Nagar, H.A., Wafa, W.M., Hussein, Y.S., 2016. Effect of Coenzyme Q10 as an Antioxidant Added to Semen Extender During Cryopreservation of Buffalo and Cattle Semen. J. Anim. Poult. Prod., 7(11), 403 – 408.

Salgado, Letícia Cristina. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino. 2020. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2020.

Shafiei, M., Forouzanfar, M., Hosseini, S.M., Esfahani, M.H.N., 2015. Efeito da superóxido dismutase mimética e catalase na qualidade do sêmen de caprinos pós-caudo. *Theriogenology*, 83,1321-1327.

Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G.G., Naitana, S., 2011. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J. Pineal Res.*, 50,310-318.

Thomas, A.D., Meyers, S.A., Ball, B.A., 2006. Capacitation-like changes inequine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65,1531-1550.

Use of coenzyme Q-10 in semen freezing and its effect on sperm quality and pregnancy rate in sheep

(Article written according to the Theriogenology Journal guidelines <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>)

Stella Maris Teobaldo Tironi^{a,*}, Luan da Silva Sitó^a, Beatriz Lippe de Camillo^a, Renan Denadai^a, Adrielly Lais Alves da Silva^b, Camila Freitas Dell'Aqua^a, José Antonio Della'Aqua Junior^a, Rogério de Oliveira^c, Maria Inês Lenz Souza^d, Eunice Oba^a

^a *Veterinary Surgery and Animal Reproduction Department, College of Veterinary Medicine and Animal Science, Paulista State University, Botucatu, Brazil.*

^b *Animal Science Department, Esalq-USP, State University of São Paulo, Piracicaba, Brazil.*

^c *Biostatistics Department, Biosciences Institute, Paulista State University, Botucatu, Brazil.*

^d *Morphophysiology Department, Biosciences Institute, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil.*

*Corresponding author. Tel.: +55 44 99965-8843.

E-mail address: stella.tironi@unesp.br (Stella M. T. Tironi).

Abstract

One of the low pregnancy rate responsible factors is that the using frozen semen in sheep because of the oxidative stress created by the process. This experiment purpose was to test the effects of adding coenzyme Q-10 (CoQ10) in seminal extender on sperm quality and pregnancy rate of sheep. In this study were used ejaculates from 8 Dorper rams in reproductive age. And was tested in 4 treatments: Control (Botubov[®] puro), C1 (0,175 mM of CoQ10), C3 (0,35 mM of CoQ10) and C7 (0,7 mM of CoQ10). Samples were collected in triplicate from each animal and sperm analysis was performed by CASA after thawing at 0h and 2h moments. The samples were also analyzed by flow cytometry about the plasma and acrosomal membranes integrity and stability, lipid peroxidation, mitochondrial potential and superoxide anions production. Altogether 198 ewes were inseminated by laparoscopy and divided into two groups: control (n=98) and C7 (n=100). The pregnancy diagnosis was performed at 30 days. The TM, VAP and FMS parameters of control group showed difference (p<0.05) between 0h and 2h, indicating there was enough time to compare changes caused by heat stress. The C3 group was superior for the VAP parameter analyzed by CASA. Animals 4, 7 and 8 parameters of TM, PM and FMS were superior, being selected for the artificial insemination stage. At flow cytometry 0h moment, C7 group showed higher percentage of cells with high mitochondrial potential (p<0.05). At 2h moment the groups C1 and C7 were superior and C3 inferior, compared to the control. A higher pregnancy rate was observed in C7 (52%) when compared to the control (38%). Overall, it can be concluded that CoQ10 is able to protect sperm cell and consequently increase pregnancy rate in sheep.

Key words: computer analysis; antioxidant; flow cytometry, artificial insemination; laparoscopy.

1. Introduction

Artificial insemination is the method of choice for rapid genetic spread. This technique must have the greatest possible efficiency in order to obtain a significant number of descendants with high genetic merit and that justify its implementation in the production system [1].

Freezing process interferes on sperm quality and viability. This process steps includes dilution, refrigeration, freezing and thawing, these steps reduce the fertilizing capacity of sperm used in artificial insemination [2].

Oxidative stress, which occurs both in freezing and thawing induces generation of high concentrations of reactive oxygen species (ROS), producing lipid peroxidation which directly influence sperm quality and pregnancy rate in sheep [3, 4].

Searching to improve sperm quality in frozen semen some authors have studied the antioxidants addition in seminal extenders [5, 6, 7, 8]. One of the potent antioxidants is Coenzyme Q10 (CoQ10), a fat-soluble substance that acts in several biological systems generating energy through electrons and protons transport in mitochondrial membrane [9].

This coenzyme can be found in all mammalian cell membranes, preventing lipoperoxidation (LPO) and neutralizing lipid radicals [10]. The highest concentration of CoQ10 occurs in the mitochondria present in the middle piece of sperm cell, a site of intense energy production [11].

This compound has already been shown to be efficient in preventing sperm DNA fragmentation and maintaining kinetic parameters in bulls and greater motility and plasma membrane integrity in goats [11, 12, 13, 14]. However, there is a lack of studies evaluating the CoQ10 effects on sperm freezing and sperm quality in sheep.

The objective of this study was to evaluate Coenzyme Q10 influence, as an antioxidant at different concentrations, on semen freezing, to analyse sperm quality and pregnancy rate in sheep.

2. Material and methods

This work was carried out at Endocrinology Laboratory of Animal Reproduction and Veterinary Radiology Department at College of Veterinary Medicine and Animal Science, in the Paulista State University (UNESP),

Botucatu, São Paulo, latitude 22° 53' 09" S, longitude 48° 26' 42" W, 800 m of altitude, under approval by the Ethics Committee of the same University, protocol No. 244/2018.

2.1 Animals

Ejaculate of eight Dorper rams, aged between 3 and 4 years, healthy and capable of reproduction was used [15]. Animals were maintained confined, receiving corn silage, water and mineral supplement *ad libitum*.

2.2 Seminal collection

Three semen collections were performed from each animal with 48 hours of interval during reproductive season, using a short model artificial vagina heated at 42° C. To assist in the technique was used a ewe in estrus, estrogenized with 600µg of 17β-estradiol (Botupharma®, Botucatu, Brazil) 24 h before the time of collection.

For microscopic evaluations, 20 µL of semen was diluted in 1 mL of Botubov® extender prewarmed to 37°C. Semen was diluted to obtain the concentration and evaluated according to Rodello [16].

2.3 Seminal dilution

Semen was diluted in Botubov® (Botupharma, Botucatu, Brazil). Four treatments were tested: Control (pure seminal extender); C1 (0,175mM de CoQ10); C3 (0,35mM de CoQ10) e C7 (0,7mM de CoQ10), diluted according to Datta et al. [11]. These CoQ10 concentrations used in this experiment were based on the findings of Datta et al. [11], in which they found a higher percentage of progressive motility and plasma membrane integrity using C3 dosage of CoQ10 in goats. Semen was diluted and packaged according to Salgado [7].

2.4 Seminal freezing

Minitüb® 518C was used for the cooling stage in which the reeds were arranged horizontally on the support, were they remained for 3 hours. Subsequently, the support was transferred to polystyrene box with a capacity of 44 liters containing liquid nitrogen. So, the straws were exposed to a height of

three centimeters of liquid nitrogen vapor, in a horizontal position for 20 minutes. Then, they were submerged in liquid nitrogen, placed in racks and stored in cryogenic cylinders for further analysis.

2.5 Sperm evaluation

Samples were thawed at 37°C for 30 seconds and analyzed in two moments, 0 and 2h. Between the first and second evaluations sample was kept incubated in a heat microtube in a dry water bath at 37°C until it was evaluated at 2h.

Sperm quality was verified by computerized sperm analysis system (CASA), according the methodology described by Salgado [7].

Equipment BD LSR Fortessa (Becton Dickinson®, Mountain View, CA, USA) was used for sperm evaluation by flow cytometry. The samples were diluted in TALP-PVA, modified [17]: 100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM sodium DL-lactate 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM acid Hepes-free, 1,0mM sodium pyruvate, 1,0mg/mL polyvinyl alcohol-PVA and 25µg/mL gentamicin) in the concentration of 5x10⁶ sperm/mL, plus Hoescht 33342 (7µM; 14533, Sigma Aldrich®) to eliminate non-cellular particles.

A methodology according to Freitas-Dell'Aqua was used to evaluated plasma and acrosomal membrane integrity [18]. To evaluate membrane destabilization, mitochondrial potential and super oxide (O₂) production on mitochondrial matrix was used the methodology described by Freitas-Dell'Aqua et al. [19]. For lipid peroxidation, a protocol according to Guasti et al. [20], using the C11-BODYPY probe (D-3861; Molecular Probes).

2.6 Fertility test

2.6.1 Females

A total of 198 healthy crossbred ewes aged between 2 and 4 years and weighing 45kg on average, submitted to a previous gynecological examination.

These ewes were divided into two homogeneous groups according to the age, calving number, weight, body condition score, being: Control (n = 100): Botubov®; and C7 (n = 98): Botubov® added 0,7 mM de Coenzyme Q10 (C7).

C7 treatment showed the best results in parameters evaluated by CASA and by flow cytometry and therefore was selected for performing artificial insemination.

2.6.2 Synchronization protocol

Animals estrus synchronization was performed using the following protocol: on day 0 (D0) the intravaginal progesterone device Progespon[®] (Zoetis, Campinas, Brazil) was inserted. On day 13 (D13) device was removed and 350 UI of equine chorionic gonadotropin (eCG) (Novormon[®], Zoetis, Campinas, Brazil) was applied intramuscularly. After 60 hours of withdrawal, on day 16 (D16) artificial insemination was performed.

2.6.3 Artificial insemination

Were selected as semen donors the three rams that showed best results in parameters observed in CASA at the after-thawing moment. Females were submitted to water-food fasting for 12 hours. At the insemination time, 0.3 mg/Kg (IV) of acepromazine 1% (Acepran[®], Vetnil, Louveira, Brazil). Restraint was performed on a stretcher suitable for sheep, in dorso-oblique decubitus at an angle of 60° in relation to the ground. Trichotomy, antisepsis and local anesthetic block were performed with 1mL of 2% lidocaine (Dorfin[®], Ceva, Paulínea, Brazil) in each anesthetic button.

Intrauterine inseminations were performed using Halogen 250 twin (Karl Storz[®], Tuttlingen, Germany), with the aid of two trocars at a distance of 3 to 4 cm lateral to midline and 5 to seven cm cranial to the udder. Then, semen was applied to the greater curvature of each uterine horn, by puncture, depositing half of the straw content in each uterine horn, that is, 50×10^6 of sperm in each one.

After insemination these ewes received a simple nylon (Shalon Medical[®], Goiânia, Brazil) suture stitch, antimicrobial and anti-inflammatory spray application (Terracam[®], Agener União, São Paulo, Brazil) and 30.000 UI/Kg of penicillin (Pentabiótico[®] Veterinário, Zoetis, Campinas, Brazil).

2.6.4 Pregnancy Diagnosis

Pregnancy diagnosis was performed through transrectal B-mode ultrasound examination (Prosound 2 VET; Aloka[®] Co. Ltda; Japão) equipped with linear transducer after 30 days of inseminations.

2.7 Statistical analysis

Parameters of continuous variables was analyzed by CASA, Spearman's correlation was used and adjusted in linear models. The Chi-square test was used for categorical variables, followed by Tukey-Kramer test. Statistical analyzes were performed using SAS statistical software version 9.3.

Results obtained by flow cytometry were analyzed by BD FACSDiva™ software v 6.1, in the GraphPad Prisma program (GraphPad Software Inc, USA).

Data normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov and parametric data by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test. For non-parametric data Kruskal-Wallis was used followed by Dunn's test. Significant differences were considered when $p < 0,05$ for all tests.

3. Results

The TM, VAP and FMS parameters of control group demonstrated difference ($p < 0,05$) between 0h and 2h moments, showing there was enough time to compare changes caused by heat stress, as can be seen in table 1.

Group C7 demonstrated higher values of TM, PM and FMS at 2h moment ($p = 0,05$). There was no significant difference between treatments and moments for the other parameters.

Table 1. Mean of thawed semen parameters evaluated by CASA at 0h and 2h moments, incubated at 37° C of 8 rams with 3 ejaculates each (n=24).

Treatments/ parameters	TM (%)	PM (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
Control 0h	35,2 ^a	23,3	102,8 ^a	88,8	165,5	6,0	38,8	83,5	54,7	27,8 ^a
C1 0h	37,2	23,6	104,3	90,9	166,4	5,7	39,4	85,4	55,2	28,7
C3 0h	30,3	20,3	112,5	96,0	175,8	6,1	39,8	82,7	53,0	25,1
C7 0h	37,3	23,0	98,4	83,1	160,9	5,8	38,3	82,2	52,6	28,5
Control 2h	27,1 ^b	18,5	96,9 ^b	83,6	167,0	5,8	36,9	84,0	51,7	21,0 ^b
C1 2h	29,2	20,9	102,9	89,7	178,0	6,6	37,8	85,3	51,5	24,0
C3 2h	23,7	17,4	103,4	91,0	174,0	6,2	40,0	85,4	53,4	19,7
C7 2h	32,5	21,6	98,7	85,5	174,2	6,5	36,4	84,0	50,5	26,0

*Different letters in the same column mean statistical difference between evaluated moments for each parameter (p<0,05). TM= total motility, PM = progressive motility, VAP= average path velocity, VCL= curvilinear velocity, VSL= straight-line velocity, ALH (amplitude of lateral head displacement, BCF= beat cross frequency, STR= straightness, LIN= linearity e RAP= rapid spermatozoa. CASA= computer-assisted sperm analysis. C1= 0,175mM of coenzyme Q-10, C3= 0,35mM of coenzyme Q-10, C7= 0,7mM of coenzyme Q-10.

Animals 4, 7 and 8 demonstrated higher results TM, PM e FMS, being statistically superior to the others, as can be seen in table 2. There was no statistical difference between them demonstrating homogeneity. Therefore, these animals were selected to collect the semen doses prepared and used in insemination stage.

Table 2. Mean and standard deviation, per animal, of thawed semen of 8 rams with 3 ejaculates each (n=24), considering the average of all treatments and moments evaluated by CASA.

Animal	TM	PM	FMS
1	19±0 ^a	10±0 ^a	13±0 ^a
2	26±0,1 ^a	15±0,2 ^b	19±0,1 ^b
3	23±0,1 ^a	17±0,2 ^b	19±0,1 ^b
4	46±0,1 ^b	34±0,2 ^c	39±0,1 ^c
5	26±0,1 ^a	15±0,2 ^b	18±0,1 ^b
6	19±0,1 ^a	13±0,2 ^{ab}	15±0,2 ^{ab}
7	43±0,1 ^b	27±0,1 ^c	34±0,1 ^c
8	47±0,1 ^b	35±0,2 ^c	40±0,1 ^c

*Different letters in the same column mean statistical difference ($p < 0,05$) between evaluated animals. TM= total motility, PM = progressive motility, FMS= fast moving sperm. CASA= computer-assisted sperm analysis.

The results of flow cytometry analysis can be observed in table 3. All treatments were statistically equal to the control according to plasma membrane integrity and stability analysis.

Regarding the cells percentage of high mitochondrial potential, group C7 was statistically higher at 0h moment. In 2h moment, C1 and C7 groups were statistically higher and C3 group was statistically inferior when compared to the control group. In analysis of lipid peroxidation and cells percentage with high superoxide anions concentration was not found statistical differences.

Table 3. Mean and standard error of thawed semen of 8 rams with 3 ejaculates each (n=24), evaluated by flow cytometry, at 0 e 2h moments, incubated at 37°C, considering the average number of animals per treatment.

Treatments/ parameters	Plasma and acrosomal membrane integrity (%)	Lipid peroxidation (%)	Plasma membrane stability (%)	Cells with high mitochondrial potential (%)	Superoxide anions concentration (%)
Control 0h	17,3±2,01 ^{ab}	210,1±17,45	18,4±2,54 ^a	27,9±3,97 ^{ab}	78,4±3,06
C1	21,9±1,67 ^{ab}	198,4±12,96	26,7±2,73 ^b	35,1±3,90 ^{ab}	75,4±2,85
C3	16,9±2,02 ^b	196,5±13,59	18,8±2,11 ^a	26,4±3,01 ^b	80±2,54
C7	23,6±1,87 ^a	199,8±12,49	29,5±2,72 ^b	40,8±3,92 ^a	74,6±2,77
Control 2h	12,7±1,59 ^{ab}	446,0±44,33	17,0±2,34 ^a	21,0±3,26 ^a	75,4±3,84
C1	19,5±2,06 ^a	416,3±37,48	25,9±3,31 ^b	29,5±3,52 ^{ab}	71,7±3,99
C3	12,3±1,35 ^b	445,1±43,02	16,1±1,90 ^a	19,7±2,92 ^a	77,3±3,03
C7	17,8±2,07 ^{ab}	423,3±38,54	24,9±3,03 ^b	29,7±3,89 ^b	75,7±2,83

*Different letters in the same column mean statistical difference ($p < 0,05$) between treatments. C1= 0,175mM of coenzyme Q-10, C3= 0,35mM of coenzyme Q-10, C7= 0,7mM of coenzyme Q-10.

There was no statistical difference between pregnancy rate of selected rams to be used in the artificial insemination stage as observed in table 4. Also, there was no individual effect of coenzyme Q-10 on the selected males.

Regarding the pregnancy rate per treatment, it can be observed that there was a significant difference ($p < 0,05$). The control group had a pregnancy rate of 38% (38/100 animals) and C7 group obtained a pregnancy rate of 52,04% (51/98), being superior to the control group.

Table 4. Pregnancy percentage and frequency of 198 ewes inseminated by laparoscopy, demonstrated by treatment and by ram.

Ram	Control (%)	C7 (%)	Total (%)
4	40,62 (13/32)	57,57 (19/33)	49,23 ^a
7	28,12 (9/32)	54,54 (18/33)	41,54 ^a
8	44,44 (16/36)	43,75 (14/32)	44,12 ^a
Total	38,00^a (38/100)	52,04^b (51/98)	

*Different letters in the same column mean statistical difference ($p < 0,05$) between treatments. Equal letters in the same column mean that there was no difference between the rams. C7= 0,7mM of coenzyme Q-10.

4. Discussion

Artificial insemination adds value to the herd, by disseminating the genetic material of males with high productive characteristics[1]. Using frozen semen, the laparoscopic or transcervical intrauterine insemination techniques are the most indicated to achieve higher pregnancy rates [21, 22, 23]

In this experiment, the laparoscopic artificial insemination using doses containing 0,7mM of CoQ10 was responsible for increasing the pregnancy rate by 14% (C7 = 52%) when compared to control group (38%). As a reference, Taqueda et al. [21] obtained 45,8% of pregnancy rate when performing artificial insemination via intrauterine with frozen semen in sheep. These values demonstrate the good effectiveness of the CoQ10 used in our work, resulting in a higher pregnancy rate than that found in other studies using the same technique.

The C3 treatment showed superior VAP to the control group and C3 and C7 showed a higher percentage of cells with high mitochondrial potential. This occurs because coenzyme Q10 has protective property related to the maintenance or improvement of sperm motility and prevention of both chromatin fragmentation and lipid peroxidation [13,14].

C7 group showed a tendency ($p=0,05$) to improve TM, a parameter that has a strong correlation with fertility [24], and higher values for PM and PRS in CASA assessments. In flow cytometry evaluation C7 group showed higher values for integrity and stability of plasma membranes at 0 and 2h. Statistically, it was the treatment that showed the highest mitochondrial potential at 0 and 2h. For

these reasons this concentration was chosen to be used at the time of animals artificial insemination.

Regarding the observed moments the freezing process causes an increase in membrane permeability and in ROS production during and after the freezing process. This explains the drop in TM, VAP and PRS of control group between moments 0h and 2h, caused by thermal stress and decreasing sperm quality in the 2h moment [25].

In conclusion, coenzyme Q10 addition in seminal extender for freezing semen resulted in a higher pregnancy rate in sheep, probably due to its antioxidant capacity conferred to the sperm cell and demonstrated by the good results obtained by sperm kinetics and flow cytometry.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- [1] Lucy MC. Symposium review: Selection for fertility in the modern dairy cow—Current status and future direction for genetic selection. *J. Dairy Sci.* 2019; 102, 4:3706-3721.
- [2] De Andrade AFC, Grossfeld R, Knoxc RV. In vitro effects of two different commercial freezing and thawing extenders on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci.* 2022; 236, 106906.
- [3] Gibbons AE, Fernandez J, Bruno-Galarraga MM, Spinelli MV, Cueto, MI. Recommendations for sheep artificial insemination. *Anim Reprod.* 2019;16(4):803-809.
- [4] Lecewicz M, Strzerek R, Kordan W, Majewska A. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *J. Vet. Res.* 2018;62(2):221-227.
- [5] Souza WL, Moraes EA, Costa JMS, Sousa PHF, Lopes Junior ES, Oliveira RP, Toniolli R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. *Pesq. Vet. Bras.* 2016;36:657-664.
- [6] Medrano A, Contreras CFB, Herrera FM, Alcantar-Rodriguez AM. Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. *Asian Pacific J. Reprod.* 2017;6:241.
- [7] Salgado, LC. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino. Botucatu-SP. 2020, 84 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2020.
- [8] Torres MA, Rigo VHB, Leal DF, Pavaneli APP, Muro BBD, Losano JDA, Kawai GKV, Collado M, Perecin F, Nichi M, Martins SMMK, Andrade AFC. The use of

resveratrol decreases liquid-extend boar semen fertility, even in concentrations that do not alter semen quality. *Res. Vet. Sci.* 2021;136:360-368.

[9] Kadian M, Sharma G, Pandita S, Sharma K, Shrivastava K, Saini N, Kumar A. The Impact of Coenzyme Q10 on Neurodegeneration: a Comprehensive Review. *Curr Pharmacol Rep.* 2022; 8: 1-19.

[10] Carocho M, Ferreira, ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 2013;51:15-25.

[11] Datta U, Sekar MC, Hembram ML, Dasgupta R. Developments of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa *in-situ* at -10°C with electrolyte free medium. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2009;26:467-473.

[12] Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology.* 2014;82:592-598.

[13] Yousefian I, Zare-Shahneh A, Zhandi M. The effect of Coenzyme Q10 and α -Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. *J. Equi. Vet. Sci.* 2014;34:949-954.

[14] Carneiro, JAM. Ação da coenzima Q10 sobre a viabilidade espermática de garanhões resistentes ou sensíveis à congelação. 2017. 63p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2017.

[15] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed. Belo Horizonte, 2013. 104p.

[16] Rodello, L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino (2006) 70p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2006.

[17] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA. Capacitation on bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 1988;38:1171-1180.

[18] Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim. Reprod.* 2012;9:941.

[19] Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Papa FO, Canisso IF, Dell'Aqua Junior, JA. Superoxide Anion is reduced in Gradient selected cryopreserved stallion sêmen despite high mitochondrial potential. *J. Equi. Vet. Sci.* 2018;66:57.

[20] Guasti, P.N. C.P. Freitas-Dell'Aqua, R.R.D. Maziero, F.P. Hartwig, G.A. Monteiro, F.P. Lisboa, F.O. Papa. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *Anim. Reprod.* 2012; 9:929.

[21] Taqueda GS, Azevedo HC, Santos EM. Influencia de aspectos tecnicos e anatomicos nos indices de fertilidade baseado no desempenho da inseminacao artificial transcervical em ovinos. *Ars. Vet.* 2011;27:127-33.

[22] Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 2012;130(3-4):187-

92.

[23] Kumar D, Naqvi SMK. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. *J Anim. Sci. Technol.* 2014;56:8.

[24] Ferreira JCP. Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen eqüino. Botucatu, 2000. 113p. Tese (Doutorado) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2000.

[25] Thomas AD, Meyers SA, Ball BA. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology.* 2006;65:1531-1550.