



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE RUMINANTES

FLÁVIA CAMILA SIQUEIRA PEREIRA RAMALHO

**EFEITO DA COENZIMA Q10 NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

GARANHUNS
2015

FLÁVIA CAMILA SIQUEIRA PEREIRA RAMALHO

**EFEITO DA COENZIMA Q10 NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Coorientador: André Mariano Batista

GARANHUNS
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

R165e Ramalho, Flávia Camila Siqueira Pereira
Efeito da coenzima q10 no meio de fertilização *in vitro*
de embriões bovinos/Flávia Camila Siqueira P. Ramalho.-
Garanhuns, 2015

47fs.

CDD: 636.0829 26

1. Reprodução de bovinos
 2. Melhoramento genético
 3. Fertilização *in vitro*
 4. Sêmem
 5. Estudos quantitativos
- I. Carneiro, Gustavo Ferrer
- II. Título

FLÁVIA CAMILA SIQUEIRA PEREIRA RAMALHO

EFEITO DA COENZIMA Q10 NO MEIO DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Aprovada em: ____/____/____

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Presidente da Banca-Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Profa. Dra. Aurea Wischral
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Dr. André Mariano Batista
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

GARANHUNS
2015

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por **DEUS**, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

A meus pais, **Carlos e Flávia**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade, isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

A meu querido esposo, **Thiago**, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

A minha filha, **Júlia**, que amo incondicionalmente e que foi tão presente no desenvolvimento deste trabalho e que, agora, me inspira a querer ser mais que fui até hoje!

Agradeço também a meus sogros, **Adolfo e Silvia**, pelo incentivo e apoio, colocando-se sempre à disposição para me ajudar. Obrigada pelo carinho!

A meu orientador e co-orientador, sempre disponíveis e dispostos a ajudar. Fizeram-me enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento.

A toda equipe do ANDROLAB, em especial a **Lucinha** pela paciência e ajuda na realização do experimento. Obrigada pela força!

A meus colegas do mestrado, pelos momentos divididos juntos e tornaram mais leve meu trabalho. Foi bom poder contar com vocês!

A todos os professores da pós – graduação que, com ensinamentos, orientações e amizade, me ajudaram ativa ou passivamente neste projeto.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

RESUMO

A produção de embriões *in vitro* (PIV) em bovinos tornou-se importante ferramenta comercial nos programas de melhoramento genético do rebanho mundial como técnica de multiplicação, sendo amplamente utilizada para esse fim. Entretanto a Fertilização *in vitro* (FIV) provoca geração de espécies reativas de oxigênio que podem afetar a viabilidade embrionária. A Coenzima Q10, um cofator de importância na cadeia de transporte das mitocôndrias tem função antioxidante na membrana lipídica e foi verificado uma correlação direta entre a Coenzima e os parâmetros normais de sêmen tais como, densidade, motilidade, morfologia e o volume. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da Coenzima Q10 na função espermática em FIV utilizando-se sêmen convencional e sexado; e se a adição desse cofator pode melhorar a produção embrionária *in vitro* de oócitos bovinos. No Experimento o meio de FIV foi suplementado com 0 (grupo controle), 5 μM , 10 μM , 20 μM da Coenzima Q10. Os Oócitos foram coletados de um abatedouro localizado a 20 minutos do laboratório. Foi observado um efeito deletério da coenzima com diferença significativa nas taxas de clivagem ou na produção de blastocisto ($p < 0,05$) na concentração de 20 μM quando comparado com os demais grupos tanto com sêmen sexado como convencional. Estes resultados demonstram que a suplementação da Coenzima Q10 no meio FIV não altera a função espermática, entretanto tem um efeito deletério a partir da concentração de 20 μM . Podemos ainda inferir que na concentração de 5 μM no meio FIV há uma tendência na melhoria da produção embrionária.

Palavras-chaves: FIV, PIV, Antioxidante.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) in cattle became an important commercial tool in genetic improvement programs of the world herd, being widely used for this purpose. However in vitro fertilization (IVF) can cause generation of reactive oxygen species that can affect embryo viability. Coenzyme Q10, an important cofactor in the transport chain of mitochondria has antioxidant function on lipid membrane and it was proved a direct correlation between the presence of Coenzyme Q10 and normal spermatozoa parameters such as density, motility, morphology and volume. The objective of this study was to evaluate the effect of Coenzyme Q10 on sperm function in IVF using conventional or sexed semen; also if the addition of this cofactor can improve embryo IVP in bovine oocytes. In experiment 1 was evaluated the effect of sperm function during incubation periods of sexed and conventional semen samples. In experiment 2, IVF medium was supplemented with 0 (control group), 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M of Coenzyme Q10. Bovine oocytes were collected from a slaughterhouse located 20 minutes from the lab. It was observed a negative effect of Coenzyme with significant differences in the rates of cleavage or in the production of blastocyst ($p < 0.05$) at a concentration of 20 μ M when compared with all other groups with either sexed as conventional semen. These results demonstrate that supplementation of the Coenzyme Q10 in the IVF medium, do not alter spermatozoa function. We can also infer that there is a tendency to improve embryo production in the concentration of 5 μ M in IVF medium.

Keywords: IVF, IVP, Antioxidant.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Effects of the CoQ10 added through IVF using conventional semen on rates (%) cleavage and blastocyst (D8) of bovine embryos.....	32
Tabela 2 - Effects of the CoQ10 added through IVF using sexed semen on rates (%) cleavage and blastocyst (D8) of bovine embryos.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IA – Inseminação Artificial

FIV – Fertilização *in vitro*

TE – Transferência de Embrião

PIVE – Produção *in vitro* de Embrião

PIV – Produção *in vitro*

MIV – Maturação *in vitro*

CIV – Cultivo *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

Bi – Blastocisto inicial

BL – Blastocisto

BX – Blastocisto Expandido

BE – Blastocisto Eclodido

CoQ10 – Coenzima Q10

SUMÁRIO

	Pág.
1.INTRODUÇÃO	10
2.OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	12
3.1.1 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	14
3.1.2 Fertilização <i>in viro</i> (FIV).....	14
3.1.3 Co-incubação (Estresse Oxidativo).....	15
3.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	17
3.2 Coenzima Q10.....	17
4. REFERÊNCIAS	20
5. ARTIGO CIENTÍFICO	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7.ANEXOS	38

1. INTRODUÇÃO

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas à reprodução animal vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores (RENESTO e COELHO, 2004). Nesse sentido, especialmente no que se refere aos ruminantes domésticos, biotecnias como a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE) vêm sendo utilizadas com sucesso (FIGUEIREDO et al., 2007).

O desenvolvimento de novas tecnologias e a melhora na eficiência na produção de embriões nos últimos anos proporcionou uma tendência mundial de aumento na produção de embriões. Mundialmente, o número total de embriões produzidos (coletados *in vivo* e produzidos *in vitro*) entre 2008 e 2012 teve um aumento de 5,8% (IETS, 2013) e entre 2012 e 2013 o aumento foi de 11,6% chegando ao total de 1.275.874 de embriões (IETS, 2014).

Com relação aos embriões produzidos *in vitro*, a produção da América do Sul corresponde a 72,7% da produção mundial, sendo o Brasil o maior produtor mundial com 366.517 embriões produzidos, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014). O grande destaque brasileiro na produção *in vitro* de embriões se deve, em grande parte, ao tamanho (211.764.000 de bovinos segundo dados do IBGE em 2013) e as características do rebanho nacional com base, principalmente, em raças zebuínas que apresentam maior produção de oócitos por coleta. Vacas Nelores apresentam uma média aproximada de 30 oócitos por sessão de OPU, e devido a grande variação individual podem chegar até 128 oócitos viáveis coletados em um único animal (PONTES et al., 2011).

A Coenzima Q10 (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona) é uma provitamina lipossolúvel sintetizada endogenamente também conhecida como CoQ10 ou ubiquinona (COLLINS;KEMPER, 1999). A CoQ10 é encontrada em todas as células do corpo humano, e as maiores concentrações são observadas nos tecidos do cérebro, coração, fígado e músculo esquelético (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009). Está localizada na membrana interna das mitocôndrias, onde realiza a interação com

enzimas complexas específicas, atuando como um cofator essencial na cadeia respiratória mitocondrial (KUMAR, 2009). Essa coenzima possui a capacidade de proteger fosfolípidos, proteínas da membrana mitocondrial e o DNA dos danos oxidativos (TOMASETTI, 1999).

A Coenzima Q10 foi encontrada na mitocôndria dos espermatozoides, sendo que a sua biodisponibilidade vai condicionar a energia destas células (LEWINS & LAVON *cit. in* Safarinejad, 2009). Também graças a certos estudos, foi verificado que existe uma correlação direta entre a presença da Coenzima Q10 e os parâmetros do sêmen como a densidade, mobilidade, morfologia e o volume (MANCINI et al. *cit. in* Safarinejad, 2009).

Normalmente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/dose); anormalidades espermáticas (%) e o teste de termo-resistencia (lento ou rápido). Estas avaliações vêm sendo utilizadas, desde a década de 80, baseadas nas técnicas e padrões mínimos sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) para a avaliação do sêmen de bovinos, *in natura* ou criopreservado (ARRUDA et al., 1992). O desenvolvimento de técnicas de associação de sondas fluorescentes, que permitam a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial em sêmen bovino (CELEGHINI, 2004; CELEGHINI et al., 2007) tem servido como ferramenta para avaliar os efeitos da criopreservação sobre o sêmen bovino.

Espera-se que com a utilização do antioxidante no meio FIV e conseqüentemente a produção *in vitro* de embriões bovinos seja mais uma ferramenta a ser utilizada para aumentar a qualidade dos embriões, acelerando o ganho genético e o aumento do potencial de produção, com custos mais baixos e de mais fácil aplicação. Esperamos com os resultados obtidos poder transferir conhecimentos, fortalecer a cadeia produtiva e contribuir para o resgate social e geração de emprego e renda em toda região Nordeste.

2. OBJETIVOS

Geral: determinar o efeito da suplementação com Coenzima Q10 no meio de FIV, sobre a função espermática e a produção de embriões *in vitro*, utilizando sêmen convencional e sexado.

Específicos:

- Avaliar o efeito da Coenzima Q10 na taxa de clivagem e blastocisto dos embriões produzidos *in vitro*;
- Avaliar a qualidade seminal através da suplementação do meio FIV com a Coenzima Q10.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) expandiu-se nas diferentes espécies animais pouco tempo após o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta do mundo (STEPTOE e EDWARDS *cit. in* Varago et al. 2008). Em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (BRACKETT *cit. in* Varago et al. 2008), o que só foi possível graças às pesquisas iniciais desenvolvidas com animais de laboratório. A produção comercial de embriões bovinos *in vitro* no Brasil teve início no ano de 1998 com um projeto de inovação tecnológica financiado parcialmente pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelas Empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões (GALLI et al., 2003).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada como base para diferentes estudos relacionados à biotecnologia da reprodução, tanto em animais como em humanos (PALMA & BREM, 1993). A PIVE em bovinos tornou-se importante ferramenta comercial nos programas de melhoramento genético do rebanho mundial e brasileiro como técnica de multiplicação, sendo amplamente utilizada para esse fim (NEVES et al., 2010).

O aprimoramento dos sistemas envolvidos no processo de produção *in vitro* (PIV) de embriões na espécie bovina a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas tem sido fundamentais para o estudo e compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante este período (HOSHI, 2003). A obtenção de oócitos de animais vivos, mediante a técnica de laparoscopia e mais recentemente, por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia, tornou possível a aplicação da técnica de PIV *in vivo* visando aumentar o aproveitamento do potencial genético das fêmeas consideradas superiores (NAGAI, 2001).

Para a produção *in vitro* de embriões, uma das técnicas mais utilizadas para a recuperação de oócitos é a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (RODRIGUES, 2000). Com o auxílio de um ultrassom e um transdutor acoplado a um guia de aspiração, realiza-se a aspiração mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos (AVELINO et al., 2002). Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor (GALLI e LAZZARI, 1996). Realiza-se em seguida a procura e seleção dos oócitos, em microscópio estereoscópico, de acordo com o número de camadas de células do cumulus e o aspecto do citoplasma do oócito (NAGAI, 2001). Os oócitos selecionados são então transportados até o laboratório para que se tenha início o processo de produção *in vitro* de embriões (SANGILD et al., 2000).

A aspiração folicular, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada a predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano em algumas vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (THOMPSON, 2000). Ao contrário da transferência de embriões, a aspiração folicular é considerada uma técnica que apresenta maior flexibilidade, uma vez que pode-se obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, vacas prenhes até o terceiro mês de gestação, vacas entre duas a três semanas após o parto, pode-se usar oócitos de ovários de doadoras de várias idades e estado fisiológico reprodutivo distintos (GALLI e LAZZARO, 1996; YOUNG et al., 1998). A periodicidade pode variar desde a realização de sessões de aspiração de forma esporádica em intervalos de duas semanas, durante várias semanas ou meses (NAGAI, 2001).

Outra vantagem da realização da aspiração folicular em comparação a TE está ligado ao fato de que não é necessário o tratamento das doadoras com gonadotrofinas, o que é considerado benéfico especialmente em novilhas jovens, pois a estimulação hormonal pode provocar edema mamário e síndrome de ovário cístico (YOUNG et al., 1998). Além da possibilidade de levar a casos de infertilidade, a superovulação, feita repetidas vezes, pode provocar ainda relaxamento dos ligamentos do úbere (AVELINO et al., 2002).

A PIVE envolve as etapas de colheitas de oócitos dos folículos ovarianos, maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias (HOSHI,2003).

3.1.1 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação *in vitro* (MIV) é uma técnica reprodutiva que permite que os oócitos atinjam a metáfase II em condição laboratorial e adquiram a competência para serem fecundados e, assim, iniciem a embriogênese (SANTL et al., 1998). Além da maturação nuclear e citoplasmática, foi constatado que as células foliculares, ou seja, as células da granulosa e do "*cumulus oophorus* " têm um papel importante durante a aquisição da competência oocitária na MIV (STAIGNILLER E MOOR, 1984).

A grande maioria dos laboratórios tem utilizado o Tissue Culture Medium (TCM 199) como meio de MIV para oócitos bovinos, sendo geralmente adicionado de soro fetal bovino, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), piruvato, lactato, aminoácidos, bicarbonato de sódio, vitaminas, antibiótico e/ou outros fatores (GUIXUE et al., 2001; GONÇALVES et al., 2007). A MIV é realizada em estufa incubadora com temperatura de 38° C, atmosfera a 5% de CO₂ em ar e umidade saturada e também comumente realizada utilizando meio coberto por óleo mineral para evitar a evaporação (EPPIG, 2001).

3.1.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV é a união do espermatozoide com o oócito no laboratório, formando o embrião que posteriormente será transferido para cavidade uterina (MARTINS, 2007). Essa etapa depende da qualidade dos oócitos e dos espermatozoides utilizados (CARVALHO NETO, 2009). Deve ser proporcionado um ambiente adequado para

permitir o metabolismo dos oócitos e células do cumulus, mantendo a função espermática eficiente e para essa finalidade o meio mais utilizado é o FERT-TALP contendo heparina para capacitação espermática, albumina sérica bovina, além das fontes de energia lactato e piruvato (RENESTO e COELHO, 2004; MINGOTI et al., 2002).

A utilização do sêmen sexado na PIV de embriões permite reduzir o tempo para atingir certos objetivos, por exemplo, o de melhorar a qualidade do rebanho e o número de animais que o integram, produzindo uma proporção ideal de machos e fêmeas. É esperada a elevação do ganho genético em até 15% comparado ao sêmen convencional (TANNO, 2009).

Na maioria dos laboratórios, o processo de FIV em bovinos usa-se sêmen congelado. No entanto, após o descongelamento, é necessário selecionar os espermatozoides vivos e capazes de fecundar, onde é realizada esta seleção na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll, embora outros sistemas possam ser utilizados como o "swin-up" ou lavado espermático (GALLI e LAZZARI, 1996).

O Co-cultivo dos espermatozoides com oócitos é realizado por um período que, dependendo do laboratório, pode variar de 18 a 22 horas, a uma temperatura de 38° C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007).

3.1.3 Co-incubação (Estresse Oxidativo)

O estresse oxidativo consiste num termo genérico dado à situação em que existe desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as substâncias antioxidantes, com predominância das primeiras. Nos sistemas de cultivo *in vitro*, o estresse oxidativo consiste numa das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário em várias espécies (AGARWAL et al., 2005; LUBERDA, 2005).

Segundo Pasqualotto et al. (2000) , o estresse oxidativo tem efeitos deletérios sobre a fisiologia dos espermatozoides como a peroxidação lipídica, dano ao DNA e também tem sido associado com a diminuição da motilidade espermática através da alteração da fluidez da membrana (SALEH et al., 2002; WHATES et al., 2007). De acordo com Aitken et al. (2010), esse estresse não só pode prejudicar a habilidade de

fertilização do espermatozoide, mas também sua competência para apoiar um desenvolvimento normal do embrião.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas a partir das reações de redução do oxigênio (O₂), e constituem parte dos radicais livres. Os principais ROS são os radicais superóxido (O₂⁻) e hidroxil (OH), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que correspondem a redução por um, três e dois elétrons, respectivamente (GUÉRIN et al., 2001). A produção de radicais livres faz parte da fisiologia da célula, porém em excesso podem causar danos as mesmas, levando ao estresse oxidativo.

A produção de ROS pode ter origem diretamente a partir de gametas e embriões, ou através do ambiente, sendo que vários fatores podem contribuir para aumentar essa produção, entre eles pode-se destacar, a alta concentração de oxigênio associada à interferência da luz, o excesso de manipulação e à presença de espermatozoides (GUÉRIN et al., 2001; WANG et al., 2002; LIVINGSTON et al., 2009). O período de incubação dos gametas masculino e feminino pode desencadear um aumento na produção de ROS pelos espermatozoides, prejudicando a formação dos pronúcleos (ALVAREZ et al., 1996). Bedaiwy et al (2004) avaliando a produção e desenvolvimento de embriões humanos *in vitro*, verificaram que, quando o tempo de incubação é reduzido durante a fecundação, juntamente com a adição de vitaminas C e E no meio FIV, a produção de embriões foi maior, e possivelmente devido à menor produção de ROS.

Como proteção aos efeitos nocivos do excesso de metabólitos de oxigênio, chamadas de defesas antioxidantes, são definidas como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste (SIES, 1993). Os antioxidantes podem ser divididos em compostos não enzimáticos e enzimáticos, o primeiro inclui compostos de baixo peso molecular presentes na dieta como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), selênio, zinco, taurinas, hipotaurinas, caroteno, ácido lipóico, ubiquinonas (coenzima Q), entre outros (GUÉRIN et al., 2001 ; NORDBERG & ARNÉR, 2001; MATOS et al., 2002). O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase e o sistema glutatona redutase / peroxidase (GUÉRIN et al., 2001; MATOS et al., 2002).

3.1.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003).

Após o tempo de fecundação, os prováveis zigotos são lavados e transferidos para microgotas de meio de cultivo que é baseado nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação, recobertas por óleo mineral, permanecendo nestas por um período de 6 a 7 dias até os zigotos atingirem os estágios de blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (BL), Blastocisto expandido (BX) e Blastocisto eclodido (BE), onde serão transferidos ou criopreservados (ANTONIOLLI, 2005).

Geralmente, é esperado que, após a MIV, aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação atinjam a metáfase II com expulsão do primeiro corpúsculo polar. Destes, 80% são fecundados e começam a se dividir, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. No entanto, apenas 25 a 40% destes embriões alcançam o estágio de blastocisto à blastocisto expandido (BAVISTER et al., 1992; LONERGAN et al., 2001; NEVES et al., 2010).

A CIV é realizada em estufa incubadora com temperatura de 38,5° C, atmosfera a 5% de CO₂ em ar e umidade saturada e também comumente realizada utilizando meio coberto por óleo mineral para evitar a evaporação (WELLS et al., 1999).

3.2 Coenzima Q10

A coenzima Q₁₀ (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona) também conhecida por ubiquinona foi descoberta em 1957 por Fredrick Crane e a sua equipe, na mitocôndria do coração de boi (KUMAR, 2009; PRAKASH et al., 2010). Essa coenzima pertence a uma série de compostos homólogos que compartilham na sua estrutura um anel benzoquinona, semelhante a uma vitamina, é lipossolúvel e um pó cristalino na sua forma pura (BHAGAVAN & CHOPRA, 2007).

Ela pode ser obtida por duas vias: via exógena pela ingestão de alimentos na dieta ou pela via endógena pelo ciclo do mevalonato (MASON, 2011). Os alimentos

que contêm essa coenzima são produto lácteos, cereais, ovos, frutos secos como nozes e nos vegetais, principalmente espinafre e brócolis (LITTARRU & TIANO, 2010), carne, aves domésticas e em peixes gordos como cavala e sardinhas (KUMAR, 2009). No entanto, a dose da coenzima Q₁₀ que se consegue obter com a ingestão de alimentos, cerca de 2-5 mg/dia, nunca é suficiente para suprir as necessidades do organismo (KUMAR, 2009), isto porque apenas 10% é absorvida lentamente no trato gastrointestinal devido ao seu elevado peso molecular e à sua baixa solubilidade em água (PEPE et al., 2007; SINGH et al., 2007). No ciclo do mevalonato tem como substrato inicial a acetil-CoA e prossegue com a produção do mevalonato e outros intermediários que, tem como produto final o colesterol, o dolicol e a coenzima Q₁₀ (BETINGER et al., 2010).

A coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) é encontrada em todas as células do corpo humano, e as maiores concentrações são observadas nos tecidos do cérebro, coração, fígado e músculo esquelético (SPINDLER et al., 2009). Está localizada na membrana interna das mitocôndrias, onde realiza a interação com enzimas complexas específicas, atuando como um cofator essencial na cadeia respiratória mitocondrial (KUMAR, 2009). Essa coenzima tem a capacidade de proteger fosfolipídios, proteínas da membrana mitocondrial e o DNA dos danos oxidativos (TOMASETTI, 1999), além de apresentar a capacidade de regenerar outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (KIM & PARK, 2010).

O interesse pela coenzima CoQ₁₀ tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido a capacidade de transferir elétrons e atuar como antioxidante (GRONEBERG, 2005; KUMAR et al., 2009). A CoQ₁₀ exerce sua principal função natural na mitocôndria, como parte da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória), mas, está presente também em baixas concentrações no plasma e membranas celulares onde funciona como um antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídios (NORDBERG & ARNÉR, 2001; MARCOFF & THOMPSON, 2007; BENTINGER et al., 2010). De acordo Bentinger et al. (2010), a CoQ₁₀ também se encontra envolvida na regulação do crescimento e diferenciação celular. Apresenta, igualmente efeitos anti-inflamatórios e promove a liberação de óxido nítrico ajudando na disfunção endotelial.

Tem grande importância no tratamento de distúrbios mitocondriais e neuromusculares, bem como nas doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas (CLEREN, 2008; KUMAR, 2009). Além de sua utilização nessas doenças, a CoQ₁₀ é também utilizada na eficácia do tratamento e melhoria da qualidade do sêmen de homens com infertilidade idiopática (BALERCIA, 2009; LITTARRU & TIANO, 2010), em pacientes com câncer de mama (BAHAR, 2010) e mais recentemente, a sua utilização no tratamento da enxaqueca (SUN-EDELSTEIN & MAUSKOP, 2011).

Segundo Safarinejad (2009), a coenzima Q₁₀ foi encontrada na mitocôndria dos espermatozoides de homens, sendo que a sua biodisponibilidade vai condicionar a energia destas células, onde existe uma direta correlação entre a presença da CoQ₁₀ e os parâmetros do sêmen, como a densidade, a motilidade, a morfologia e o volume. Ainda o mesmo autor considera que a melhoria dos parâmetros de sêmen verificados nos estudos anteriores ocorre devido à ação antioxidante dessa coenzima, uma vez que esta é capaz de equilibrar a quantidade de agentes antioxidantes e de espécies reativas de oxigênio que, foram verificados como agentes etiológicos da infertilidade masculina. Entretanto, há apenas escassas informações sobre o efeito desse antioxidante na motilidade de espermatozoides de touros (BALERCIA et al., 2004).

4. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A., GUPTA, S., SHARMA, R. K . Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 3, p.1-21, 2005.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; LULIIS, G. N.; NIXON, B. New insights into sperm physiology and pathology. **Handb Exp Pharmacol**, v. 198, p. 19-199, 2010.

ALVAREZ, J. G.; MINARETZIS, D.; BARRET, C. B. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. **Fertil Steril**, v. 65, p. 400-405, 1996.

ANTONIOLLI, C.B. Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária. **Dissertação (Mestrado)**. Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS, 2005

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p.131-7, 1992.

ANTONIOLLI, C. B. Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária. **Tese (Mestrado)**. Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

AVELINO, K.B.; VANTINI, E.; SENEDA, M.M. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

BAHAR, M. Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. **Nutrition Journal**, v. 62, p. 2-8, 2010.

BALERCIA, G.; MOSCA, F.; MANTERO, F.; BOSCARO, M.; MANCINI, A.; RICCIARDO LAMONICA, G.; LITTARRU, G. Coenzyme Q10 supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. **Fertility and Sterility**, v. 81,p. 93-98, 2004.

BALERCIA, G. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo- controlled, double-blind randomized trial. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 1785-1792, 2009.

BAVISTER, B. D.; ROSE-HELLEKANT, T. A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* mature/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p.127-146, 1992.

BEDAIWY, M. A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M. S. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 593-600, 2004.

BENTINGER, M.; TEKLE, M.; DALLNER, G. Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 74-79, 2010.

BHAGAVA, H.; CHOPRA, R. Plasma coenzyme Q₁₀ response to oral ingestion of coenzyme Q₁₀ formulation. **Mithocondrion**, v.7, p. 72-88, 2007.

CARVALHO NETO, J. O. Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões. **Dissertação (Mestrado)**. Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

CBRA: MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN ANIMAL. Belo Horizonte: **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 2. ed. 1998. 49 p.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Pratical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes **Reproduction in Domestic Animals**, 2007.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS

OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, p.511. Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004.

CLEREN, C. Therapeutics effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, p. 1613-1621, 2008.

COLLINS, C.; KEMPER, K. J. Coenzyme Q10 (CoQ10 or ubiquinona). The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 1999. Disponível em: www.mcp.edu/herbal/default.htm. Acesso em: 21 de outubro de 2014.

EPPIG, J. J. Oocytes control of ovarian follicular developmental and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829-838, 2001.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, p.143-152, 2007.

GALLI, C. LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Journal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GUÉRIN P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 175-189, 2001.

GUIXUE, Z.; LUCIANO, A. M.; COENEN, K. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1733-1743, 2001.

GRONEBERG, D.A. Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. The **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 1208-1218, 2005.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675-685, 2003.

IETS. IETS 2013 Statistics and Data Retrieval Committee Report. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 31 (4) p. 24-, 2013.

IETS. 2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32 (4) p. 14-26, 2014 .

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. Indução da ovulação, produção e transferências de embriões. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7^a ed., São Paulo: Manole, 2004. Cap.29, p. 409-434.

KIM, J.M.; PARK, E. Coenzyme Q10 Attenuated DMH-induced precancerous lesions in SD rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 56, p. 139-144, 2010.

KUMAR, A. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease hypertension and Meniere-like syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 124, p. 259-268, 2009.

LITTARRU G.; TIANO, L. Clinical aspects of coenzyme Q10: An update. **Nutrition**, v. 26, p. 250-254, 2010.

LIVINGSTON T, RICH K, MACKENZIE S, GODKIN JD. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 116, p. 265-273, 2009.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v.41, p.427-437, 2001.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod Biol**, v. 5, p. 5-17, 2005.

PALMA, G. A.; BREM, G. Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción en la Especie Bovina. **Editora Hemisfério Sur**, p. 243-266, 1993.

PASQUALOTTO, F.; SHARMA, R.; NELSON, D. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fert and Stert**, v. 73, p. 459-464, 2000.

PEPE, S.; MARASCO, S.; HAAS, S.; SHEERAN, F.; KRUM, H. ROSENFELDT, F. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. **Mitochondrion**, v. 7, p. 154-167, 2007.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p 1640-1646, 2011

PRAKASH, S.; SUNITHAN, J.; HANS, M. Role of coenzyme Q10 as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 334-337, 2010.

MARCOFF, L.; THOMPSON, P.D. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, p. 2231-2237, 2007.

MARTINS, J. R. A.; TAKADA, L.; ABRAHÃO, R. G.; FREITAS, C. P.; CALEGARI, R. S. Aspiration folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor pra maximizar a produção de embriões bovinos in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1994-1194, 2007 (Resumo).

MASON, P. Potencial uses of coenzyme Q10. **The Pharmaceutical Journal**, v. 275, p. 379-382, 2011.

MATOS, D.G.; GAPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, v. 57, p. 1443-1451, 2002.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-e-SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 175-186, 2002.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. **Anim Reprod Sci**, v.69, p.175- 186, 2002.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. **Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI**. Revista Brasileira de Zootecnia. V. 39, p. 418. Brasília -DF, 2010.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

RENESTO, A. COELHO, L. Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. **Dissertação (Mestrado)**. Arquivo da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP, 2004.

RODRIGUES, C.F.M.; GARCIA, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

SAFARINEJAD, M. Efficacy of Coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. **The Journal of Urology**, v. 182, p. 237-248, 2009.

SALEH, R.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **J Androl**, v. 23, p. 737-753, 2002.

SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MODL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound - guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. **Theriogenology**, v. 50, p. 89-100, 1998.

SIES H. Strategies of antioxidant defense - review. **Eur J Biochem**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Coenzyme Q10 Supplementation and Heart Failure. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. 286-293, 2007.

SPLINDER, M.; BEAL, M.F.; HENCHCLIFFE, C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.5, p. 597-610, 2009.

STAINILLER, R. B.; MOOR, R. M. Effect cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside of the follicle. *Gamete RES.* v. 9, p. 221-229, 1984.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferencia de Embriões. **Sociedade Brasileira de Transferencia de Embriões**, 3.ed. 180p., 1998.

SUN-ELDELSTEIN, C.; MAUSKOP, A. Alternative headache treatments: nutraceuticals, behavioral and physical treatments. **The Journal of Head and Face Pain**, v. 51, p. 469-483, 2011.

TANNO, P.H. Estudo das alterações morfo funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo. **Tese (Mestrado)**. Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2009.

TOMASETTI, M. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 1027-1032, 1999.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryos metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Anim Reprod Sci**, v.60/61, p.263-275, 2000.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

WANG, X., FALCONE, T., ATTARAN, M., GOLDBERG, J. M., AGARWAL, A., SHARMA, R. K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertil Steril**, v.78, p. 1272-1277, 2002.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biol Reproduction**, v. 77, p. 190-201, 2007.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 996-1005, 1999.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev Reprod**, v.3, p.155-163, 1998.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of Coenzymne Q₁₀ in IVF medium on sperm function and bovine *in vitro* production.

F.C.S.P. Ramalho^{a*}, B.B. Santana^a, T.A. Pereira^a, T.R. Vianna^a, A.M. Batista^b, M.M.P. Guerra^b, G.F. Carneiro^a

^{a*} Garanhuns Academic Unity, Federal Rural University of Pernambuco, 55.292-270, Garanhuns, PE, Brazil; ^bAndrology Laboratory, Veterinary Medicine Department, Federal Rural University of Pernambuco, 52.171-900, Recife PE, Brazil;

Abstract

In vitro fertilization (IVF) generates free radical levels which may impair adequate embryo viability. Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) is an essential cofactor of electron transport chain which plays a role as a lipophilic antioxidant component of the lipid membranes that surround all cells and the various organelles such as microsomes and mitochondria. Also, CoQ₁₀ is found in the mitochondria of the sperm, and there is a direct correlation between its presence and semen parameters such as density, motility, morphology and volume. The aim of this study was to evaluate the effect of CoQ₁₀ in sperm function in sexed and conventional semen, and if supplementation on IVF media could improve *in vitro* embryo production. We evaluated its effect on bull sperm function during IVF co-incubation time. We supplemented

*Corresponding author. Tel.: +55 81 96896422;

E-mail address: f.ramalhomedvet@hotmail.com (F.C.S.P.Ramalho).

IVF media culture with 0 (control), 5 μM (T1), 10 μM (T2), 20 μM (T3) using sexed and conventional semen. Bovine oocytes were collected from a local abattoir 20 minutes from the laboratory. There was a decrease in the proportion of oocytes that cleaved in T3 compared to all groups in sexed and conventional semen. In the embryos developed to blastocyst stage in the conventional and sexed semen the behavior was the same as the cleavage status, however when we observed the sexed semen, there was a dose response with significant difference ($P < 0,05$) between all groups compared to T3 group. The results showed that supplementation of IVF media with CoQ_{10} do not alter spermatozoa function as the we had cleavage and blastocyst stage rate results in both conventional and sexed semen. The findings also indicate that supplementation of IVF media with CoQ_{10} (5 and 10 μM) did not improve *in vitro* bovine embryo production, however 20 μM CoQ_{10} could impair blastocyst development *in vitro*.

Keywords: bovine; IVF, IVP, Coenzyme Q_{10} .

1. Introduction

In vitro embryo production is a complex procedure and a challenge for those who try to achieve successful embryo development [1]. This is characterized for many processes and culture media. Different culture media may have varying concentrations of ions and energy substrates, cellular adjustments, and expenditure of energy may be necessary due to change of osmolarity and/or pH. Also metabolic pathways of the embryo may be forced to adjust to changing environment and the consequence of all this imbalance can generate oxidative stress due to the amount of reactive oxygen species (ROS), which are also commonly known as free radicals and may result in reduced developmental potential [2]. To reverse the oxidative stress framework is needed to reduce the production of ROS's or increase the amount of antioxidants available [3].

An excess of ROS affects sperm cell function and might play a negative role in male fertility. CoQ_{10} may play a positive role in the sperm because of its antioxidant properties. Demonstrated positive effects of CoQ_{10} in the treatment of asthenozoospermia due to its

antioxidant properties. CoQ₁₀ levels increased in seminal plasma and in sperm cells after treatment [4].

It is important to take into consideration sperm quality during the IVF process. Integrity of sperm membranes is extremely important for maintenance of spermatozoa fertilizing capacity. The plasma membrane ensures the maintenance of cellular homeostasis, and it exerts a crucial role on sperm survival and preservation of its fertility potential [5]. Also, acrosome integrity is essential to oocyte fertilization process because it is well known that the acrosome reaction allows sperm penetration into the zona pellucida and oocyte plasma membrane fusion [6]. Finally, mitochondrial membrane potential leads to ATP production, which is vital to flagellar and sperm motility [7]. In this study, CoQ₁₀ was diluted in Ethanol (EtOH) and it was necessary to assess sperm viability after EtOH exposure.

The present research was conducted to determine the effect of CoQ₁₀ in sperm function analyzing the cleavage and blastocysts rate results after IVF in sexed and conventional semen and if the supplementation of CoQ₁₀ on IVF media could improve *in vitro* embryo production.

2. Materials and methods

In vitro embryo production

2.1. Coenzyme Q₁₀ preparation

Coenzyme Q₁₀ was purchased from Sigma Chemical Co (cat# C9538). It was diluted in absolute ethanol and kept at - 20 °C until use. Coenzyme Q₁₀ was used in 3 concentrations; 5 μM, 10 μM and 20 μM. In experiment, a culture well dish without CoQ₁₀ was used as a control. Because CoQ₁₀ is lipophilic and practically insoluble in water, it needs to be diluted in alcohol before being added to the culture medium. It was prepared a working solution of CoQ₁₀ after dissolving 1,726 mg in 2 mL of ethanol to achieve the solution of 1 mM. From this working solution, 5, 10 and 20 μL was added to 995, 990 and 980 μL of IVF medium to obtain a concentration of 5, 10 and 20 μM, respectively.

2.2. Oocyte collection and in vitro maturation

Bovine oocytes were collected from a local abattoir 20 minutes from the laboratory and immediately transported to the Laboratory in saline 0.9% NaCl, supplemented with antibiotics at a temperature of 30 °C. Arriving at the lab, Cumulus–oocyte complexes (COC) were aspirated from 2- to 8-mm follicles using an 18-gauge needle attached to a 20-ml syringe. Good-quality oocytes having a corona of cells of at least four layers and a uniformly granulated cytoplasm were selected and washed in holding medium (MM; TCM-199 with Earle's salts, with 25 mM HEPES) and divided into two dishes containing four 70 µL droplets. A total of 852 oocytes were cultured in this research: 107 oocytes were distributed into each of four treatments.

2.3. In vitro fertilization

After IVM for 20-24 h, oocytes were divided into 2 dishes, one for sexed semen and another for conventional semen, containing four 70 µL droplets divided into a control group (CG) containing only IVF medium, and the three droplets following the treatment groups (TG) containing 5, 10 and 20 µM of Coenzyme Q₁₀. For the IVF process, frozen bovine semen obtained from Artificial Insemination Center (ALTA GENETICA®) was used. Semen samples were sexed and conventional, at a concentration of 1 x 10⁶ spz/mL. Straws were thawed in a water bath (37 °C for 30 s). Spermatozoa were selected through a Percoll gradient (90-45%) and washed by centrifugation 3000 g with SP-TALP medium. After sperm capacitation in vitro, were co-incubated for 20-24 h in IVF-TALP [8].

2.4. embryo culture

After fertilization, zygotes were partially denuded and transferred the 60 µl microdrops containing oviductal fluid synthetic medium (SOF). Culture was conducted in incubator at a temperature of 38.5 °C, containing 5% CO₂ in atmospheric air and 99% humidity, for seven

days. Every 48 hours, 50% of the medium was renewed. Cleavage rate was reviewed 48 hours post fertilization according to the Stringfellow and Seidel [9].

2.5. Statistical analysis

All data were tested for normality and homogeneity of variance using Kolmogorov-Smirnov tests and Bartlett. When necessary, data were transformed into square root. Data were analyzed using one-way ANOVA for testing rates of cleavage and blastocyst production, followed by multiple comparison test of Tukey-Kramer (GraphPad InStat, version 10.03, 2009). Data are presented as mean \pm SD and $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

Semen did not show any difference in any parameter measured, however sexed semen had a tendency to decrease quality in motility and increase mitochondrial potential compared to conventional semen.

Cleavage or blastocyst rates were not affected by CoQ₁₀ or solvent supplementation and all groups were able to develop to blastocyst stage. No significant difference was seen in the percentage of cleavage formation either with sexed or conventional semen, however there was a decreased number in cleavage rate in both types of semen when 20 μ M was added to IVF medium but not significant. As for the blastocyst formation, behavior was similar as cleavage with a decrease in both types of semen when concentration of CoQ₁₀ increase from 10 μ M with a significant difference ($P < 0,05$) in the conventional semen in the embryos that were cultured in the presence of 20 μ M CoQ₁₀ compared to those in the other groups. The percentage and number of embryos cleaving and reaching blastocyst stage, in control group (without CoQ₁₀) and media supplemented with CoQ₁₀ are shown in Table 1 and Table 2.

Table 1. Effects of the CoQ₁₀ added through IVF using conventional semen on rates (%) cleavage and blastocyst (D8) of bovine embryos.

Treatment	N° oocytes	Cleavage, % (mean ± SD)	Blastocysts , % (mean ± SD)
Control	107	57,89 ± 18,52	29,38 ± 10,67 ^a
5 µM CoQ ₁₀	107	64,12 ± 20,63	33,25 ± 14,66 ^a
10 µM CoQ ₁₀	107	71,09 ± 15,16	25,32 ± 7,07 ^a
20 µM CoQ ₁₀	107	54,62 ± 25,88	0,93 ± 2,07 ^b

Values with different letters within the same column differ (P <0.05).

Table 2. Effects of the CoQ₁₀ added through IVF using sexed semen on rates (%) cleavage and blastocyst (D8) of bovine embryos.

Treatment	N° oocytes	Cleavage, % (mean ± SD)	Blastocysts , % (mean ± SD)
Control	107	77,96 ± 12,44	42,40 ± 18,95
5 µM CoQ ₁₀	107	78,27 ± 18,45	49,97 ± 16,29
10 µM CoQ ₁₀	107	64,49 ± 9,20	29,91 ± 13,20
20 µM CoQ ₁₀	107	59,87 ± 11,00	21,58 ± 10,45

Values with different letters within the same column differ (P <0.05).

4. Discussion

Deleterious effects of Reactive Oxygen Species (ROS) produced during gamete coincubation on IVF processes has been described, which has a negative effect on embryo quality [10, 11]. As a result, it has been hypothesized that antioxidant supplementation of conventional fecundation media could avoid oxidative stress, thereby improving technique efficiency and embryo quality. Coenzyme Q₁₀ is a potent antioxidant molecule having a protective effects on human sperm motility, DNA fragmentation, and lipid peroxidation [12].

It is described that physiological level of free radicals is needed for normal sperm-oocyte interaction [13], implantation and early embryonic development [14] and this CoQ₁₀ concentration (20 µM) possibly generated a complete depletion of ROS that impairs embryo development. In other hand, a pro-oxidant action of CoQ₁₀ has been described, which stimulates formation of superoxide anion/hydrogen peroxide [15] and can affect the embryo development.

This work check the effects of CoQ₁₀ during IVF and the influence on the subsequent embryo development because it has been hypothesized that CoQ₁₀ present in reproductive tissues contribute to development of IVM-IVF embryos [16].

The results of our study demonstrated that lower concentrations of CoQ₁₀ (5 and 10 µM) did not improve either *in vitro* cleavage rate or blastocyst production. On the other hand, our results demonstrated that CoQ₁₀ (5 µM) slightly increases the proportion of embryos developing to blastocyst stages compared to control and other groups. To the best of our knowledge the effect of CoQ₁₀ added to IVF media has not yet been reported in the literature. However, these results are consistent with reported [17], which shows that the same CoQ₁₀ concentrations, add to embryo culture medium, slightly increases the proportion of mouse embryos developing to blastocyst stages after 48 hours and provides similar blastocyst rate after 72 hours compared to control. Similar results also have been reported with other antioxidants added to bovine IVF media [18].

In contrast, our results shown that 20 µM CoQ₁₀ has a deleterious effect during IVF, using conventional semen, because it subsequently damages embryo development. These results contrast with findings that demonstrated that increasing concentrations of CoQ₁₀ from 10 to 30 or 100 µM improve the rate of early cleavage and that significantly more blastocysts hatched and expanded blastocysts had significantly more inner cell mass cells and trophoctoderm cells at 30 µM CoQ₁₀ in bovine embryo cultures [16]. Although 100 µM CoQ₁₀ was found to be optimum for early cleavage, it significantly reduced the blastocyst development rate compared to 30 µM CoQ₁₀. Similarly, adding 50 µM CoQ₁₀ to *in vitro* maturation medium improved oocyte developmental competence and seems to be a promising candidate for improving *in vitro* production of bovine embryos under moderate harm stress [19].

In summary, this study we have demonstrated that, whereas, the supplementation of IVF medium with CoQ₁₀ (5 and 10 μ M) did not improve *in vitro* bovine embryo production, 20 μ M CoQ₁₀ could impairs blastocyst development *in vitro*.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) due to part of this study was financed by REPENSA PROJECT (PROJETO REPENSA/CNPq/562455/2010-8). and, as well as to CAPES for the scholarship.

References

- [1] Besenfelder U, Havlicek V, Kuzmany A, Brem G (2010) Endoscopic approaches to manage *in vitro* and *in vivo* embryo development: use of the bovine oviduct. *Theriogenology* 2010; 73: 768–776.
- [2] Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction* 2000; 15: 395-401.
- [3] Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 14: 3:28.
- [4] Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Ricciardo Lamonica, G, Littarru G. Coenzyme Q10 supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertility and Sterility* 2004; 81: 93-98.
- [5] Ōura C.; Toshimori K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Citol* 1990; 122: 105–151.
- [6] Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E.; Neill J. D. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven, New York; 1994 , p. 189–318.
- [7] Flesch F. M.; Gadella B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469: 197–235.
- [8] Adona, P.R.; Pires, P.R.L.; Quetglas, M.D.; Schwarz, K.R.L.; Leal, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton,

organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 2008; 108: 49-65.

[9] Stringfellow, D.A.; Seidel, S.M. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy: IETS 1998; 3: 83-88.

[10] Nedambale TL, Du F, Xu J, Chaubal SA, Dinnyes A, Groen W, Faber D, Dobrinsky JR, Yang X, Tian XC. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology* 2006; 66:1951–1960.

[11] Enkhmaa D, Kasai T, Hoshi K. Long-time exposure of mouse embryos to the sperm produces high levels of reactive oxygen species in culture medium and relates to poor embryo development. *Reprod Domest Anim* 2009; 44: 634–637.

[12] Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11: 72 - 81.

[13] de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Human Reprod* 1997; 3: 175-194.

[14] Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro D., Manicardi G., Bianchi, P.G., Shoukir Y., Campana, A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reprod* 1998; 4: 11-19.

[15] Linnane, A.W., Kios M., Vitetta L. Coenzyme Q10 – Its role as a prooxidant in the formation of superoxide anion/hydrogen peroxide and the regulation of the metabolome. *Mitochondrion* 2007; 7: S51–S61.

[16] Stojkovic M, Westesen K, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Boxhammer K, Wolf E. Coenzyme Q(10) in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod* 1999; 61:541–547.

[17] Nozemian Z. *Infertility and Women's Age*. Thesis of Master. University of Toronto, 2001.

[18] Cheuqueman C., Arias M. E., Risopatron J, Felmer R., Alvarez J., Mogas T, Sanchez R.

Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. *Andrologia* 2014; 20: 1111-1123.

[19] Gendelman M, Roth Z. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. *Biol Reprod.* 2012; 16: 87 - 118.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme exposto, este estudo demonstrou que a suplementação do meio FIV com CoQ₁₀ (5 e 10 μ M) não melhorou a PIVE bovinos, sendo que 20 μ M prejudicou o desenvolvimento embrionário.

Apesar dos resultados, acredita-se que o estudo aprofundado dos aspectos bioquímicos e moleculares do antioxidante CoQ₁₀, assim como os aspectos espermáticos são imprescindíveis para maior entendimento, resultando em melhor eficiência na produção *in vitro*.

7. ANEXOS - Normas da Revista Theriogenology

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of').

Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley

(<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009,

p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete

- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF2 α	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

g - gram

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μ L - microliter