

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JÉSSICA FERREIRA RODRIGUES

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO SELÊNIO EM DILUENTE PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO**

**URUGUAIANA
2021**

JÉSSICA FERREIRA RODRIGUES

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO SELÊNIO EM DILUENTE PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Francielli Weber Santos Cibir

Co-orientador: Daniela dos Santos Brum

**Uruguiana
2021**

JÉSSICA FERREIRA RODRIGUES

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE SELÊNIO EM DILUENTE PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN OVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a Francielli Weber Santos Cibir

Co-orientador: Prof^a. Dr^a Daniela dos Santos Brum

Dissertação defendida e aprovado em 23 de agosto de 2021.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a Francielli Weber Santos Cibir (UNIPAMPA)
(Orientador)

Prof^a. Dr^a Monique Tomazele Rovani (UFRGS)

Prof. Dr Guilherme de Medeiros Bastos (UNIPAMPA)

25/08/2021

SEI/UNIPAMPA - 0598458 - SISBI/Folha de Aprovação



Assinado eletronicamente por **FRANCIELLI WEBER SANTOS CIBIN, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/08/2021, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Monique Tomazele Rovani, Usuário Externo**, em 24/08/2021, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **GUILHERME DE MEDEIROS BASTOS, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/08/2021, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0598458** e o código CRC **CA13DB4B**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. A minha avó e maior amiga, Luiza Eneida, pelo apoio, amizade, incentivo em todas as trajetórias da minha vida.

À Universidade Federal do Pampa, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e ao Laboratório BIOTECH, aos professores e alunos deste.

À minha orientadora e amiga, Prof. Francielli Weber Santos Cibir. Agradeço pela oportunidade, amizade, pelo incentivo constante, conselhos e por ser um exemplo de liderança.

Ao colega Lucas da Campo, obrigada por todos ensinamentos e parceria a campo.

Aos amigos Bruno, Leonardo e Karen. Agradeço pela amizade, meus irmãos que fui presenteada com a graça de Deus e por todas as conversas produtivas.

À Juliana Ferst, essa amizade que chegou para somar e ensinar muito também.

Ao órgão de fomento CAPES pelo apoio financeiro para implementação dos experimentos.

À Cabanha Santa Angela e a Renascer biotecnologia, que apoiaram e foram parceiros para que o projeto se consolidasse.

À banca examinadora deste trabalho, obrigada pela disponibilidade e por todas as contribuições.

“Não basta saber, é preciso também aplicar;
não basta querer, é preciso também fazer”.

Goethe, Máximas e reflexões.

RESUMO

O uso de biotecnologias reprodutivas em pequenos ruminantes tem auxiliado o melhoramento genético, melhorando os índices reprodutivos, principalmente de rebanhos de elite. A técnica de criopreservação de sêmen possibilita a formação de bancos genéticos, a comercialização do mesmo, bem como o aumento dos rebanhos. Porém, o uso de sêmen congelado nas rotinas de inseminação artificial não é comum devido a alguns limitantes, dentre eles o investimento em mão de obra qualificada e a baixa viabilidade do sêmen pós-descongelamento. Assim, buscamos com esse trabalho investigar a influência do selênio sobre a qualidade espermática de sêmen de carneiros submetido à criopreservação. Foram coletados ejaculados de quatro carneiros, totalizando quatro réplicas, e agrupados em *pools*. Após, os mesmos foram avaliados quanto à qualidade e concentração espermática e divididos em grupos: controle resfriado por 2h e controle resfriado por 4 horas; selênio orgânico (selenofuranosídeo) submetidos à curva de resfriamento de 2h e 4h, ambos suplementados nas concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ e selênio inorgânico (selenito de sódio) sob as mesmas condições descritas, totalizando dez grupos. Para diluição, foi utilizado o meio Tris-gema para obter uma concentração de 400×10^6 espermatozoides/mL e envasado em palhetas de 0,25mL, as quais foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. Palhetas de cada grupo foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 20 segundos e submetidas à avaliação de cinética, integridade de membrana plasmática, acrossomal, mitocôndrias com atividade e marcadores de estresse oxidativo. A suplementação do extensor de congelamento com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de selenofuranosídeo (ORG) submetido à uma curva de resfriamento de 4 horas aumentou a motilidade dos espermatozoides ($80,72\% \pm 6,51$) quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de resfriamento de equilíbrio ($62,67\% \pm 6,38$) ($P = 0,0099$). A suplementação de selenito de sódio (SeNa) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ usando a curva de resfriamento de 2 horas mostrou um aumento na motilidade

espermática ($76,11\% \pm 14,57$) quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de resfriamento de equilíbrio ($52,73\% \pm 2,06$) ($P = 0,0099$). Nos demais parâmetros avaliados, não foram observadas alterações significativas em relação ao tempo de resfriamento (2 ou 4 h) e em relação aos tratamentos (ORG e SeNa) nas concentrações utilizadas. Assim, nosso estudo indica que a suplementação com selenito de sódio e selenofuranosídeo, em baixas concentrações, poderia ajudar a melhorar a motilidade total de sêmen de carneiro criopreservado.

Palavras-chave: Sêmen, carneiro, estresse oxidativo, criopreservação, selênio

ABSTRACT

The use of reproductive biotechnologies in small ruminants has aided genetic improvement and has reproductive rates, especially in elite herds. The semen cryopreservation technique enables the formation of gene banks, its commercialization, as well as the increase of the herds themselves. However, the use of frozen semen in artificial insemination routines is not common due to some limitations, including the investment in qualified labor and the low viability of the semen after thawing. Thus, we seek with this study to improve the ram semen quality through investigations of the influence of selenium on cryopreserved sperm. Ejaculates were collected from four rams and pooled. Afterwards, they were evaluated for sperm quality and concentration and divided into groups: control cooled for 2 hours and control cooled for 4 hours; organic selenium (selenofuranoside) subjected to a cooling curve of 2h and 4h, both supplemented at concentrations of 0.5 and 1 μL and inorganic selenium (sodium selenite) at the same conditions. The groups were diluted in Tris-yolk medium at a concentration of 400×10^6 sperm/mL and then bottled in 0.25mL straws. The straws were then frozen and stored in liquid nitrogen. Straws from each group were thawed in a water bath at 37°C for 20 seconds and submitted to evaluation of kinetics, plasma membrane integrity, acrosomal, mitochondria with activity, biochemical tests and GPx enzyme activity. Supplementation of the freezing extender with 0.5 μM selenofuranoside (ORG) subjected to a 4-hour cooling curve increased sperm motility ($80.72\% \pm 6.51$) when compared to the control group at the same equilibrium cooling time ($62.67\% \pm 6.38$) ($P = 0.0099$). Supplementation of 0.5 μM sodium selenite (SeNa) in the group using the 2-hour cooling curve showed an increase in sperm motility ($76.11\% \pm 14.57$) when compared to the control group at the same equilibrium cooling time ($52.73\% \pm 2.06$) ($P = 0.0099$). No alterations were observed in the other evaluated parameters considering the cooling times (2 and 4 h) as well as the treatments (ORG and SeNa) in the concentrations used

in this study. In conclusion, our study indicates that supplementation with sodium selenite and selenofuranoside, at low concentrations, could help to improve the total motility of cryopreserved ram sperm.

Keywords: Semen, ram, oxidative stress, cryopreservation, selenium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Ovinocultura no Brasil e Rio Grande do Sul	14
2.2 Criopreservação do sêmen	15
2.3 Criopreservação e crioinjúrias	16
2.4 Uso de antioxidantes na criopreservação	18
2.5 Selênio	20
3 OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
1. Introduction.....	26
2. Material and methods.....	27
2.1 Chemicals	27
2.2 Animals and semen collection	27
2.3 Extender and semen processing.....	28
2.4 Sperm kinetics	29
2.5 Sperm morphology	29
2.6 Assesment of sperm viability using fluorescent probes	30
2.7 Sperm oxidative stress	31
2.8 Statistical analysis.....	32
3. RESULTS	32
3.1 Sperm kinetic	32
3.2 Sperm morphological evaluation	38
3.3 Sperm acrosomal integrity, membrane integrity and mitochondria potential.....	39
3.4 Oxidative stress.....	42
4. DISCUSSION	44
5. CONCLUSION	47
6. REFERENCES	47
5 CONCLUSÃO.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
ANEXO – Certificado de aprovação para uso de animais em pesquisa	58

1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino mundial conta com mais de 1,2 bilhão de cabeças (Juan et al., 2016) e encontra-se em crescente expansão. No Brasil, um aumento de 4,1% foi observado no ano de 2019 quando comparado ao ano de 2018, totalizando um rebanho de 19,7 milhões de animais segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Dentro dos núcleos genéticos, o principal produto são os reprodutores, e a genética que eles carregam precisa ser disseminada para rebanhos multiplicadores e comerciais.

A criopreservação é uma excelente técnica para conservação de material genético por tempo indeterminado e foi utilizada pela primeira vez em meados de 1960 como uma alternativa para a preservação da fertilidade (Curry, 2000). É uma biotécnica que apresenta como vantagem a seleção de material genético desejado e a possibilidade de grande distanciamento temporal e espacial entre o momento da coleta do sêmen e a realização do protocolo de inseminação artificial. Porém, o sêmen congelado/descongelado acaba tendo a viabilidade comprometida devido a alterações estruturais e fisiológicas, resultando em mudanças na conformação lipídica da membrana plasmática, danos no DNA, acrossoma alterado bem como motilidade reduzida (Leboeuf et al., 2000). Estas alterações que podem levar a danos irreversíveis a nível celular estão em parte relacionadas ao estresse oxidativo ocasionado durante a criopreservação. Esse estado é caracterizado pelo desequilíbrio entre as defesas antioxidantes naturais das células e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Falchi et al., 2018). As ERO são intermediários que apresentam grande poder de oxidação, provenientes do metabolismo fisiológico do oxigênio, tendo sua produção aumentada por alguma disfunção biológica. Os agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelas ERO nas células são os antioxidantes.

Com o intuito de reduzir os efeitos negativos da criopreservação, causados pelo estresse oxidativo, diversos protocolos utilizam diluentes suplementados com diferentes tipos de

antioxidantes a fim de alcançar melhores taxas de prenhez (Allai et al., 2018). Muitos estudos têm demonstrado que a suplementação do diluente com antioxidantes adequados proporcionam uma melhora na qualidade das células espermáticas pós-descongeladas (Naiem et al., 2017). Neste sentido, estudos evidenciam os efeitos benéficos da utilização do selênio, tanto na sua forma orgânica quanto inorgânica, em relação ao potencial antioxidante.

Embora os primeiros estudos com o selênio estejam relacionado aos seus efeitos tóxicos, atualmente sabe-se que ele é um elemento essencial em mamíferos com várias funções no crescimento e funcionalidade das célula (Loef et al., 2011). É um constituinte das selenoproteínas que conferem proteção contra danos oxidativos aos espermatozoides durante a maturação e servindo como componente estrutural das células espermáticas maduras, conferindo viabilidade e proteção contra as ERO (Ahsan et al., 2014a). Ainda não há um consenso em relação ao potencial antioxidante, a forma de selênio utilizada, bem como a dose e/ou concentração ideal para a obtenção dos efeitos benéficos desejáveis, o que tem estimulado pesquisas científicas neste sentido. O selenito de sódio teve sua capacidade antioxidante demonstrada em estudos utilizando sêmen de bubalino e bovino congelado, porém a literatura não fornece nenhuma informação utilizando sêmen ovino (Dorostkar et al., 2012). Os estudos utilizando formas orgânicas de selênio na melhora da qualidade do sêmen criopreservado estão mais relacionados com a suplementação dietética (Khalil-Khalili et al., 2021); (Zarei et al., 2021). Recentemente, selênio orgânico (selenometionina) foi utilizado em diluente para estoque por 24 h, sob refrigeração, em 2 linhagens de sêmen de galos, comparando seus efeitos com outros antioxidantes (Łukaszewicz et al., 2020). No referido estudo, a adição de selênio ao diluente não trouxe benefício na qualidade do sêmen refrigerado.

O potencial antioxidante de um composto orgânico de selênio sintético (selenofuranosídeo) já foi demonstrado em estudos *in vitro* (Vargas et al., 2013) e em modelos experimentais utilizando

camundongos e ratos (Spiazzi et al., 2015; Ramalho et al., 2018). Porém, nenhum estudo foi realizado com este composto em sêmen criopreservado.

Desta forma, o presente trabalho avaliou a suplementação do diluente Tris-gema com duas formas de selênio, orgânica e inorgânica, com o objetivo de melhorar a qualidade das células espermáticas após o descongelamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ovinocultura no Brasil e Rio Grande do Sul

Presente em praticamente todos os continentes, a ovinocultura é considerada uma atividade muito importante. A ampla difusão da espécie se deve à sua fácil adaptação a diferentes climas, vegetações e relevos. Tal atividade está destinada à exploração econômica, bem como para a subsistência das famílias de pequenos produtores (WAQUIL & SPOHR, 2010).

Sabe-se que a ovinocultura possui grande importância econômica nas regiões onde é bem consolidada, e é uma das atividades pecuárias mais antigas do país. O Rio Grande do Sul sempre teve destaque na criação de ovinos, porém, a crise internacional da lã ocorrida na década de 90 acarretou na redução no número de produtores, gerando conseqüentemente um decréscimo no rebanho gaúcho (TRIERVEILER PEREIRA, 2015). Em contrapartida o nordeste brasileiro foi adquirindo espaço nesta área, quase dobrando o número de ovinos e mostrando constante evolução, se estabelecendo como vitrine na criação de ovinos (VIANA, 2008). Desde o ano de 2016 a Bahia continua ocupando o primeiro lugar, com o maior rebanho de ovinos do país, totalizando 4,49 milhões de cabeças, representando 22,1% do rebanho nacional. Logo em seguida, temos o estado do Rio Grande do Sul, com um efetivo total de 3,05 milhões de cabeças, 15,51% do rebanho brasileiro (MAGALHÃES ET AL., 2020).

Considerando que o consumo da carne ovina no Brasil é inferior quando comparada ao consumo de bovinos, suínos ou aves, ainda assim necessita importar carne estrangeira. A escassez da carne ovina para comercialização é reflexo de alguns fatores, como qualidade da carne e principalmente com a falta de animais prontos para serem abatidos (VIANA, 2009). Visando o aumento da produtividade dos rebanhos, os animais vêm sendo submetidos a um manejo sanitário, nutricional e reprodutivo adequados e, neste contexto, as biotécnicas aplicadas à reprodução são

uma importante ferramenta que pode ser utilizada pelos criadores para uma maior eficiência reprodutiva.

Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução, o crescimento da inseminação artificial (IA) tem ocorrido paralelamente ao desenvolvimento da tecnologia para utilização de sêmen congelado. A IA consiste na aplicação do sêmen no aparelho reprodutor feminino por meio de aplicador de sêmen algum instrumento. Quando combinadas com outras biotecnologias como sincronização/indução de estro, pode acarretar valor genético ao rebanho, expandindo o uso de machos com características produtivas desejáveis (BONFIM & MELO, 2015).

Dependendo do local para deposição do sêmen, existe uma técnica mais indicada de IA. Para utilização de sêmen fresco, por exemplo, é realizada por deposição vaginal (pericervical), em que a indicação é utilizar sêmen fresco. Para a utilização de sêmen resfriado ou congelado, o indicado é deposição intracervical, ou intrauterina, em que se utiliza a técnica conhecida como laparoscópica.(CSEH ET AL., 2012). Porém, sabe-se que ao utilizar sêmen congelado as técnicas indicadas são a laparoscopia ou transcervical, para que assim melhores taxas de prenhez sejam atingidas (KUMAR & NAQVI, 2014), demandando custos mais elevados e recursos humanos especializados.

2.2 Criopreservação do sêmen

A utilização de sêmen ovino criopreservado possibilitou um aumento no fluxo de material genético de elite, atingindo pequenos e grandes produtores de maneira positiva. Através da facilidade de transporte entre propriedades, sendo elas próximas ou distantes, o material desejado pode atingir facilmente o produtor.

Para se utilizar o sêmen criopreservado, o mesmo é submetido a diluição, com a finalidade de fornecer um meio adequado para que o mesmo se mantenha conservado. A diluição é necessária

por razões biológicas e técnicas. A questão biológica se torna fundamental pois fornece ao espermatozoide proteção a alterações de pH, e nutrientes para as células espermáticas. Já a razão técnica tem como objetivo aumentar o volume do ejaculado, a fim de inseminar um maior número de fêmeas (CUETO M, GARCÍA VINENT J, GIBBONS A, WOLFF M, 1993).

Quando o sêmen é submetido ao processo de congelamento e é armazenado em nitrogênio líquido (-196°C) as reações metabólicas das células desaceleram até serem completamente interrompidas, permitindo assim a preservação do material por longos períodos. Portanto, o material genético permanece disponível para utilização em qualquer época do ano (FONSECA ET AL., 2014).

Para que se obtenha taxa de fertilidade satisfatória, o sêmen congelado deve ser usado por meio de inseminação laparoscópica. Caso seja utilizado através de via cervical, os resultados podem ser insatisfatórios (CSEH ET AL., 2012).

As possíveis causas da baixa fertilidade após inseminação cervical com sêmen congelado foram exaustivamente estudadas por (SALAMON & MAXWELL, 2000). Os autores estabeleceram duas principais limitações. A primeira é devida a anatomia do colo do útero da fêmea, pois a espécie ovina possui um maior número de anéis cervicais, e tortuosos em comparação com outras espécies, tornando-se uma barreira física para a deposição do sêmen. Já a segunda limitação está relacionada com a célula espermática propriamente dita, pois as células da espécie ovina são mais sensíveis a criopreservação quando comparada com outras espécies.

2.3 Criopreservação e crioinjúrias

Como visto anteriormente, existem muitos benefícios na utilização do sêmen criopreservado. No entanto, a criopreservação é um processo que causa estresse à célula

espermática, expondo os espermatozoides a condições desfavoráveis, prejudicando assim sua viabilidade.

A exposição das células espermáticas ao choque frio e a indução à formação de cristais de gelo podem ocasionar danos irreversíveis aos espermatozoides, causando alterações estruturais e funcionais que afetam diretamente a sobrevivência dos espermatozoides (ABDELHAFEZ et al., 2009). A curva de resfriamento é uma questão fundamental para o sucesso da criopreservação das células (WATSON, 1981). O período de equilíbrio é o tempo no qual o espermatozoide permanece a temperatura de 4 a 5 °C antes do congelamento. Esse tempo é crucial para que as células espermáticas consigam interagir com os constituintes do meio, e assim obter a máxima resistência aos danos causados pela criopreservação (ENGLAND, 1993). Embora o efeito do tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen tenha sido estudado em várias espécies, incluindo ovinos, os resultados são contraditórios.

As crioinjúrias podem ocorrer por estresse oxidativo, o qual pode envolver a oxidação de lipídios, proteínas, danos ao DNA, alterações na permeabilidade e fluidez da membrana plasmática, e danos ao acrossoma, prejudicando assim, sua viabilidade e afetando a fertilidade (LUSHCHAK, 2014).

O estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies reativas, em especial as espécies reativas de oxigênio (ERO), e as defesas antioxidantes das células. Tal condição pode acontecer pela elevação de espécies reativas produzidas, pelo declínio das defesas antioxidantes, ou ambos concomitantemente (HALLIWELL, 2011).

As ERO mais conhecidas e estudadas em relação aos danos celulares são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). A literatura evidencia que baixas concentrações de ERO estão fisiologicamente envolvidas na reação de capacitação e manutenção dos espermatozoides. Desta forma, o prejuízo ocorre quando a produção destes se torna exacerbada (BAUMBER et al., 2000), podendo induzir apoptose, peroxidação lipídica

das membranas plasmáticas, danos ao DNA e rompimento das mitocôndrias (BOLLWEIN et al., 2008).

A composição lipídica da membrana plasmática é um fator extremamente importante, que tem influência direta na criotolerância e sensibilidade das células espermáticas ao frio (Tran et al., 2017). Sabe-se que o espermatozoide ovino é extremamente suscetível à peroxidação de fosfolipídios que compõe a membrana plasmática, acarretando em mudanças estruturais, em particular na região do acrossoma, modificação no metabolismo da célula, alterações no conteúdo intracelular e motilidade reduzida (ALVAREZ & STOREY', 1983).

2.4 Uso de antioxidantes na criopreservação

Os antioxidantes são os agentes responsáveis pela redução e inibição das lesões causadas às células pelas ERO. Estes podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (HALLIWELL, 2000). Existe um conjunto de principais enzimas responsáveis pelas defesas antioxidantes endógenas, tendo destaque a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Já a glutathione (GSH) destaca-se como antioxidante não-enzimático, assim como peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Existem ainda os antioxidantes conhecidos como exógenos, provenientes da dieta, como o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno (pró-vitamina A), flavonoides, ácido ascórbico (vitamina C) e minerais antioxidantes (zinco e selênio) (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

O uso de antioxidantes como suplementos em meios básicos de diluição, a fim de manter o equilíbrio das ERO e proteger as células espermáticas de danos oxidativos durante a criopreservação, mostrou um crescente interesse entre pesquisadores (SOUZA et al., 2019),

(AL-MUTARY et al., 2020). Embora as pesquisas neste sentido tenham avançado bastante em relação ao uso de diferentes antioxidantes, os resultados são contraditórios.

Câmara e colaboradores (2011) demonstraram que a adição de glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase ao diluente de criopreservação de sêmen ovino não aumentou a capacidade antioxidante total, bem como não melhorou a qualidade do sêmen após o descongelamento. Por outro lado, Maia e colaboradores (2010) estudaram o efeito da catalase e Trolox, um análogo da vitamina E sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento. Estes autores encontraram que os dois antioxidantes reduziram a peroxidação lipídica e a geração de H_2O_2 , mas não alteraram os parâmetros de cinética espermática avaliados (motilidade total e motilidade progressiva)

Mais recentemente, Elsayed e colaboradores (2019) verificaram, também em sêmen ovino, que a suplementação de diluente de criopreservação com genisteína, uma isoflavona com potencial antioxidante, foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante, reduziu a lipoperoxidação, além de reduzir a fragmentação de DNA e a expressão da proteína pró-apoptótica caspase-3 na concentração de 10 μM . Por outro lado, uma concentração maior de genisteína (100 μM) causou efeitos deletérios à célula espermática e integridade funcional. Em um estudo de revisão, a cisteamina teve seu benefício comprovado melhorando parâmetros de motilidade e viabilidade em sêmen ovino criopreservado (Peker Akalin et al., 2016). Assim como a glutathione, além de melhorar a motilidade, demonstrou resultados positivos relacionados à integridade de membrana e atividade mitocondrial (Shi et al., 2020). Ainda na mesma revisão, a atividade da quercetina melhorou o potencial de membrana e mitocondrial (Silva et al., 2012). A melatonina teve sua capacidade antioxidante total e redução nos níveis de malondialdeído (MDA) comprovada em diversos estudos (Dai et al., 2019).

Embora muitos estudos tenham sido realizados neste sentido demonstrando benefícios, a identificação de antioxidantes que sejam capazes de minimizar os danos às células espermáticas

durante a criopreservação é um procedimento complexo, devido à variação nas características antioxidantes do ejaculado entre as diferentes épocas do ano, as diferenças entre reprodutores ou mesmo entre diferentes ejaculados de um mesmo carneiro.

2.5 Selênio

Vital para a saúde humana e dos animais em pequenas quantidades, o selênio (Se) foi descoberto em 1817 e por muito tempo foi considerado vilão, por sua toxicidade (DUMONT et al., 2006). Este composto ocorre como um metabólito natural, contudo, o mesmo se torna prejudicial em excesso. No entanto, estudos realizados posteriormente demonstraram seu envolvimento em diversas funções biológicas, tendo destaque para seu potencial antioxidante. PAPP et al., 2007 atribuíram tal benefício pela sua presença no sítio ativo de enzimas que possuem atividade antioxidante, como a glutathione peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase. A forma inorgânica se dá em quatro estados de oxidação, são eles selênio elementar, seleneto, selenito e selenato (TINGGI, 2003). É um ingrediente presente em diversos multivitamínicos e outros suplementos para benefício da saúde, sendo assim responsável por mediar várias funções em humanos e animais, e como mencionado anteriormente, ele é considerado um componente vital de enzimas antioxidantes (RAYMAN, 2012).

Estudos realizados evidenciam o importante papel do Se na reprodução masculina. Embora compostos de selênio, tanto formas orgânicas quanto inorgânicas, tenham atividade antioxidante *in vitro* demonstrada, a maior parte dos estudos avalia o efeito destes compostos em suplementação nutricional. A literatura mostra estudos realizados com diferentes espécies, em que a morfologia dos órgãos reprodutivos masculinos necessitam de suprimento dietético adequado de Se, seja ele orgânico ou inorgânico (AHSAN et al., 2014b).

MARAI et al. (2009) relataram a utilização de selenato de sódio auxiliando na melhoria da qualidade de sêmen de carneiros, beneficiando parâmetros como a motilidade e reduzindo o número de espermatozoides mortos, anormalidades e danos ao acrossoma. A inclusão de selênio orgânico na dieta de galos também teve seu benefício comprovado, melhorando a quantidade e qualidade do sêmen fresco e congelado da espécie (CHAUYCHU-NOO et al., 2021).

No entanto, alguns estudos avaliaram o papel do selênio *in vitro*, como em cultura de células (ZENG, H. 2009) e na criopreservação de sêmen humano (REZAEIAN et al., 2016). Uma melhora geral na motilidade do sêmen de touros pós descongelamento foi observada quando o diluente base foi suplementado com nanocápsulas de Se, demonstrando impacto positivo na atividade antioxidante (KHALIL, EL-HARAIY, et al., 2019). Outro estudo realizado demonstrou que a suplementação de selenito de sódio pode amenizar efeitos negativos causados pelo congelamento em sêmen de búfalos, melhorando a motilidade, viabilidade e integridade de membrana plasmática. SENTKOWSKA & PYRZYNSKA, (2019) compararam o potencial antioxidante de formas inorgânicas e orgânicas de selênio isoladas e misturadas a chás e verificaram que as formas orgânicas teriam maior potencial antioxidante (SENTKOWSKA & PYRZYNSKA, 2019).

O composto orgânico de selênio (selenofuranosídeo – Figura 1) já teve seu potencial antioxidante demonstrado sobre a atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase de ovário de vaca, *in vitro* (Vargas et al., 2013) e em modelos experimentais utilizando camundongos e ratos (Spiazzi et al., 2015; Ramalho et al., 2018).

Considerando todos os aspectos destacados, existe uma ampla discussão em relação ao potencial antioxidante do selênio, devendo ser considerado a forma de selênio utilizada bem como a dose e/ou concentração ideal para a obtenção dos efeitos benéficos desejáveis. Sendo assim, torna-se interessante avaliar o efeito do selênio na criopreservação de sêmen ovino e se teria diferença de efeito entre uma forma inorgânica e uma forma orgânica deste micronutriente.

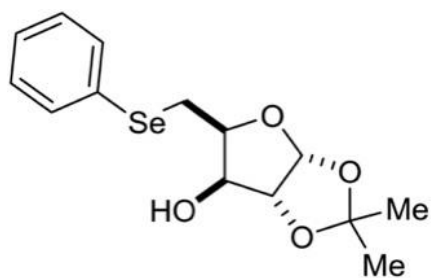


Figura 1: Estrutura química do selenofuranosídeo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de duas formas de selênio na qualidade espermática durante a criopreservação de sêmen ovino resfriado por diferentes períodos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se a suplementação do diluente utilizado para criopreservação de sêmen ovino, resfriado por 2 ou 4 horas, utilizando selênio inorgânico (selenito de sódio) e uma forma orgânica, (selenofuranosídeo) possui a capacidade de promover benefícios sobre:

- Alterações na qualidade e viabilidade espermática (morfologia, cinética, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial de mitocôndria) provocados pela criopreservação;
- Desequilíbrio em biomarcadores de estresse oxidativo provocados pela criopreservação: espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total e atividade da enzima glutathione peroxidase.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido posteriormente.

Effect of organic and inorganic selenium on frozen-thawed ram semen using two periods of cooling

Jéssica Ferreira Rodrigues, Lucas da Campo, Diogo Ferreira Bicca, Diogo Seibert Ludtke, Daniela dos Santos Brum, Francielli Weber Santos Cibin

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of different selenium compounds on sperm quality on ram semen cryopreservation. Ejaculates from 4 rams were collected using an artificial vagina heated to 38°C, individually evaluated. Ejaculates were pooled and diluted 1:1 (v:v) in Tris-egg yolk extender (20%, v/v), separated into a control group, cooled for 2 hours and a control group, cooled for 4 hours, supplemented with 0.5 and 1 µg/mL of organic selenium (ORG) in the two times of cooling. The same was done for the inorganic selenium (SeNa) group. The samples were bottled in 0.25 ml straws, at a concentration of 400×10^6 sperm/mL and stored in liquid nitrogen. The straws were thawed in a water bath at 37°C for 20 seconds, the samples were submitted to sperm kinetics evaluation by CASA software. Sperm membrane integrity, acrosomal morphology and mitochondrial potential were assessed. In addition, oxidative stress markers (FRAP, ROS, TBARS, and GPx enzyme activity) were evaluated. No significant improvement was observed in ram semen quality comparing the two cooling times. Supplementation of the freezing extender with 0.5 µg/mL ORG subjected to a 4-hour cooling curve increased sperm motility when compared to the control group at the same equilibrium cooling time. In addition, 0.5 µg/mL SeNa in the group using the 2-hour cooling curve showed an increase in sperm motility when compared to the control group at the same equilibrium cooling time. Taking into account the importance of the sperm motility as an important parameter to fertility, our study indicates that supplementation with ORG and SeNa, can help to improve the total motility of cryopreserved ram semen.

Key words: Semen, ram, oxidative stress, cryopreservation, selenium

1 INTRODUCTION

Cryopreservation is a widely used biotechnology aimed at genetic improvement, expansion of desirable traits in the herd, animal health as a whole, as well as the possibility of shifting genetics between regions (HOLT, 2000).

However, it is known that the cooling, freezing and thawing of the ovine sperm cell can cause irreversible damage to it, thus compromising its fertilizing capacity (HEZAVEHEI ET al., 2018). Among these cryoinjuries we can highlight physical and chemical changes in the cell, such as the formation of ice crystals, changes in membrane permeability, damage to DNA, acrosome, excessive production of reactive oxygen species (ROS), others (MAXWELL & SALOMON, 1993). Oxidative stress caused during cryopreservation is one of the main factors responsible for damaging sperm cells. This state is characterized by an imbalance between the cells' natural antioxidant defenses and the ROS production (FALCHI ET AL., 2018). However, it is known that low levels of ROS are involved in important events such as capacitation, hyperactivation and acrosome reaction.

The literature proves, through studies carried out in recent years, peculiar characteristics that make ram cells more susceptible to the mentioned damages (Grötter et al., 2019). The sperm membranes have a high concentration of polyunsaturated fatty acids, for this reason they are more exposed to damage caused by oxidative stress and lipid peroxidation (Ezazi et al., 2019).

In view of this scenario, several researches have been developed with the use of different antioxidants in order to supplement the base extenders and improve the quality of post-thawed ram semen. In this way, ascorbic acid, reduced glutathione (GSH), ubuquinones, hypotaurines, astaxanthin, soy lecithin, resveratrol, among other presented beneficial effect in ovine semen cryopreservation (ABDI-BENEMAR ET AL., 2020; AL-MUTARY ET AL., 2020; LIU ET AL., 2020; MASOUDI ET AL., 2020).

Selenium is an essential element in mammals with several roles in cell growth and functionality. It is a constituent of selenoproteins, such as thioredoxin reductase and glutathione peroxidase (GPx) that provide protection against oxidative damage to sperm, preserving semen viability (DOROSTKAR ET AL., 2012). Organic and inorganic selenium forms have its antioxidant capacity proven in different animal models. Most of these studies evaluate nutritional supplementation. Still, there is a debate about the best form, whether organic or inorganic, as well as its dose or concentration to achieve its desired beneficial effects. As far as we know, no studies have been carried out to prove the antioxidant effect of selenium on cryopreserved ram semen.

The aim of our study was to evaluate the quality of cryopreserved ram semen supplemented with two forms of selenium, at different concentrations and at two cooling periods after thawing.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Sodium selenite (SeNa) and other chemicals used in this study were obtained from Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA). Selenofuranoside (Se) was synthesized according to (BRAGA et al., 2013).

2.2 Animals and semen collection

The experiment was carried out in Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil (S: 29° 44 ' 58", W: 57° 5' 18"), during the spring, in the months of November and December. After general physical and breeding soundness examination, four clinically healthy Ideal and Merino rams were used. The 18-month-old animals were fed a ration at 14% protein, 1% body weight given twice daily and native field pasture at will. The semen was collected twice a week with artificial vagina (four collections). After collection, the ejaculates were evaluated for aspect, volume and gross motility and diluted in extender 1:1 (v.v). This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Pampa (017/2019).

2.3 Extenders and semen processing

Tris-egg yolk extender was made with (3.63g of Tris, 0.5g fructose, 1.99g citric acid, 14ml egg yolk, 100,000 IU penicillin, 100mg streptomycin and 100ml distilled water). A sample of 500 μ L of each ejaculate was used to form a pool for group formation. Subjective analyzes such as motility, turbulence, color and volume of the ejaculate were verified before freezing. Pool aliquot was diluted with base extender containing sodium selenite (SeNa: 0.5 and 1 μ M), selenofuranoside (ORG: 0.5 and 1 μ M) and no antioxidants (Control) with a final concentration of 400×10^6 sperm/mL. Thus, extended semen were manually packed into 0.25 mL mini straws (IMV[®] Technologies, L'Aigle, Cedex, France) at room temperature, and were immediately cooled to 5 °C in a refrigerated room. All groups were submitted to two different cooling curves, 2 and 4 hours of equilibrium, with a total of 10 groups (Figure 1). All straws were placed horizontally on a wire plate 4 cm above the nitrogen surface and frozen for 10 min, subsequently plunged into liquid nitrogen cylinder at -96°. In total, our study had 10 groups. Samples were thawed in water at 37 °C for 30 sec.

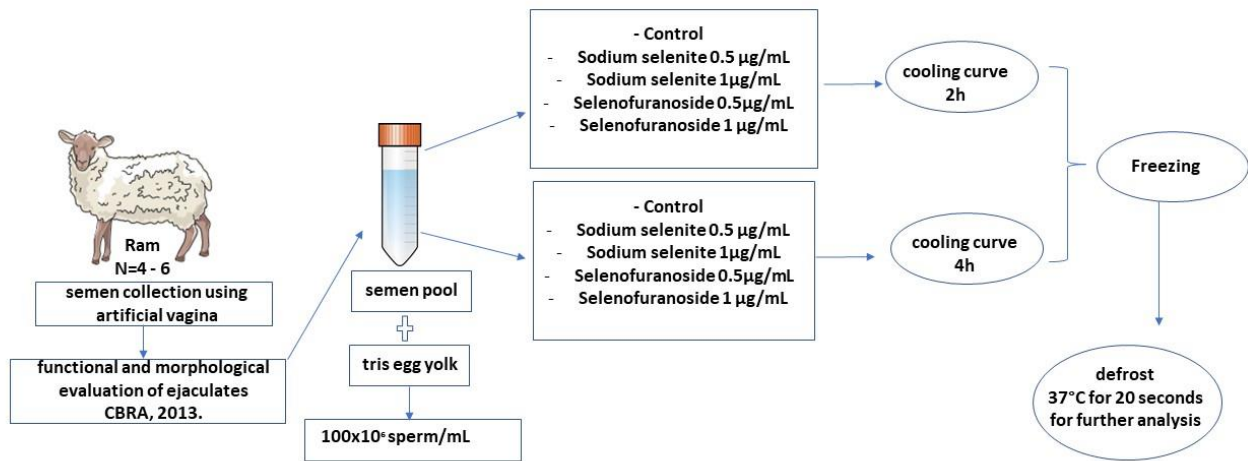


Figure 1: Experimental procedure

2.4 Sperm kinetics

The sperm kinetics was evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system fitted with the Sperm Class Analyzer (SCA) software (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). The software configurations were adjusted for ram sperm. The settings used for the sperm image analyses were as follow: the spermatic head dimensions between 18 and $60 \mu\text{m}^2$, slow sperm between 10 and $45 \mu\text{m/s}$, average sperm between 45 and $75 \mu\text{m/s}$ and rapid sperm above $75 \mu\text{m/s}$. Spermatozoa presenting straightness (STR) above 80% were considered progressive (SOUZA ET AL., 2019). Between the following parameters were analyzed: Rapid, medium and slow sperm, total motility (TM; %), progressive motility (PM; %), curvilinear velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$), (LIN; %), amplitude of lateral head displacement (ALH; μm), tail beat frequency (BCF; %), and percentage of sperm with rapid movement (Hyperactivity; %).

2.5 Sperm Morphology

An aliquot of semen was fixed (1:20) in formaldehyde 4%. The sperm morphology was analyzed at $1000\times$ magnification in a stained glass slide with Bengal Rose counting a total of 200 cells/group/replicate and was assessed the proportion of abnormal forms in each sample based on a method described by Barth and Oko (BARTH, A. D., & OKO, 1989). The sperm concentration was determined by Neubauer chamber under a 400x magnification optical microscope. Spermatozoa in 10 of the 25 squares (0.04mm^2) and the results were converted to a concentration in sperm per mL by multiplying the number of sperm counted by 0.5×10^6 .

2.6 Assessment of sperm viability using fluorescent probes

The sperm membrane integrity, acrosomal integrity and mitochondrial membrane potential were concomitantly evaluated to sperm viability. Semen samples ($150\ \mu\text{L}$, $25 \times 10^6\text{sptz/mL}$) were reached with $3\ \mu\text{L}$ of PI ($0.5\ \text{mg/mL}$), $6\ \mu\text{L}$ of JC-1 ($153\ \mu\text{M}$), $50\ \mu\text{L}$ of FITC-PSA ($100\ \mu\text{g/mL}$). An aliquot ($8\ \mu\text{l}$) sample of stained sperm suspension was placed on a slide, covered with a coverslip and immediately evaluated by epifluorescence microscopy (Nikon, model Eclipse 80i) on a triple filter (D / F / R, C58420), showing a set: UV-2E / C (excitation 340–380 nm and emission 435–485 nm), B-2E / C (excitation 465–495 nm and emission 515–555 nm) and G-2E / C (excitation 540–525 nm and emission 605–655 nm), with magnification of $1000\times$. Two hundred sperm cells per slide were examined and classified based on the fluorescence emitted by each probe (DE ANDRADE et al., 2007).

To the integrity of the sperm membrane, green fluorescence was interpreted as an intact membrane, whereas red indicated a damaged membrane. For detection of acrosomal integrity, sperm were classified as having an intact acrosome when the acrosome region was stained fluorescent green, and as having a reacted acrosome when the fluorescent green was absent from the head region, or when it was present in the equatorial region of the sperm head. For mitochondrial membrane potential using lipophilic cationic JC-1, cells were examined and classified as having

high mitochondrial membrane potential when emitting orange fluorescence in the region of the midpiece, and as having low mitochondrial membrane potential when emitting green fluorescence.

2.7 Sperm oxidative stress

ROS levels were measured using a spectrofluorimetric method (Loetchutinat, 2005), where sperm cells (10 μ L) were incubated in 2,990 μ L of Tris-HCl buffer (10 mM, pH = 7.4) containing 1 mM of 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) for 60 min at 37°C in the dark. This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production. DCHF-DA is a stable, cell-permeable nonfluorescent probe. It is de-esterified intracellularly and becomes the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was used to detect intracellular ROS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) using a Shimadzu spectrofluorometer (model RF5301PC, Japan). ROS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

Lipid peroxidation was performed as described by OHKAWA et al (1979) the formation of thio-barbituric acid reactive species (TBARS), which reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a color complex which was determined spectrophotometrically at 532 nm. An aliquot of semen samples was with acid buffer (Acetic acid/HCl, 100 mM, pH: 3.4), TBA 0.8 % and sodium dodecyl sulfate (SDS) 8.1%. The mixture was boiled for 1 hour. A malondialdehyde (MDA) curve was performed. The data were expressed as nmol MDA/mg protein.

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed as a total antioxidant potential quantification on the semen samples. In this assay, the antioxidants present in the sample are evaluated as reducers from Fe^{+3} to Fe^{+2} , which is chelated by 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form the Fe^{+2} -TPTZ with maximum absorption at 593 nm (IRIS F. F. BENZIE, 1996). A standard curve of ascorbic acid was used, and the results were expressed as the μ g equivalents of ascorbic acid.

The GPx enzyme activity was analyzed by (PAGLIA and VALENTINE.,1967). The reaction mixture consisted of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM sodium azide, 0.2 mM reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH), 1 U/mL glutathione reductase, and 1 mM GSH. An enzyme source was added to the above mixture, which was incubated at 25 °C for 5 min before the start the reaction induced by 0.25 mM H₂O₂. The absorbance was monitored at 340 nm for 5 min as NADPH is converted to NADP⁺. The GPx activity was expressed as U/mL according the slope of the lines as micromoles of NADPH oxidized per minute.

2.8 Statistical analysis

Normality distribution for the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Results with parametric distribution were analyzed through two-way ANOVA, and a *post hoc* Tukey test was applied when necessary. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0.1 software. Values were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3 RESULTS

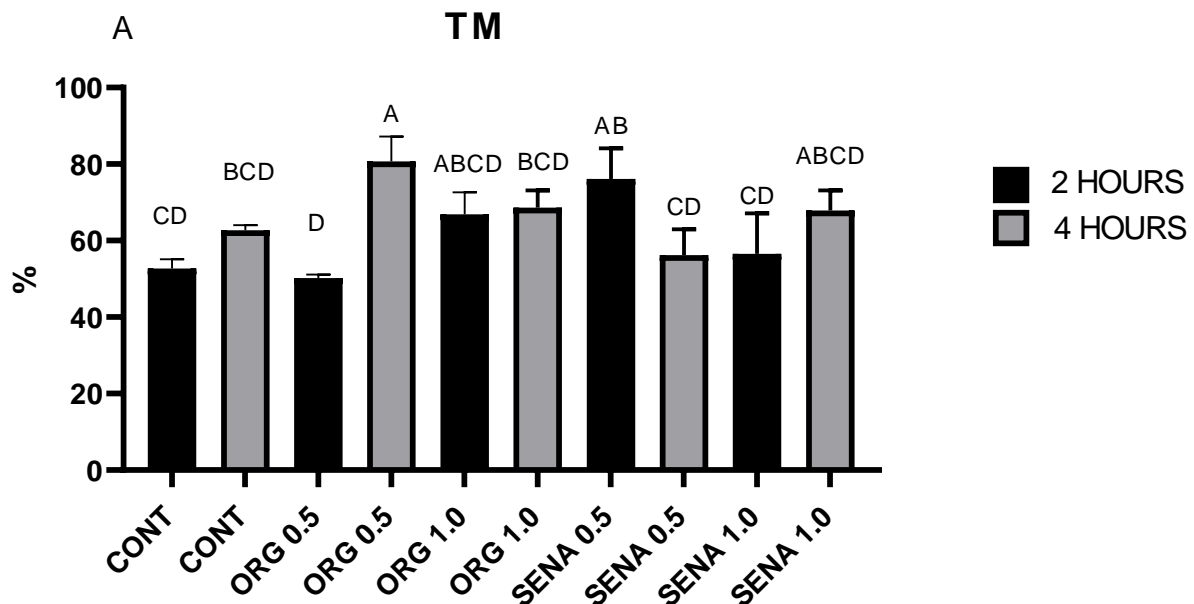
3.1 Sperm kinetic

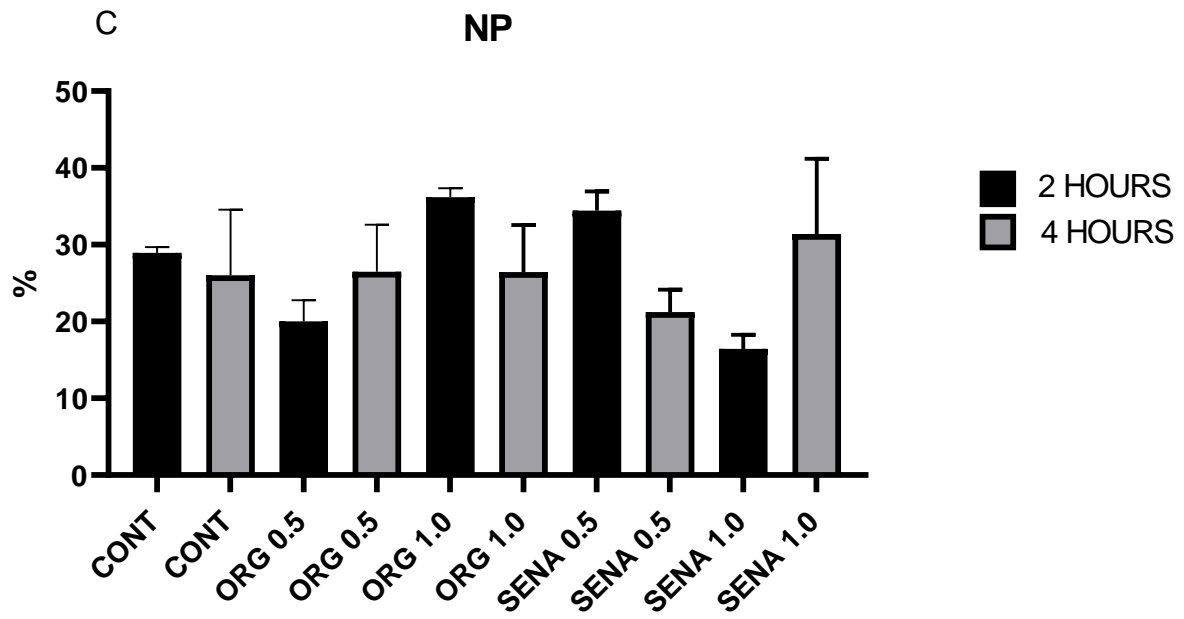
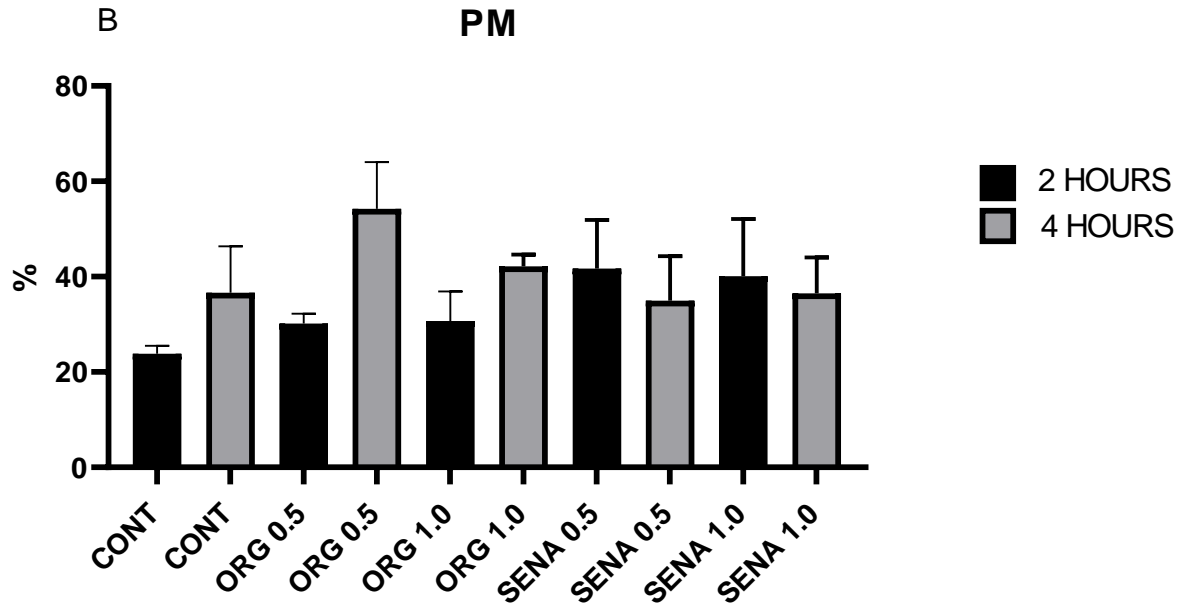
The effect of organic and inorganic selenium supplementation added to Tris-egg-yolk extender on ram semen cryopreserved in relation to sperm kinetic parameters, using two times of cooling equilibrium (2 and 4 hours) are presented in Figure 2 (A-I).

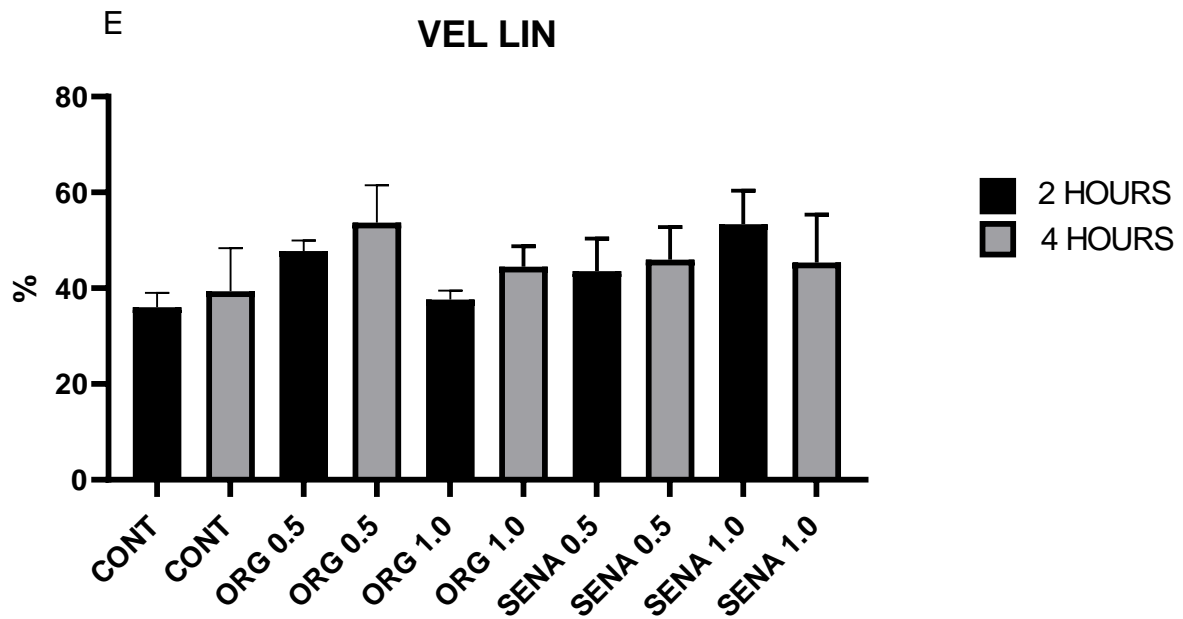
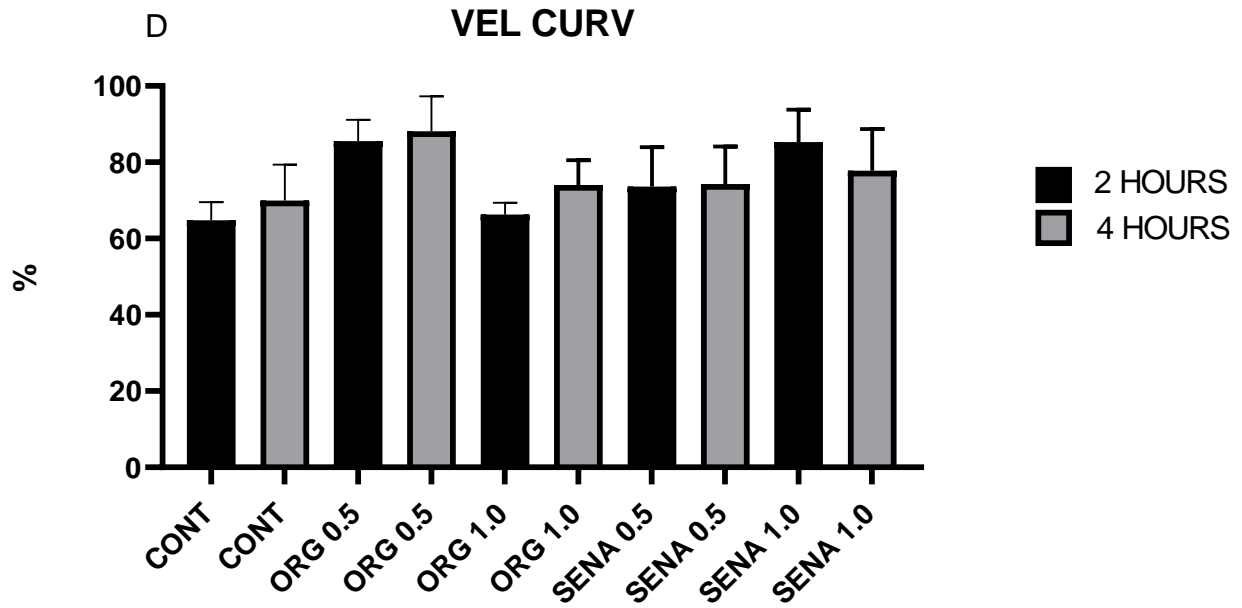
Supplementation of the freezing extender with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ selenofuranoside (ORG) subjected to a 4 hour cooling curve increased sperm motility (80.72 % \pm 6.51) when compared to the control group at the same time of equilibrium cooling (62.67 % \pm 6.38) ($P = 0.0099$) (Fig. 2A). Sodium selenite (SeNa) supplementation (0.5 $\mu\text{g/mL}$) in the group using 2 hour cooling curve

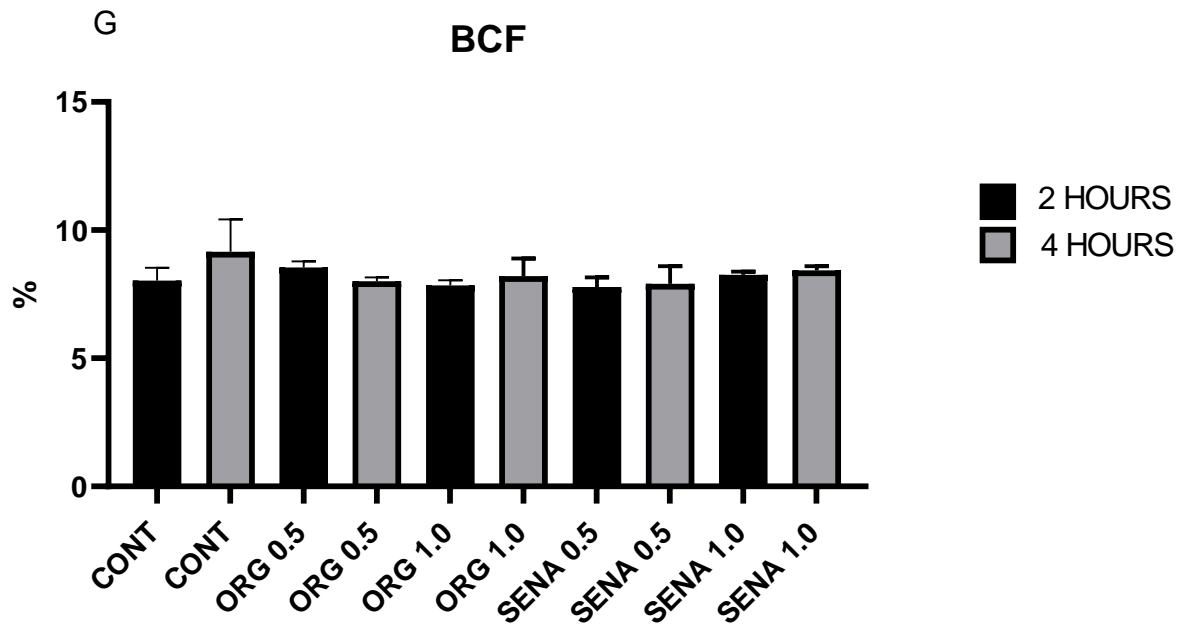
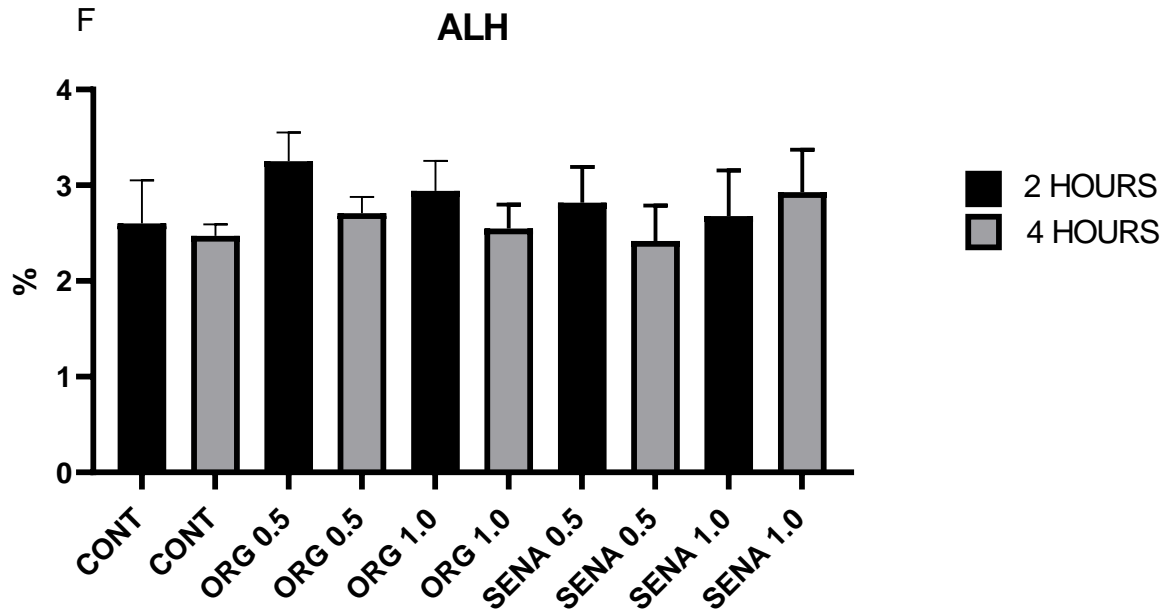
showed an enhance in the sperm motility ($76.11 \% \pm 14.57$) when compared to the control group at the same time of equilibrium cooling ($52.73 \% \pm 2.06$) ($P = 0.0099$) (Fig. 2A).

No significant differences were observed after organic and inorganic selenium addition to a basic cryoextender in relation to progressive motility (PM) (Fig. 2B), non-progressive motility (NP) (Fig. 2C), curvilinear velocity (VCL) (Fig. 2E), linear velocity (LIN) (Fig. 2F), lateral head amplitude (ALH) (Fig. 2G), beat frequency (BCF) (Fig. 2H) and hyperactive (Fig. 2I).









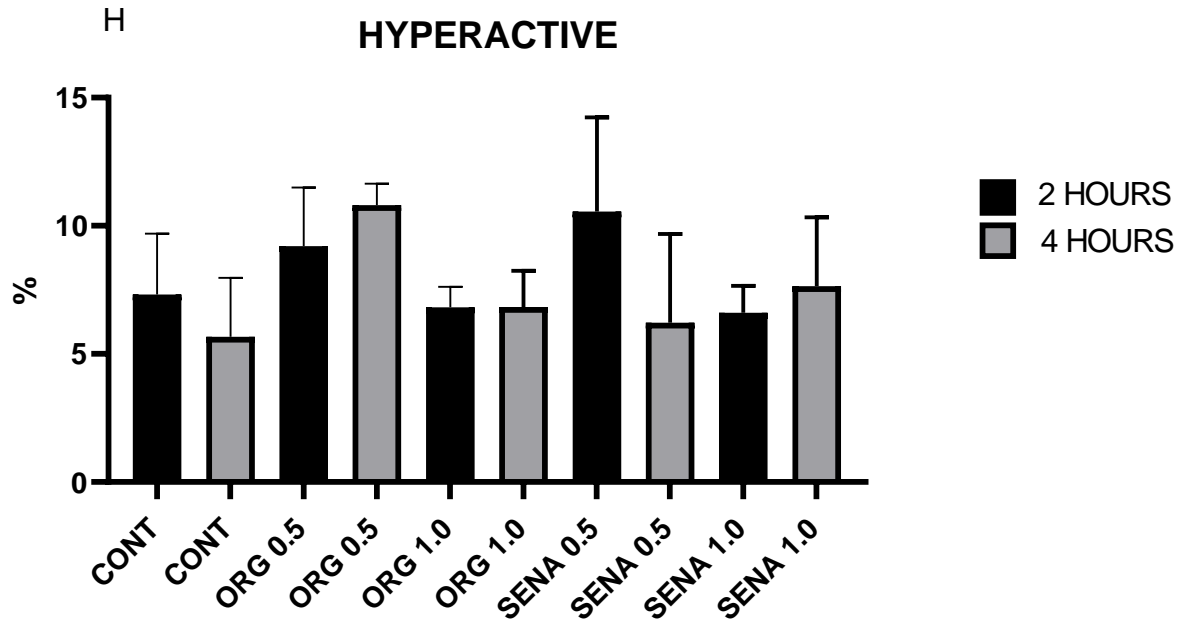
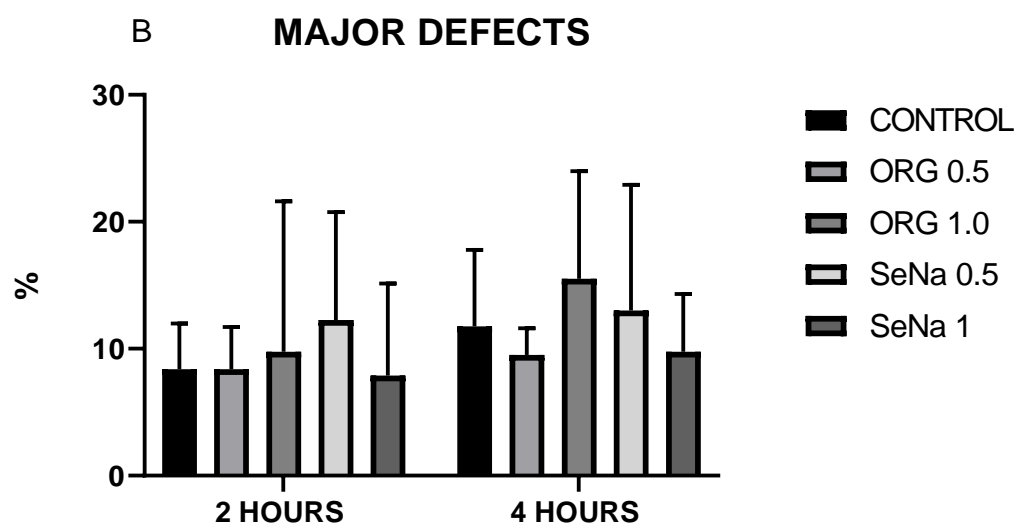
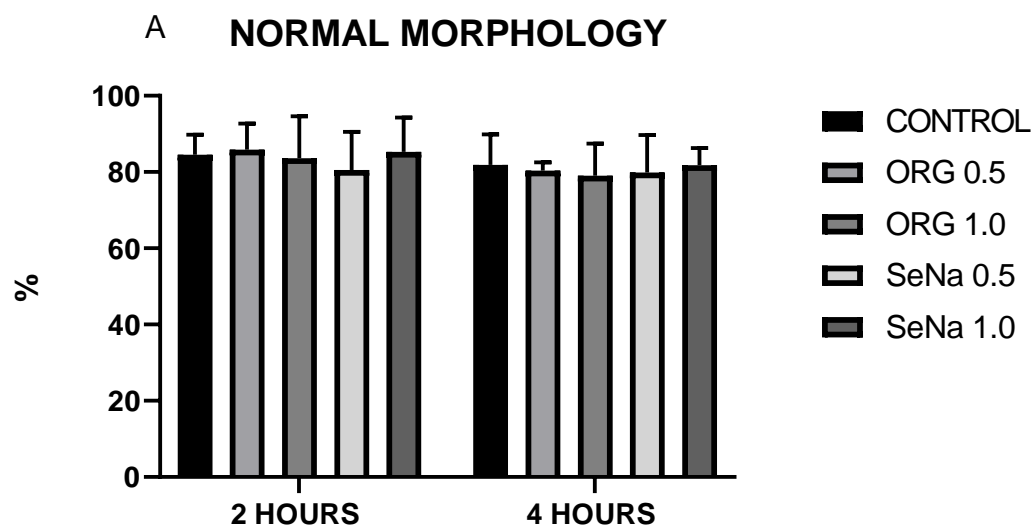


Figure 2. Effect of organic (ORG) and inorganic selenium (SeNa) supplementation (0.5 and 1 μ M) added to Tris-egg-yolk extender, using two cooling curves (2 and 4 h) on post-thaw ram sperm kinetic by the Sperm Class Analyzer System (CASA). Data are expressed in % (Mean \pm SEM). A: Total motility (TM), B: progressive motility (PM), C: non-Progressive (NP), D: curvilinear velocity (VCL), E: linear velocity (LIN), F: lateral head amplitude (ALH), G: beat frequency (BCF) and H: hyperactive.

3.2 Sperm morphological evaluation

The data of sperm morphology after the sperm cryopreservation were demonstrated in the Figure 3. We did not observe significant differences between morphologically normal cells in the different groups in their different cooling curves. [F (4, 30) = 0.1118 P = 0.9774] (Fig. 3A). Regarding the major defects (Fig. 3B, [F (4,30) = 0.1594 P = 0.9572]) and minor defects (Fig. 3C, [F (4,30) = 0.9323 P = 0.4585]) no significant differences was observed in relation the selenium supplementation as well as in relation to the cooling curves (2 and 4 h).



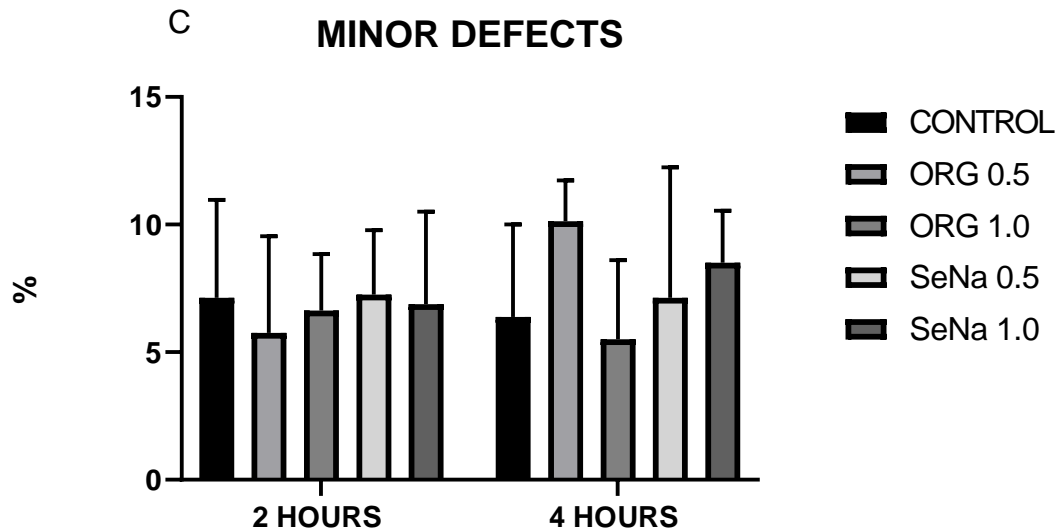
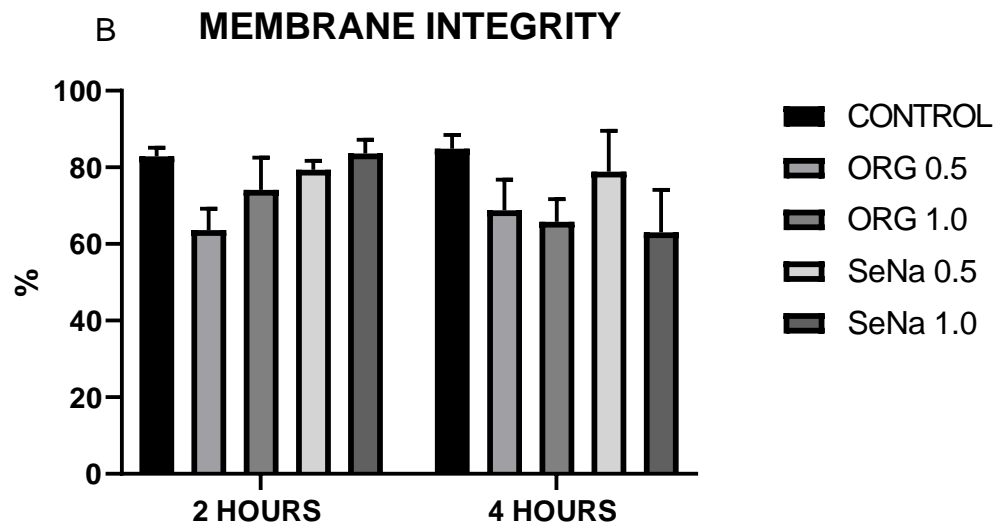
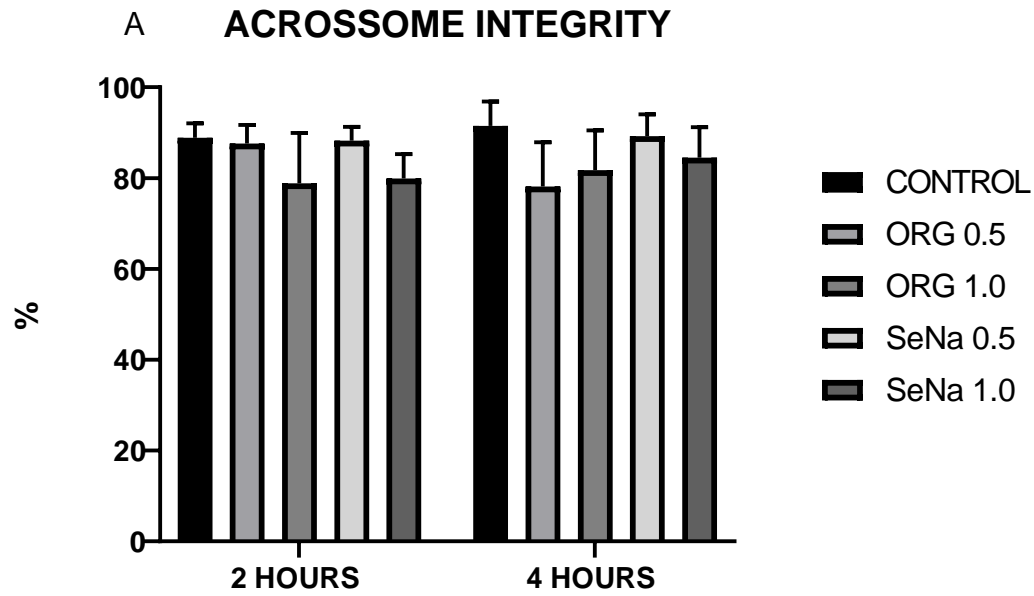


Figure 3. Effect of organic (ORG) and inorganic selenium (SeNa) supplementation (0.5 and 1 μ M) added to Tris-egg-yolk extender, using two cooling curves (2 and 4 h) on morphological evaluation of post-thaw ram sperm. Data are expressed as % (Mean \pm SEM). A: normal sperm, B: sperm with major defects and C: sperm with minor defects. The percentage was taken from a total of two hundred cells counted.

3.3 Sperm acrosomal integrity, membrane integrity and mitochondria potential

The effect of organic and inorganic selenium supplementation to Tris-egg-yolk extender was verified on ram semen in relation to spermatoc viability. A total of two hundred cells were counted and the results expressed as percentage. No significant difference was observed on acrosomal integrity considering the treatment groups as well as in relation to the cooling curves (2 and 4 h), [F (4.30) = 0.3480 P = 0.8433] (Figure 4A). In the same way, the supplementation with different forms of selenium at different concentrations subjected to two cooling curves did not provide any improvement after thawing in the membrane integrity [F (4.30) = 1.004 P = 0.4210] (Fig. 4B) and mitochondria potential [F (4.30) = 0.4595 P = 0.7648] (Fig 4C).



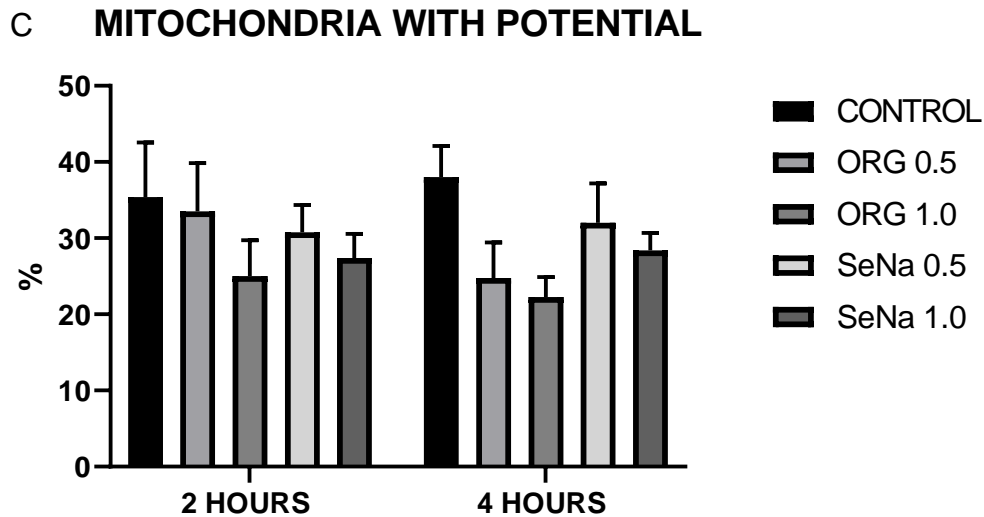
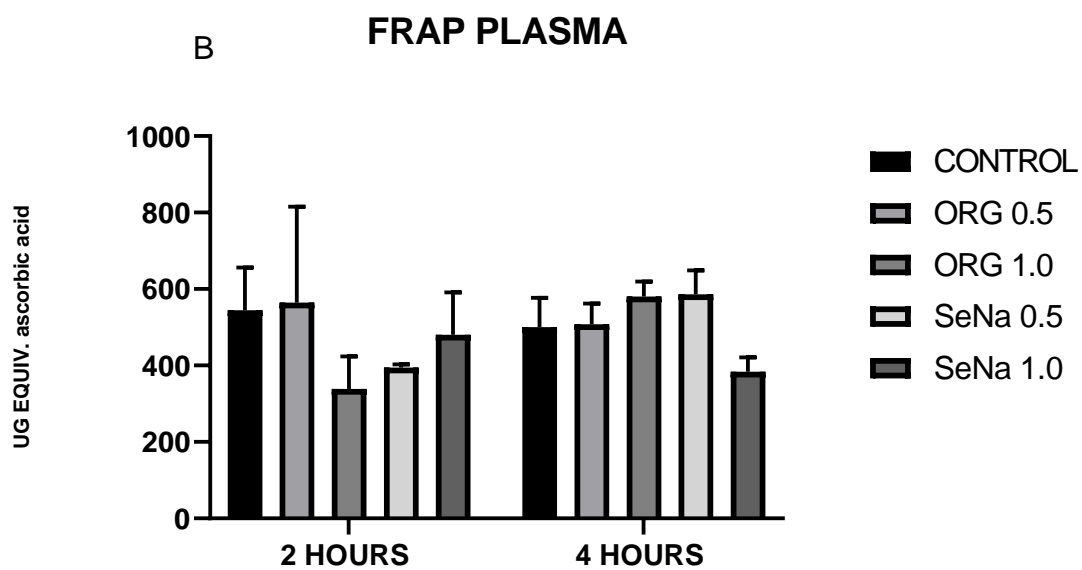
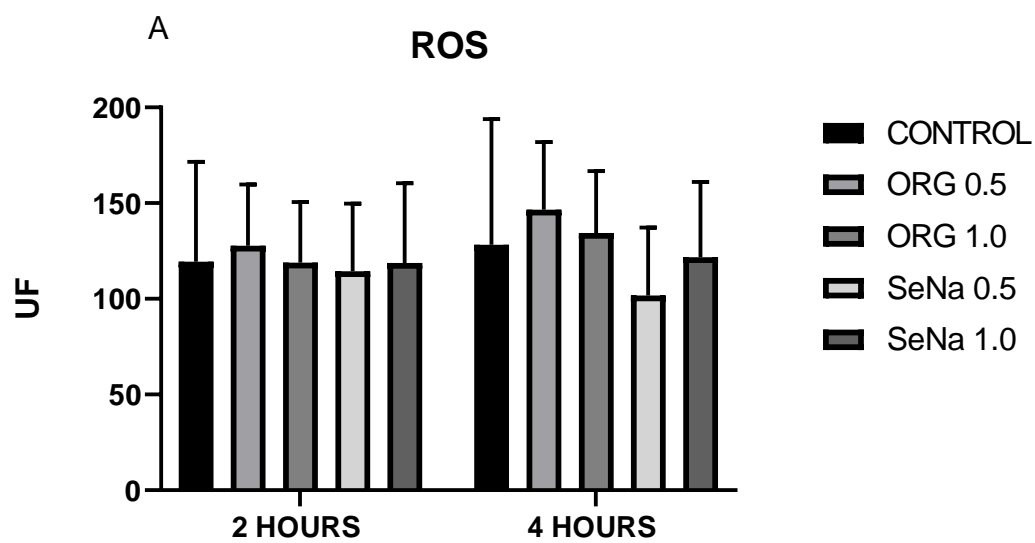


Figure 4. Effect of organic (ORG) and inorganic selenium (SeNa) supplementation (0.5 and 1 μ M) added to Tris-egg-yolk extender, using two cooling curves (2 and 4 h) post-thaw ram sperm viability. A: cells with intact acrosome; B: cells with intact membrane and C: mitochondria with potential. For the technique, different probes were used, in order to stain the sperm cells, and later, two hundred cells were counted and a percentage of the total was performed. Data are expressed as % (Mean \pm SEM).

3.4 Oxidative stress

The effects of the organic and inorganic selenium supplementation added to the basic cryoextender on ram semen were evaluated in relation to oxidative status. No significant differences were observed in relation the treatments as well as in relation to the two cooling times (2 and 4 h) on evaluated parameters: ROS levels (Fig. 5A) [F (4.30) = 0.1815], total antioxidant capacity (FRAP assay) (Fig. 5B) [F (4. 29) = 1.486 P=0.2321], lipid peroxidation (Fig. 5C) [F (4. 30) = 1.549 P=0.2135], and GPx activity (Fig. 5D) [F (4. 30) = 0.5736 P=0.6839].



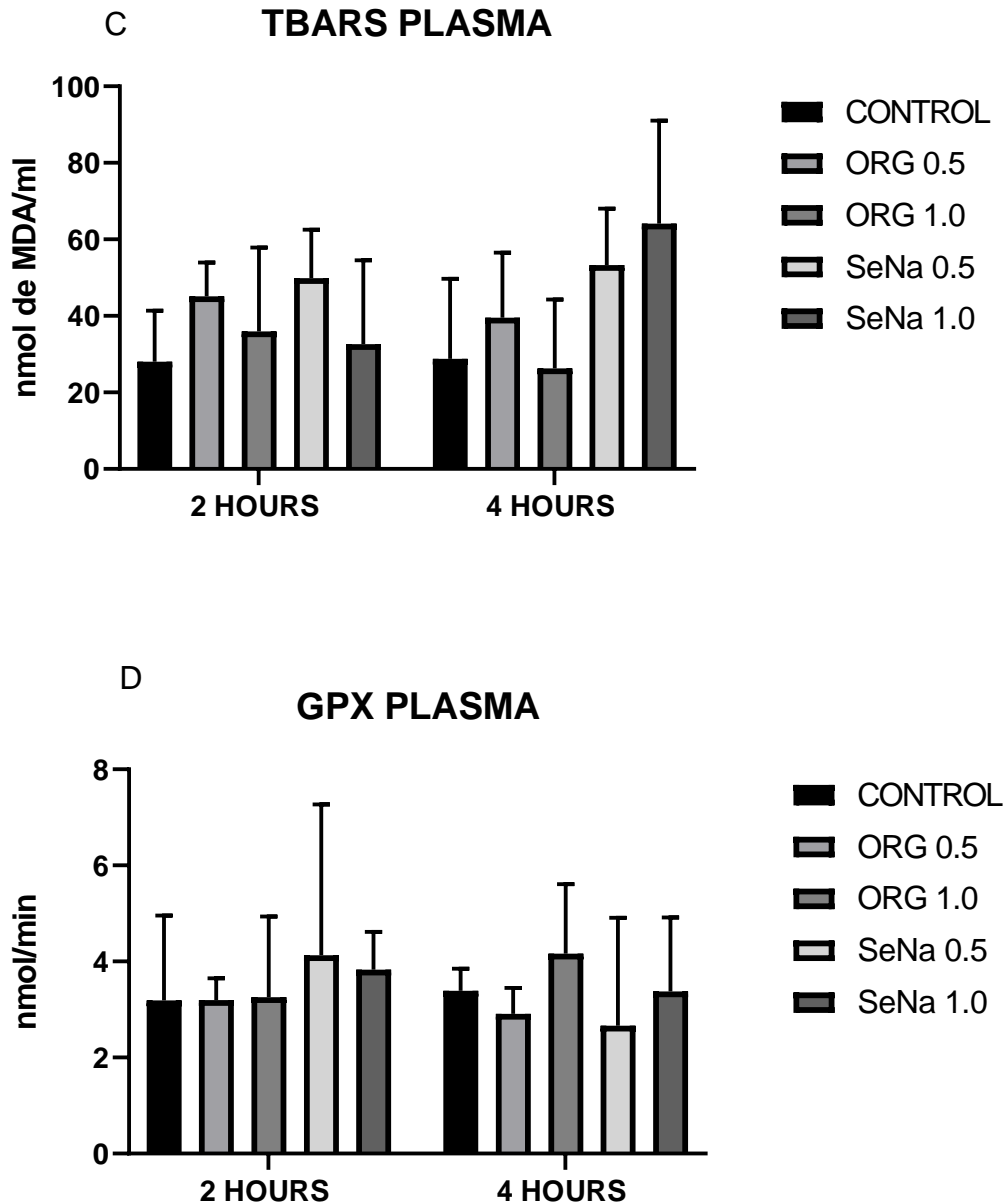


Figure 5. Effects of the organic (ORG) and inorganic (SeNa) selenium supplementation added to Tris-egg-yolk extender on ram semen were evaluated in relation to oxidative stress. A: ROS levels. Data are expressed as Fluorescence Units (UF); B: Total antioxidant capacity (FRAP assay). Data are expressed as μg ascorbic acid equivalents; C: Lipid peroxidation (TBARS levels). Data are expressed as nmol MDA/mL; D: GPx activity. Data expressed as nmol/min.

4 DISCUSSION

Semen cryopreservation is an up-and-coming reproductive biotechnology that aims to improve the efficiency, male reproducibility of farm animals (Benson et al., 2012). Many advances have taken place in this field of biotechnology, but the biological and biochemical mechanisms involved in semen cryopreservation still need to be better elucidated.

During the freezing process, the sudden change in temperature, as well as the formation of ice crystals, changes in membrane permeability and flux, and oxidative stress and osmotic stress itself are pointed out as the reasons for poor quality of post-thawing semen (Bucak et al., 2009 and Holt, 2000). It is also known that lipid oxidation is an important factor, which ends up being limiting and affects frozen and thawed sperm (Sapanidou et al., 2016; Sariozkan et al., 2014; Jafaroghli et al., 2014). In this way, it is important to emphasize the importance of knowing the composition of extenders and cryoprotectors to be used properly, considering that these compounds are important for the success of cryopreservation (Lemma, 2011; Tuncer et al., 2010 and Purdy, 2006).

A key point for semen freezing is the so-called pre-equilibrium period, that is, the cooling time before the semen is stored in liquid nitrogen. Studies show that this step, regardless of the supplementation to be used, is essential. It is during this time that the sperm cells remain in contact with the cryoprotectors that end up permeating the sperm, thus resulting in a balance between intracellular and extracellular concentrations (Salamon & Maxwell, 1995).

In the present study, we evaluated two cooling times using ram semen (2 and 4 hours). The data showed that there was no difference in the evaluated sperm parameters, considering sperm kinetic, morphology, membrane integrity, mitochondrial potential and oxidative stress markers. A recent study suggested that semen balance for 22 h compared to 3 h significantly improved the post-thaw qualities of cryopreserved ram sperm. The authors attributed such beneficial effect of the prolonged equilibrium time in the study to be due to longer interaction time between glycerol and cellular components, a reduction in ice crystal formation, and a decline in ice crystal-mediated

damage to sperm cells (Paul et al., 2020). The same was observed in a study carried out with buffalo semen, where the equilibrium time of 4 hours showed to be more effective than the time of 2 hours, improving the progressive motility of sperm (Shah et al., 2016). Studies performed with deer semen showed positive results, where the equilibrium times of 2 and 8 hours showed positive results on total motility in relation to time 0 (Ahmad et al., 2015). However, a study carried out with ram semen did not show similar results. Semen kept at 5°C for 0, 24 and 48 hours before freezing showed no difference in the parameters of total motility, acrosome integrity and plasma membrane (Purdy, 2006).

Considering that the oxidative stress is involved in sperm damage caused by freeze-thaw of semen, an alternative in the improvement of these cells after thawing could be the addition of antioxidants in base freeze extenders. Knowing which antioxidant to use is of fundamental importance to know the ideal concentration of the compound to be used to obtain an improvement in the semen quality. In recent years, many studies have purchased the protective capacity of several antioxidants, which can act against the deleterious effects caused by cryopreservation (Tuncer et al., 2010; Bucak et al., 2009 and Chatterjee et al., 2001).

In our study, we used two forms of selenium as extender supplementation on cryopreserved ram semen, an organic form (selenofuranoside (ORG)), and an inorganic form (sodium selenite (SeNa)). Both were used at two different concentrations, 0.5 and 1.0 µg/mL. Two pre-freezing equilibration times were also evaluated, 2 and 4 hours at 5°C. Our results revealed that the addition of selenofuranoside at a concentration of 0.5 µg/mL cooled for 4 hours and 0.5 µg/mL sodium selenite cooled for 2 hours significantly stimulated and improved the motility of sperm cells after thawing. Motility is generally considered to be one of the most significant features related with the fertilizing ability of sperm and is a countenance of viability and structural integrity. In fact, sperm motility is directly related to reproductive success and efficiency. Furthermore, the motility of

sperm cells exposed to the freezing and thawing process is considered an indicator that the cryopreservation was well performed (Del Olmo et al., 2013).

In our study, we did not find any significant difference in the other evaluated parameters, such as morphology, oxidative stress markers, membrane integrity and mitochondrial potential as well as in the other kinetic parameters. Previous investigations with the resveratrol supplement have demonstrated its effectiveness in improving some parameters of cryopreserved goat semen. An improvement in membrane integrity, total motility and acrosome integrity was observed (Lv et al., 2019). Another study proved the advantages of supplementing the extender with different antioxidants, methionine, cysteamine and cysteine for the preservation of ram semen. These showed the ability to improve motility, reduce MDA levels, DNA damage compared to the control group, but without significant difference among the antioxidants (Toker et al., 2016).

Selenium is a component of the GPx enzyme that protects cell membranes and lipids containing peroxidative damage organelles. Zhang et al. reported that, in cell culture, selenium in the form of sodium selenite helps cells detoxify the environment to protect them from oxidative damage. In another study performed with frozen buffalo semen, the addition of selenite to the semen extender increased the total antioxidant capacity. In this same study, the post-thaw DNA damage were reduced in the groups treated with sodium selenite compared to the control group. A study performed with frozen and thawed buffalo semen, supplemented with sodium selenite, showed an improvement in the total motility of sperm cells after freezing, suggesting that Se promotes the motility of sperm that would be immobile, but still viable (Dorostkar et al., 2012). In another work the researchers evaluated the impact of selenium nanoparticles on post-thawing quality of bull semen. These observed after freezing an improvement in total motility, and membrane integrity (Khalil et al., 2019).

5 CONCLUSION

In conclusion, our study indicates that supplementation with sodium selenite and selenofuranoside, at low concentrations, could help to improved the total motility of cryopreserved ram sperm. We did not observe a significant improve on ram semen quality in relation to two cooling times studied. Although we have not observed a significant improve in other evaluated parameters, we highlight that the total motility is an important sperm quality assessment, which could improve fertility. In fact, we believe that studies like this one that seek to improve the quality of the cryopreserved ram semen can bring important benefits to increase sheep production. Furthermore, more studies are necessary to investigate the cooling time as well as the selenium role to improve the quality of the cryopreserved ram sperm.

6 REFERENCES

- ABDI-BENEMAR, H. *et al.* Effects of astaxanthin supplementation on the freezability, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, [*s. l.*], v. 192, n. August, p. 106213, 2020.
- AHMAD, Mushtaq; NASRULLAH, Rashad; AHMAD, Nasim. Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. **Cryobiology**, [*s. l.*], v. 70, n. 3, p. 233–238, 2015.
- AL-MUTARY, Mohsen G. *et al.* Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5 °C for up to 168 h. **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 152, p. 139–146, 2020.
- BARTH, A. D., & OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. [*S. l.: s. n.*], 1989.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, jul. 1996.
- DE ANDRADE, Afc *et al.* Fluorescent Stain Method for the Simultaneous Determination of

Mitochondrial Potential and Integrity of Plasma and Acrosomal Membranes in Boar Sperm. [*s. l.*],

DEL OLMO, E. *et al.* Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, [*s. l.*], v. 138, n. 1–2, p. 102–109, 2013. Disponível em:

DOROSTKAR, Kamran; ALAVI-SHOUSHTARI, Sayed Mortaza; MOKARIZADEH, Aram. Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, [*s. l.*], v. 3, n. 4, p. 263–268, 2012.

EZAZI, Hossein *et al.* The influence of dietary sunflower oil, rich in n-6 polyunsaturated fatty acids, in combination with vitamin C on ram semen parameters, sperm lipids and fertility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*s. l.*], v. 99, n. 8, p. 3803–3810, 2019.

FALCHI, L. *et al.* Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. **Livestock Science**, [*s. l.*], v. 207, n. November 2017, p. 1–6, 2018.

GRÖTTER, Laura Guadalupe *et al.* Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, [*s. l.*], v. 54, n. 4, p. 655–665, 2019.

HEZAVEHEI, Maryam *et al.* Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive BioMedicine Online**, [*s. l.*], v. 37, n. 3, p. 327–339, 2018.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, [*s. l.*], v. 62, n. 1–3, p. 3–22, 2000.

IRIS F. F. BENZIE*, 1 and J. J. Strain†. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical biochemistry**, [*s. l.*], 1996.

KHALIL, Wael A. *et al.* Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. **Theriogenology**, [*s. l.*], v. 126, p. 121–127, 2019.

- LIU, Gang *et al.* Effect of bioactive peptide on ram semen cryopreservation. **Cryobiology**, [s. l.], v. 97, n. August, p. 153–158, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.007>
- LV, Chunrong *et al.* Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 208, n. January, p. 106127, 2019.
- LOETCHUTINAT, C. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 323–331, fev. 2005
- MASOUDI, Reza; ASADZADEH, Nader; SHAHNEH, Ahmad Zare. Supplementation of soybean lecithin-based cryopreservation medium with glutathione: Fertility and flow cytometry study of ram frozen-thawed semen. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 190, n. January, p. 106169, 2020.
- MAXWELL, W. M.C.; SALOMON, S. Liquid storage of ram semen: A review. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 613–638, 1993.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–8, jun. 1979.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967 Jul;70(1):158-69. PMID: 6066618.
- PAUL, Rajani Kr *et al.* Pre-freezing equilibration for 22 h improves post-thaw sperm functions in cryopreserved ram semen by reducing cholesterol efflux. **Cryobiology**, [s. l.], v. 96, n. July, p. 76–84, 2020.
- PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 °C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 93, n. 1–2, p. 114–123, 2006.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 37, n. 3–4, p. 185–249, 1995.

SHAH, S. A.H.; ANDRABI, S. M.H.; QURESHI, I. Z. Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Andrology**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 972–976, 2016.

SOUZA, Clara Vieira de *et al.* Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. **Cryobiology**, [s. l.], v. 89, p. 104–108, 2019.

TOKER, M. Berk *et al.* Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. **Cryobiology**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 205–209, 2016.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso trabalho demonstrou que a suplementação com selenito de sódio e selenofuranosídeo, em baixas concentrações, pode ajudar a melhorar a motilidade total de espermatozoides ovinos criopreservados. Nenhuma melhora significativa na qualidade do sêmen ovino em relação aos dois tempos de resfriamento estudados foi observada. Acreditamos que estudos como este que buscam melhorar a qualidade do sêmen de carneiro criopreservado podem trazer benefícios importantes para o aumento da produção ovina. É necessário o desenvolvimento de mais estudos, a fim de investigar o tempo de resfriamento e melhor elucidar o papel do selênio para melhorar a qualidade do sêmen ovino criopreservado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAFEZ, Faten *et al.* Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. [s. l.], Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn061>

AHSAN, U. *et al.* **Role of selenium in male reproduction-A review.** [S. l.]: Elsevier, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>

AHSAN, U *et al.* Role of selenium in male reproduction — A review. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 146, n. 1–2, p. 55–62, 2014b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.009>

AL-MUTARY, Mohsen G. *et al.* Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5 °C for up to 168 h. **Theriogenology**, [s. l.], v. 152, p. 139–146, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.001>

ALLAI, Larbi *et al.* Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. [s. l.], n. November 2017, 2018.

ALVAREZ, Juan G; STOREY', Bayard T. **Taurine, Hypotaurine, Epinephrine and Albumin Inhibit Lipid Peroxidation in Rabbit Spermatozoa and Protect Against Loss of Motility.** [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/29/3/548/2766267>.

BAUMBER, Julie *et al.* **The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility,**

Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation *Journal of Andrology*. [S. l.: s. n.], [s. d.].

BOLLWEIN, H; FUCHS, I; KOESS, C. Interrelationship Between Plasma Membrane Integrity, Mitochondrial Membrane Potential and DNA Fragmentation in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. [s. l.], Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x>

BONFIM, Dihego S; MELO, Solange De Araújo. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia ISSN : 1982-1263 Influência do ambiente na criação de codornas de corte : Revisão. [s. l.], p. 174–181, 2015.

CHAUYCHU-NOO, Napapach *et al.* Effect of organic selenium dietary supplementation on quality and fertility of cryopreserved chicken sperm. **Cryobiology**, [s. l.], v. 98, p. 57–62, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.12.008>

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G. S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 130, n. 3–4, p. 187–192, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014>

CUETO M, GARCÍA VINENT J, GIBBONS A, WOLFF M, Arrigo J. Manual para a coleta, processamento e conservação de sêmen ovino. Argentina: Grupo de Reprodução - INTA Bariloche; [s. l.], 1993.

DAI, Gui Chao *et al.* Effect of addition of melatonin on liquid storage of ram semen at 4°C. **Andrologia**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/and.13236>

DOROSTKAR, Kamran; ALAVI-SHOUSHTARI, Sayed Mortaza; MOKARIZADEH, Aram. Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 263–268, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653769><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4313046>

FALCHI, L. *et al.* Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. **Livestock Science**, [s. l.], v. 207, n. November 2017, p. 1–6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.001>

FONSECA, Jeferson Ferreira da *et al.* **Bioteecnologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Gado de Leite Embrapa Caprinos e Ovinos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. [S. l.: s. n.], 2014. *E-book*.

HALLIWELL, Barry. **Free radicals and antioxidants - Quo vadis?**. [S. l.]: Elsevier Current Trends, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>

HALLIWELL, Barry. **The antioxidant paradox**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02075-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02075-4)

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of**

Pharmacology, [s. l.], v. 142, p. 231–255, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

JUAN, Por *et al.* Embrapa Caprinos e Ovinos Levantamento dos custos de produção de ovinos e caprinos no âmbito do Projeto Campo Futuro. [s. l.], 2016.

KHALIL-KHALILI, Ali Asghar *et al.* The effect of dietary organic selenium on reproductive performance of broiler breeder roosters under dexamethasone induced stress. **Theriogenology**, [s. l.], v. 161, p. 16–25, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.11.016>

KHALIL, Wael A. *et al.* Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. **Theriogenology**, [s. l.], v. 126, p. 121–127, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.017>

KUMAR, Davendra; NAQVI, Syed Mohammed Khursheed. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. **Journal of Animal Science and Technology**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 4–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2055-0391-56-8>

LEBOEUF, B; RESTALL, B; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 62, n. 1–3, p. 113–141, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00156-1)

LOEF, Martin *et al.* Selenium and Alzheimer ' s Disease : A Systematic Review. [s. l.], v. 26, p. 81–104, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110414>

ŁUKASZEWICZ, Ewa; JERYSZ, Anna; KOWALCZYK, Artur. Effect of semen extenders on viability of ISA Brown and Hubbard Flex roosters' sperm stored for 24 h. **Poultry Science**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 2766–2774, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2019.12.055>

LUSHCHAK, Volodymyr I. **Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification**. [S. l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

MAGALHÃES, Klinger Aragão *et al.* Caprinos e ovinos no Brasil : análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. [s. l.], n. Tabela 1, p. 6, 2020.

MARAI, I. F.M. *et al.* Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt (Short Communication). **Archives Animal Breeding**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 402–409, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5194/aab-52-402-2009>

NAIEM, Mohamad *et al.* Cryobiology Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**, [s. l.], v. 74, p. 25–30, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.008>

PEKER AKALIN, Pinar *et al.* Influence of lycopene and cysteamine on sperm and oxidative stress parameters during liquid storage of ram semen at 5 °C. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 137, p. 117–123, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2016.03.017>

RAYMAN, Margaret P. **Selenium and human health**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 62, n. 1–3, p. 77–111, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)

SHI, Lei *et al.* Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5 °C. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 189, p. 106139, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2020.106139>

SILVA, E. C.B. *et al.* Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, [s. l.], v. 77, n. 8, p. 1722–1726, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.11.023>

SOUZA, Clara Vieira de *et al.* Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. **Cryobiology**, [s. l.], v. 89, p. 104–108, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.05.009>

TINGGI, Ujang. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: A review. *In:* , 2003. **Toxicology Letters**. [S. l.]: Elsevier, 2003. p. 103–110. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00384-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00384-3)

TRAN, Len Van *et al.* Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction-A Review. **Asian-Australas J Anim Sci**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 622–637, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>

TRIERVEILER PEREIRA, Máriam. Revista em agronegocio e meio ambiente: Editorial. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 7, 2015.

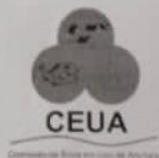
VIANA, João Garibaldi Almeida. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 1–9, 2008.

WAQUIL, Paulo Dabdab; SPOHR, Gabriela. Evolução Histórica Da Ovinocultura No Rio Grande Do Sul: Comportamento Do Rebanho Ovino E Produção De Lã De 1980 a 2007. **Extensão Rural**, [s. l.], v. 0, n. 20, p. 5–26, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/231817965548>

ZAREI, F. *et al.* Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. **Cryobiology**, [s. l.], v. 98, n. November 2020, p. 215–218, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.018>



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 017/2019

Titulo: Efeito da utilização de selênio em diluente para a criopreservação de sêmen ovino

Data da aprovação: 12/07/2019

Período de vigência do projeto: 28/07/2021

Pesquisadores(a): Francielli Weber Santos Cibin

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (55) 99968-8269

E-mail: franciellcibin@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ovinos/SRD
Nº de animais	4
Peso/Idade	65 kg / >1,5 ano
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Santa Ângela - Uruguaiiana, RS

Prof.ª Dr.ª Vanusa Manfredini
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA