

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/05/2022.

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 ($OH\bullet$) pela reação de Fenton.....12
- Figura 4.** Formação do radical hidroxil ($OH\bullet$) pela reação de Haber-Weiss.....12

LISTA DE ABREVIações

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.

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.

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.

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.