

# Injectable diphenyl diselenide supplementation in dairy sheep

## Suplemento de difenil diselenuro inyectable en ovejas lecheras

Angeliza H Biazus<sup>1</sup> M.Sc, Chrystian J Cazarotto<sup>1</sup> M.Sc, Roger R Gebert<sup>1</sup> M.Sc,  
João H. dos Reis<sup>1</sup> M.Sc, Talyta Zortea<sup>1</sup> M.Sc, Dilmar Baretta<sup>1</sup> Ph.D,  
Gustavo Machado<sup>2</sup> Ph.D, Jhonatan P. Boito,<sup>1</sup> M.Sc, Matheus D. Baldissera,<sup>3</sup> Ph.D,  
Aleksandro S da Silva<sup>1\*</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Santa Catarina (SC), Brazil. <sup>2</sup>North Carolina State University, Department of Population Health and Pathobiology College of Veterinary Medicine, 1060 William Moore Drive, Raleigh NC 27607. <sup>3</sup>UFMS, Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, RS, Brazil. Correspondence: [aleksandro\\_ss@yahoo.com.br](mailto:aleksandro_ss@yahoo.com.br)

Received: January 2017; Accepted: November 2017.

### ABSTRACT

**Objective.** The aim of this study was to evaluate the influence of subcutaneous supplementation with diphenyl diselenide ((PhSe)<sub>2</sub>) in dairy sheep infected with gastrointestinal nematodes on animal health and possible damage to environment when the feces of these animals will be used for fertilizing. **Materials and methods.** The experiment was performed using 16 primipara dairy sheep, that were divided into two groups: the group A as control and the group B supplemented with 3 µmol/kg of (PhSe)<sub>2</sub> subcutaneously. Blood samples were used to determine the hepatic function, as well as the protein and lipid metabolism in animals. Feces were used to determine the number of helminths eggs per gram of feces (EPG), as well as used for ecotoxicology tests. **Results.** The (PhSe)<sub>2</sub> supplementation not affected the helminths reproduction, since the EPG did not differ (p>0.05) between groups. Total protein and globulin levels increase (p<0.05) in supplemented animals, while the seric alanine aminotransferase (ALT) levels decrease (p<0.05) in the end of experimental design. Cholesterol levels increase (p<0.05) in the supplemented animals, while triglycerides, albumin and urea not differ between groups (p>0.05). The feces of supplemented sheep not interfered the springtails reproduction. **Conclusions.** At the administered dose, the (PhSe)<sub>2</sub> is not able to control the parasitism, however, it did increase the globulins and cholesterol levels, that are important to immune response and for sheep reproduction, respectively. Also, the feces of supplemented animals with (PhSe)<sub>2</sub> can be used as organic fertilizing, without negative impacts to environment.

**Keywords:** (PhSe)<sub>2</sub>, sheep, helminths, springtails (*Source: CAB, MeSH*).

### RESUMEN

**Objetivo.** El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la suplementación subcutánea con diselenuro de difenilo (PhSe)<sub>2</sub> en ovejas lecheras infectadas con nematodos sobre la salud animal y posible daño al ambiente cuando las heces de estos animales se utilicen para fertilizar. **Materiales y métodos.** El experimento se realizó utilizando 16 ovejas lecheras, que se dividieron en dos grupos: el grupo A se usó como control y el grupo B se suplementó con 3 µmol/kg of (PhSe)<sub>2</sub> vía subcutánea.

Se utilizaron muestras de sangre para determinar la función hepática, así como el metabolismo de proteínas y lípidos en animales. Las heces se utilizaron para determinar el número de huevos por gramo de heces (EPG), así como para las pruebas de ecotoxicología. **Resultados.** La suplementación (PhSe)<sub>2</sub> no afectó la reproducción de helmintos. Los niveles totales de proteína y globulina aumentan ( $p < 0.05$ ) en los animales suplementados, mientras que los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) disminuyen ( $p < 0.05$ ) al final del diseño experimental. Los niveles de colesterol aumentan ( $p < 0.05$ ) en los animales suplementados, mientras que los triglicéridos, la albúmina y la urea no difieren entre los grupos ( $p > 0.05$ ). Las heces de ovejas suplementadas no interferían en la reproducción de las colas de caballo. **Conclusiones.** A la dosis administrada, el (PhSe)<sub>2</sub> no es capaz de controlar el parasitismo; sin embargo, aumenta los niveles de globulinas y colesterol, que son importantes para la respuesta inmune y para la reproducción, respectivamente. Las heces de animales suplementados pueden usarse como fertilizantes orgánicos, sin impactos negativos en el ambiente.

**Palabras clave:** (PhSe)<sub>2</sub>, ovejas, helmintos, colas de primavera. (Fuente: CAB, MeSH).

## INTRODUCTION

In dairy sheep industry, females in the postpartum period are susceptible to metabolic disorders in consequence to major nutritional requirements, being that this period is particularly important to animal health and consequent female performance due physiologic changes and metabolic stress (1). In attempt to improve the performance and recuperation, the animal supplementation is an interesting approach. The vitamins and mineral, such as selenium, an micromineral with antioxidant properties (2,3), that is able to protect the cell membranes against oxidative degeneration (4), as well as your participation in the composition of glutathione enzymes, a potent antioxidant enzyme (5). Therefore, the selenium is also considered an important stimulant for immunology system, influencing the expression of non-specific, humoral and cellular response (2-5).

Many studies have demonstrated that sodium selenite supplementation possesses beneficial effects for sheep (6-8), however, is important the search for alternative sources of selenium. In this sense, the diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, an organic compound derived from selenium with anti-inflammatory, neuroprotective and antioxidant properties (9), may be considered an important source for sheep health improvement. Experimental studies demonstrating the beneficial effects of (PhSe)<sub>2</sub> in rats and fish as experimental model, but was not been evaluated in sheep. Based on the effects of (PhSe)<sub>2</sub> in the animal metabolism, is possible suggest that the supplementation with (PhSe)<sub>2</sub> may exerts beneficial properties, such as decrease of oxidant compounds associated with increase of antioxidant compounds in the blood, as well as the improve of immune system, and consequently control de parasitism, such as observed in infected lambs with *Haemonchus contortus*

## INTRODUCCIÓN

En la industria ovina lechera, las hembras en el período de posparto son susceptibles a trastornos metabólicos como consecuencia de importantes necesidades nutricionales, siendo que este período es particularmente importante para la salud animal y el consiguiente rendimiento femenino debido a cambios fisiológicos y estrés metabólico (1). En un intento de mejorar el rendimiento y la recuperación, la suplementación animal es un enfoque interesante. Las vitaminas y minerales, como el selenio, un micro mineral con propiedades antioxidantes (2,3), que es capaz de proteger las membranas celulares contra la degeneración oxidativa (4), así como su participación en la composición de las enzimas de glutatión, una potente enzima antioxidante (5). Por lo tanto, el selenio también se considera un estimulante importante para el sistema inmunológico, influyendo en la expresión de la respuesta inespecífica, humoral y celular (2-5).

Muchos estudios han demostrado que la suplementación de selenio sódico posee efectos beneficiosos para las ovejas (6-8), sin embargo, es importante buscar fuentes alternativas de selenio. En este sentido, el difenil diseleniuro (PhSe)<sub>2</sub>, un compuesto orgánico derivado del selenio con propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras y antioxidantes (9), puede considerarse una fuente importante de mejora de la salud del ganado ovino. Hay estudios experimentales que demostraron los efectos beneficiosos de (PhSe)<sub>2</sub> en ratas y peces como modelo experimental, pero no se evaluaron en ovejas. Basándose en los efectos del (PhSe)<sub>2</sub> en el metabolismo animal, es posible sugerir que la suplementación con (PhSe)<sub>2</sub> puede ejercer propiedades beneficiosas, como la disminución de compuestos oxidantes asociados con el aumento de compuestos antioxidantes en la sangre, así como la mejora del sistema

supplemented with sodium selenite (10). Similarly, the injectable administration of sodium selenite and  $(\text{PhSe})_2$  in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii* (11) was able to stimulate the inflammatory response, and consequently increase animal longevity.

The feces of production animals are commonly used as fertilizing in pastures (12). Based in this information, arise the interest whether feces of supplemented animals with  $(\text{PhSe})_2$  can be used as fertilizing without consequences for the environment, since several studies demonstrated the negative impact of feces of animals with residues of additives and veterinary drugs for soil microflora (13,14). It is important emphasize that studies demonstrating the use of  $(\text{PhSe})_2$  in the livestock are recent, being necessary progress in this lines of research. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether subcutaneously  $(\text{PhSe})_2$  supplementation can control the sheep parasitic infection during the lactation period, as well as be exerts beneficial properties for animal health. Moreover, a second objective was verifying whether feces of supplemented sheep with  $(\text{PhSe})_2$  can be used as organic fertilizing without negative impacts for soil biomass/diversity.

## MATERIALS AND METHODS

**Local and animals.** The experiment was performed in a rural property involved in sheep farming, localized in Chapecó (west of Santa Catarina, southern of Brazil - Latitude: 27° 05'47''S; Longitude: 52° 37'06''W). For this study, sixteen primipara newly calved sheep to Lacaune race, with similar age, weight and milk production were used as experimental model. The animals were divided in two groups (A and B), with eight animals each. The group A was used as control (non-supplemented), that received via subcutaneously dimethyl sulfoxide (DMSO) at dose of 1.5 mL (used to dilute the  $(\text{PhSe})_2$ ). The group B was composed by supplemented sheep with  $(\text{PhSe})_2$  subcutaneously at 1.5 mL, corresponding at dose of 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  that was applied on days 0, 7, 15, 30 and 45 of experiment.

The dose was determined in a pilot study using 0.5, 1.0, 3.0, and 30.0  $\mu\text{mol}/\text{Kg}$  of mineral in four healthy lambs, since  $(\text{PhSe})_2$  was never used in sheep. Antioxidant enzyme GPx and liver injury enzymes (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) were evaluated in serum samples and demonstrated that the two lowest doses did not alter the values of the enzymes. The highest dose, however, intoxicated

inmunológico y, en consecuencia, el control del parasitismo, tal como se observa en corderos infectados con *Haemonchus contortus* complementado con selenito sódico (10). Del mismo modo, la administración inyectable de selenito sódico y  $(\text{PhSe})_2$  en ratones infectados experimentalmente con *Toxoplasma gondii* (11) fue capaz de estimular la respuesta inflamatoria y, en consecuencia, aumentar la longevidad de los animales.

Las heces de los animales de producción se utilizan comúnmente como fertilizante en los pastos (12). Con base en esta información, surge el interés de si las heces de animales suplementados con  $(\text{PhSe})_2$  pueden ser utilizadas como fertilizantes sin consecuencias para el medio ambiente, ya que varios estudios demostraron el impacto negativo de las heces de animales con residuos de aditivos y medicamentos veterinarios para la microflora del suelo (13,14). Es importante destacar que los estudios que demuestran el uso de  $(\text{PhSe})_2$  en el ganado son recientes, siendo necesario avanzar en estas líneas de investigación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si la suplementación subcutánea de  $(\text{PhSe})_2$  puede controlar la infección parasitaria del ovino durante el periodo de lactancia, así como ejercer propiedades beneficiosas para la salud animal. Además, un segundo objetivo era verificar si las heces de ovejas suplementadas con  $(\text{PhSe})_2$  pueden ser usadas como fertilizantes orgánicos sin impactos negativos para la biomasa/diversidad del suelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación y animales.** El experimento se realizó en una propiedad rural dedicada a la ganadería ovina, localizada en Chapecó (oeste de Santa Catarina, sur de Brasil - Latitud: 27°05'47''S; Longitud: 52°37'06''O). Para este estudio se utilizaron como modelo experimental dieciséis ovejas primíparas recién paridas de raza Lacaune, con edad, peso y producción de leche similares. Los animales se dividieron en dos grupos (A y B), con ocho animales cada uno. Se utilizó el grupo A como control (no suplementado), que se recibió a través de sulfóxido de dimetilo (DMSO) subcutáneo en dosis de 1.5 mL (utilizado para diluir el  $(\text{PhSe})_2$ ). El grupo B estaba compuesto por ovejas suplementadas con  $(\text{PhSe})_2$  por vía subcutánea a 1.5 mL, lo que corresponde a la dosis de 3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  que se aplicó en los días 0, 7, 15, 30 y 45 del experimento.

La dosis fue determinada en un estudio piloto usando 0.5, 1.0, 3.0, y 30.0  $\mu\text{mol}/\text{Kg}$  de mineral en cuatro corderos sanos, ya que  $(\text{PhSe})_2$  nunca había sido usado en ovejas. La enzima antioxidante

the lamb (the variables increased and the lamb died, and the histopathology showed lesions of hepatic necrosis). The dose of 3.0 µmol/Kg was considered ideal because it increased GPx activity 8.5 times, without causing hepatic injury (data not published).

The diet was provided to both groups in two periods (7:00 AM and 5:00 PM), and was constituted by corn silage, cynodont hay and concentrated (ground corn, soybean meal, vitamin and mineral core, calcitic limestone and nonensin). Water was provided *ad libitum*. All animals were contained in the same bay (24 m<sup>2</sup>), with beaten floor and bed with wood shavings.

**Sample collection.** At intervals of 15 days, the total blood was collected by jugular tail using vacuolized tubes without anticoagulant (days 0, 15, 30, 45, 60 and 75). The samples were centrifuged at 8000 rpm during 10 min to obtain serum that was stored at -20°C until biochemical analysis. The feces samples were collected at same experimental period of blood samples, i.e., on days: 0, 15, 30, 45, 60 and 75, to perform the parasitological exam described below. A sample of feces from each animal was collected on day 35, and the feces of each group was homogenized to assess the ecotoxicological tests.

**Biochemical analyses.** Seric levels of alanine aminotransferase (ALT), total protein, albumin, triglycerides, cholesterol and urea were performed using a semi-automatized analyzer (BioPlus-2000®) and commercial kits (Analisa®). Globulin values were obtained between total protein and albumin levels.

**Coproparasitological analyses.** The feces samples were used for gastrointestinal nematodes eggs search using the modified McMaster technique (15) using sucrose solution as flotation fluid for determination the quantity of eggs per gram of feces (EPG). The coproculture was performed to verify the helminths involved in the infection.

**Ecotoxicological test.** The feces homogenized of each group collected on day 35 were used in the ecotoxicological test to evaluate the springtails reproduction (*Folsomia candida*). The test was conducted based in the protocol ISO 11267 and as concluded after 28 days (16), with experimental design totally randomized and with 4 replicas. Each replica consisted of plastic container (capacity for 140 mL), filled with 30 grams of soil containing 0, 2, 4, 8 and 16 tons of feces/hectare. In each container were added 10 springtails (*F. candida*) with age synchronized of 10-12 days (after hatching). On day 14, the

GPx y las enzimas para lesiones hepáticas (alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa) se evaluaron en muestras de suero y demostraron que las dos dosis más bajas no alteraban los valores de las enzimas. La dosis más alta, sin embargo, intoxicó al cordero (las variables aumentaron y el cordero murió, y la histopatología mostró lesiones de necrosis hepática). La dosis de 3.0 µmol/Kg se consideró ideal porque aumentó la actividad de GPx 8.5 veces, sin causar lesiones hepáticas (datos no publicados).

La dieta se proporcionó a ambos grupos en dos períodos (7:00 a.m. y 5:00 p.m.), y estuvo constituida por ensilado de maíz, heno cynodont y concentrados (maíz molido, harina de soya, vitaminas y minerales, caliza calcita y nonensina). El agua se proporcionaba *ad libitum*. Todos los animales estaban encerrados en la misma nave (24 m<sup>2</sup>), con suelo batido y cama con viruta de madera.

**Recolección de muestras.** En intervalos de 15 días, la sangre total fue extraída por medio de la cola yugular utilizando tubos vacuolizados sin anticoagulante (días 0, 15, 30, 45, 60 y 75). Las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos para obtener suero que fue almacenado a -20°C hasta el análisis bioquímico. Las muestras de heces se recogieron en el mismo período experimental de muestras de sangre, es decir, en días: 0, 15, 30, 45, 60 y 75, para realizar el examen parasitológico que se describe a continuación. Una muestra de heces de cada animal fue recolectada el día 35, y las heces de cada grupo fueron homogeneizadas para evaluar las pruebas ecotoxicológicas.

**Análisis bioquímicos.** Los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT), proteína total, albúmina, triglicéridos, colesterol y urea se realizaron utilizando un analizador semiautomatizado (BioPlus-2000®) y kits comerciales (Analisa®). Se obtuvieron valores de globulina entre los niveles de proteína total y albúmina.

**Análisis coproparasitológicos.** Las muestras de heces se utilizaron para la búsqueda de huevos de nematodos gastrointestinales mediante la técnica McMaster modificada (15) utilizando una solución de sacarosa como líquido de flotación para determinar la cantidad de huevos por gramo de heces (EPG). El coprocultivo se realizó para verificar los helmintos implicados en la infección.

**Ensayo ecotoxicológico.** Las heces homogeneizadas de cada grupo recogidas el día 35 fueron utilizadas en la prueba ecotoxicológica para evaluar la reproducción del colémbolo (*Folsomia candida*). La prueba se llevó a cabo en

springtails were feed with biological ferment (*Saccaromyces cerevisiae*), and were opened to aeration and water supply weekly. On day 28, the soil of each replica was transferred for another container with major volumetric capacity, that was added water and some drops of black ballpoint ink. After light agitation with glass cane, the numbers of live springtails were counted in the water superficies. Photographs of container were performed to posteriorly count of juveniles of springtails using the software ImageTool (ImageTool 3.0, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX).

**Statistical analyses.** The data from the dairy sheep of ALT, triglyceride, total protein, cholesterol, albumin, urea, globulin, OPG, were first analyzed by descriptive statistics for contingency of the information and for further assumptions and what is presented as descriptive is the mean and standard deviation. The data were tested for normality of variance by Kolmogorov-Smirnov test, skewness and homogeneity by *Levene's* test previously to ANOVA analysis. A one-way ANOVA for repeated measurements to test was used to evaluate the influence of time (an error term was added to accommodate de dependence of subjects {sheep that were resampled}, where necessary (statistic difference were found), test was used since it controls the family-wise Type I error rate, by adjusting the observed significance level to the number of multiple comparisons. Secondly, one-way ANOVA was used to analyze all significant parameters that had shown significant difference over time on the repeated measure analysis, mean comparison between groups on each time period were tested (day 0, day 15, day 30, day 45, day 60 and day 75). It was considered significantly different when  $p < 0.05$ . The whole statistical process was carried out with R-language, V.3.3.0 (17).

For the reproduction test with *F. candida*, the results were submitted to one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test ( $p < 0.05$ ), using the software Statistica V 7.0. (YEAR)

## RESULTS

The results regarding seric biochemical analysis were showed in Tables 1 and 2. Seric ALT reduced significantly on days 60 and 75 in supplemented dairy sheep with  $(\text{PhSe})_2$ , while cholesterol levels increased significantly on days 30, 60 e 75, as well as a tendency to increase was observed on day 45. Moreover, an increase of total protein and globulins levels in serum were observed in the supplemented dairy sheep on days 60 and

base al protocolo ISO 11267 y concluyó a los 28 días (16), con diseño experimental totalmente aleatorizado y con 4 réplicas. Cada réplica consistió en un contenedor de plástico (capacidad para 140 mL), lleno de 30 gramos de tierra que contenía 0, 2, 4, 8 y 16 toneladas de heces/hectárea. En cada recipiente se añadieron 10 colémbolos (*F. candida*) con una edad sincronizada de 10-12 días (después de la eclosión). El día 14, los colémbolos fueron alimentados con fermento biológico (*Saccaromyces cerevisiae*), y fueron abiertos a la aireación y suministro de agua semanalmente. El día 28, el suelo de cada réplica fue transferido a otro contenedor con mayor capacidad volumétrica, al que se le agregó agua y unas gotas de tinta negra de bolígrafo. Después de una ligera agitación con caña de vidrio, se contó el número de colémbolos vivos en la superficie del agua. Se realizaron fotografías de contenedores para el recuento posterior de colémbolos juveniles utilizando el software ImageTool (ImageTool 3.0, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX).

**Análisis estadístico.** Los datos de ALT, triglicéridos, proteína total, colesterol, albúmina, urea, globulina, OPG, de las ovejas lecheras fueron analizados primero por estadística descriptiva para la contingencia de la información y para otras suposiciones y lo que se define como descriptivo es la media y la desviación estándar. Los datos se probaron para determinar la normalidad de la varianza mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, asimetría y homogeneidad mediante la prueba de Levene previa al análisis ANOVA. Se utilizó un ANOVA unidireccional para mediciones repetidas a fin de evaluar la influencia del tiempo (se agregó un término de error para acomodar la dependencia de los sujetos (ovejas que fueron remuestreadas), cuando fue necesario (se encontraron diferencias estadísticas), ya que controla la tasa de error de tipo I por familia, ajustando el nivel de significancia observado al número de comparaciones múltiples. En segundo lugar, se utilizó ANOVA unidireccional para analizar todos los parámetros significativos que habían mostrado diferencias significativas a lo largo del tiempo en el análisis de medidas repetidas, se probó la comparación de medias entre grupos en cada período de tiempo (día 0, día 15, día 30, día 45, día 60 y día 75). Se consideró significativamente diferente cuando  $p < 0.05$ . Todo el proceso estadístico se llevó a cabo con R-language, V.3.3.0 (17).

Para la prueba de reproducción con *F. candida*, los resultados se sometieron a ANOVA unidireccional seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett ( $p < 0.05$ ), utilizando el software Statistica V 7.0. (YEAR)

**Table 1.** Mean and standard deviation of seric alanine aminotransferase (ALT) activity, seric levels of triglycerides and cholesterol in supplemented sheep with diphenyl diselenide (group B) at different days of experiment compared control group (group A).

Variable	Day	Mean ± standard deviation		P value
		Group A	Group B	
ALT (U/L)	0	17.50 (2.98)	17.12 (3.60)	0.13
	15	17.75 (4.59)	18.50 (6.05)	0.78
	30	16.75 (2.96)	15.12 (2.80)	0.27
	45	16.50 (5.13)	14.50 (4.38)	0.41
	60	18.25 (3.85)	13.12 (4.52)	0.05*
	75	17.50 (4.96)	12.50 (3.25)	0.03*
Triglyceride (mg/dL)	0	22.57 (6.73)	23.71 (8.56)	0.78
	15	18.50 (4.72)	17.00 (3.74)	0.49
	30	23.07 (16.05)	24.62 (8.09)	0.81
	45	16.75 (4.68)	18.75 (7.13)	0.51
	60	13.12 (5.57)	17.50 (6.63)	0.17
	75	40.62 (4.41)	40.50 (4.31)	0.95
Cholesterol (mg/dL)	0	51.38 (7.80)	49.75 (6.73)	0.66
	15	62.12 (12.54)	65.38 (10.42)	0.58
	30	59.25 (11.84)	71.38 (8.23)	0.05*
	45	66.38 (11.96)	74.88 (7.73)	0.056
	60	68.88 (11.46)	95.00 (15.93)	0.011*
	75	71.88 (9.66)	83.00 (9.85)	0.027*

\* Significant difference between groups

75 compared to control group. No difference was observed between groups regarding seric levels of triglycerides, albumin and urea.

No difference was observed between groups regarding the number of helminths eggs per gram of feces (EPG) during the experiment (Table 3). The coproculture revealed that eggs counted in the EPG corresponded to the *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp.

The number of young springtails did not differ between groups (Figure 1). Therefore, the feces of supplemented dairy cows with (PhSe)<sub>2</sub> via injectable not interfere in the springtails reproduction.

**Table 3.** Number of eggs per gram of feces (EPG) of supplemented dairy sheep with diphenyl diselenide (group B) in different days of experiment compared control group (group A).

Variable	Day	Mean ± standard deviation		P value
		Group A	Group B	
EPG	0	1512.50 (1318.48)	1237.50 (1101.87)	0.65
	15	1975.00 (1587.23)	1800.00 (1918.33)	0.84
	30	1425.00 (1525.73)	1612.50 (1776.38)	0.82
	45	1975.00 (2210.20)	2600.00 (2394.64)	0.59
	60	2412.50 (3711.16)	2112.50 (1679.66)	0.83
	75	425.00 (365.47)	500.00 (667.62)	0.78

Note: There was no significant difference between groups.

**Table 2.** Mean and standard deviation of seric levels of total protein, albumin, globulin and urea in supplemented sheep with diphenyl diselenide (group B) at different days of experiment compared control group (group A).

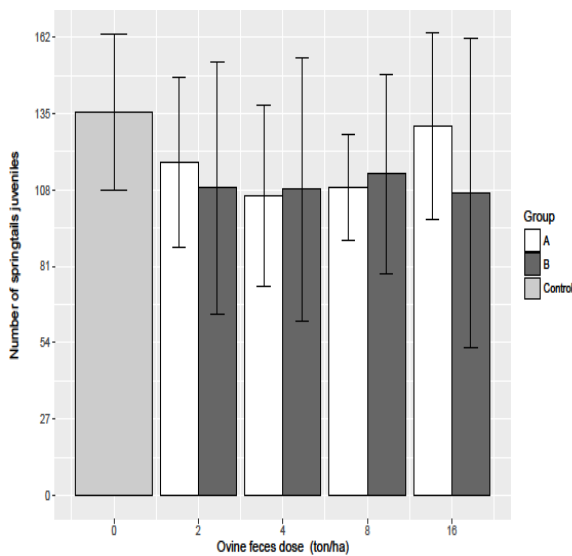
Variable	Day	Mean ± standard deviation		P value
		Group A	Group B	
Total protein (g/dL)	0	6.38 (0.79)	6.86 (0.87)	0.26
	15	5.95 (0.80)	6.36 (0.92)	0.35
	30	6.40 (0.55)	6.33 (1.27)	0.88
	45	5.59 (0.29)	5.69 (0.61)	0.67
	60	6.88 (0.91)	8.65 (0.55)	0.003*
	75	6.90 (1.06)	7.74 (0.95)	0.052
Albumin (g/dL)	0	3.08 (0.42)	3.04 (0.46)	0.86
	15	2.35 (0.75)	2.35 (0.93)	0.10
	30	2.60 (0.55)	2.89 (0.55)	0.31
	45	2.95 (0.24)	2.89 (0.59)	0.78
	60	2.76 (0.45)	3.26 (0.53)	0.06
	75	2.98 (0.53)	2.86 (0.2)	0.59
Globulin (g/dL)	0	3.30 (0.83)	3.83 (0.86)	0.23
	15	3.60 (0.90)	4.01 (1.43)	0.50
	30	3.80 (0.67)	3.44 (1.17)	0.45
	45	2.64 (0.29)	2.80 (0.45)	0.40
	60	4.11 (1.05)	5.39 (0.8)	0.01*
	75	4.01 (0.85)	4.88 (0.94)	0.08
Urea (mg/dL)	0	39.00 (8.04)	33.75 (6.71)	0.09
	15	33.12 (7.94)	33.12 (5.41)	0.10
	30	34.50 (10.14)	42.12 (9.28)	0.13
	45	40.88 (5.00)	43.50 (6.21)	0.36
	60	75.62 (11.17)	67.12 (19.48)	0.30
	75	45.38 (6.23)	46.38 (8.25)	0.78

\* Significant difference between groups

## RESULTADOS

Los resultados del análisis bioquímico sérico se muestran en las Tablas 1 y 2. La ALT sérica se redujo significativamente en los días 60 y 75 en ovejas lecheras suplementadas con (PhSe)<sub>2</sub>, mientras que los niveles de colesterol aumentaron significativamente en los días 30, 60 y 75, así como se observó una tendencia al aumento en el día 45. Además, se observó un aumento de los niveles de proteína total y globulinas en suero en las ovejas lecheras suplementadas en los días 60 y 75 en comparación con el grupo control. No se observaron diferencias entre los grupos con respecto a los niveles séricos de triglicéridos, albúmina y urea.

No se observaron diferencias entre los grupos con respecto al número de huevos de helmintos por gramo de heces (EPG) durante el experimento (Tabla 3). El coprocultivo reveló que los huevos



**Figure 1.** Number of juveniles forms of springtails submitted with organic fertilizing with ovine feces at doses of 2, 4, 8 and 16 ton per hectare ( $t\ ha^{-1}$ ). A pool of feces was used of each group. Note: No difference was observed between groups in the tested doses. Group A – Control; and Group B - supplemented dairy sheep with diphenyl diselenide.

## DISCUSSION

The antioxidant action of selenium is well established, since the mineral protects the cells against deleterious effects and aggressive agents (18,19). This action can be proven by result of seric ALT activity, that is considered an important biomarker of hepatic function. ALT activity reduced in the supplemented sheep with  $(PhSe)_2$ , that can be considered a protective effect of this selenium form in the liver of sheep during the lactation period. This enzyme is released in the blood after hepatic injury, which can occur during the lactation period of sheep, due the major metabolic requirement and oxidative stress (20). Besides the protective effect of selenium, is important emphasize that supplementation with five doses of  $(PhSe)_2$  was not toxic to animals.

Triglycerides, albumin and urea levels did not differ between groups, i.e., the  $(PhSe)_2$  no exerts effects in the metabolism or synthesis of these variables. The increase of cholesterol levels can be beneficial for animals, since a positive correlation between increase of cholesterol and progesterone in sheep reflects in a better reproductive performance (21). The augmentation on total protein levels is directly linked to increase of globulins levels in the supplemented animals with  $(PhSe)_2$  after 60 days of experiment. This result can be explained by selenium capacity to protects the structure and

counted in the EPG correspondían al *Haemonchus spp.* y *Trichostrongylus spp.*

El número de colémbolos jóvenes no difirió entre los grupos (Figura 1). Por lo tanto, las heces de las vacas lecheras suplementadas con  $(PhSe)_2$  vía inyectable no interfieren en la reproducción de los colémbolos.

## DISCUSIÓN

La acción antioxidante del selenio está bien establecida, ya que el mineral protege las células contra los efectos nocivos y los agentes agresivos (18,19). Esta acción puede ser comprobada por la actividad sérica de la ALT, que se considera un biomarcador importante de la función hepática. La actividad de la ALT se redujo en las ovejas suplementadas con  $(PhSe)_2$ , lo que puede considerarse un efecto protector de esta forma de selenio en el hígado de las ovejas durante el período de lactancia. Esta enzima se libera en la sangre después de una lesión hepática, que puede ocurrir durante el período de lactancia de las ovejas, debido a la mayor necesidad metabólica y al estrés oxidativo (20). Además del efecto protector del selenio, es importante destacar que la suplementación con cinco dosis de  $(PhSe)_2$  no fue tóxica para los animales.

Los niveles de triglicéridos, albúmina y urea no difirieron entre los grupos, es decir, el  $(PhSe)_2$  no ejerce efectos en el metabolismo o síntesis de estas variables. El aumento de los niveles de colesterol puede ser beneficioso para los animales, ya que una correlación positiva entre el aumento del colesterol y la progesterona en los ovinos se refleja en un mejor rendimiento reproductivo (21). El aumento de los niveles de proteína total está directamente relacionado con el aumento de los niveles de globulinas en los animales suplementados con  $(PhSe)_2$  después de 60 días de experimentación. Este resultado puede explicarse por la capacidad del selenio para proteger la estructura y la función de la proteína contra la oxidación (22), manteniendo la viabilidad e integridad de la proteína. Además, el  $(PhSe)_2$  puede ejercer un efecto directo o indirecto sobre las células involucradas en la respuesta inmune, ya que el selenio actúa como modulador del sistema inmunológico (4,5).

La ovoposición de los helmintos no se vio afectada por la suplementación con  $(PhSe)_2$ . Esperábamos que una acción indirecta del selenio, es decir, el suplemento  $(PhSe)_2$ , estimularía una respuesta contra los helmintos gastrointestinales y, en consecuencia, reduciría la infección parasitaria y la ovoposición. Esto podría deberse a que

protein function against oxidation (22), maintaining the protein viability and integrity. Also, the (PhSe)<sub>2</sub> can exert a directly or indirectly effects on cells involved in the immune response, since selenium acts a modulator of immunology system (4,5).

The helminths oviposition was not affected by (PhSe)<sub>2</sub> supplementation. We expected an indirectly action of selenium, i.e., the (PhSe)<sub>2</sub> supplementation would stimulate a response against gastrointestinal helminths, and consequently would reduce the parasitic infection and oviposition. This could occurred because selenium acts in the expression of L-selectin and interleukin-8R genes, and in the TLR-4 neutrophils receptor in sheep, that are involved in the recognition and response to bacterial and parasitic pathogens (23).

Ecotoxicological test is very important to verify the homeostasis between production and environment, since this test evaluate whether residues of chemicals would cause impact on soil microfauna. In this study, the residues of (PhSe)<sub>2</sub>, or our metabolites, did not affected the springtails reproduction. The quantification of springtails is the initial point to understanding the ecological processes of nutrient cycling, because they are considered indicators of anthropogenic interventions and soil quality (24). Recent, research to evaluate the effects of pig manure, from diets incorporating veterinary pharmaceuticals, on survival and reproduction of *F. candida* observed that application of these residues should be regulated not only using a volume-based criterion, but should incorporate data on soil properties (25). Thus, we believe that test for new supplements can be accomplished with an ecotoxicological assessment, seeking environmental safety.

The protocol with (PhSe)<sub>2</sub> at administered dose was not able to control the parasitic infection or reduce the helminths oviposition, although has been observed an increase in globulin levels, a fraction of protein composed by immunoglobulins and inflammatory protein of acute phase. The increase of cholesterol levels in the supplemented dairy sheep with (PhSe)<sub>2</sub> may have been a beneficial effect, since cholesterol is a cofactor for progesterone synthesis, hormone directly linked with better reproductive performance. Moreover, the feces of supplemented animals with (PhSe)<sub>2</sub> can be used for organic fertilizing without significant negative impacts to soil springtails fauna, an important marker of soil quality and environmental contamination.

**Ethics Committee.** This Project was approved by Ethics Committee for Animal Experimentation of Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/ UDESC), under protocol number 5446050216.

el selenio actúa en la expresión de los genes L-selectina e interleucina-8R, y en el receptor de neutrófilos TLR-4 en ovejas, que están involucrados en el reconocimiento y respuesta a patógenos bacterianos y parasitarios (23).

La prueba ecotoxicológica es muy importante para verificar la homeostasis entre la producción y el medio ambiente, ya que esta prueba evalúa si los residuos de sustancias químicas causarían un impacto en la microfauna del suelo. En este estudio, los residuos de (PhSe)<sub>2</sub>, o nuestros metabolitos, no afectaron la reproducción del colémbolo. La cuantificación de los colémbolos es el punto inicial para comprender los procesos ecológicos del ciclo de los nutrientes, porque se consideran indicadores de las intervenciones antropogénicas y de la calidad del suelo (24). Investigaciones recientes para evaluar los efectos del estiércol porcino, a partir de dietas que incorporan productos farmacéuticos veterinarios, en la supervivencia y reproducción de *F. candida* observaron que la aplicación de estos residuos debería regularse no sólo utilizando un criterio basado en el volumen, sino también incorporando datos sobre las propiedades del suelo (25). Por lo tanto, creemos que la prueba de nuevos suplementos puede llevarse a cabo con una evaluación ecotoxicológica, buscando la seguridad ambiental.

El protocolo con (PhSe)<sub>2</sub> a dosis administrada no pudo controlar la infección parasitaria ni reducir la ovoposición de los helmintos, aunque se ha observado un aumento de los niveles de globulina, una fracción de proteína compuesta por inmunoglobulinas y proteína inflamatoria de fase aguda. El aumento de los niveles de colesterol en las ovejas lecheras suplementadas con (PhSe)<sub>2</sub> puede haber sido un efecto beneficioso, ya que el colesterol es un cofactor para la síntesis de progesterona, hormona directamente relacionada con un mejor rendimiento reproductivo. Además, las heces de los animales suplementados con (PhSe)<sub>2</sub> pueden ser usadas para fertilización orgánica sin impactos negativos significativos para la fauna de colémbolos del suelo, un marcador importante de la calidad del suelo y la contaminación ambiental.

**Comité de Ética.** Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC), bajo el número de protocolo 5446050216.



## REFERENCES

1. Caroprese M, Albenzio M, Annicchiarico G, Sevi A. Changes occurring in immune responsiveness of single and twin-bearing Comisana Ewes during the transition period. *J Dairy Sci* 2006; 89(2):562-568.
2. Underwood EJ, Suttle NF. *The Mineral Nutrition of Livestock*. Wallingford: CABI 1999, 3:614.
3. Battin, EE, Perron NR, Brumaghim JL. The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity. *Inorg Chem* 2006; 45(2):499-501.
4. McDowell LR, Williams SN, Hidiroglou N, Njeru CA, Hill GM, Ochoa L, Wilkinson NS. Vitamin E and selenium supplementation for the ruminant. *Anim Feed Sci Technol* 1996; 60(3-4):273-296.
5. Riaz M, Mehmood KT. Selenium in human health and disease: A Review. *J Postgrad Med Inst* 2012; 26(2): 120-133.
6. Sadeghian S, Kojouri GA, Mohebb A. Nanoparticles of Selenium as Species with Stronger Physiological Effects in Sheep in Comparison with Sodium Selenite. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146(3):302-308.
7. Kamdev S, Dass RS, Garg AK, Sahu S, Gogoi S. Effect of different selenium sources (Selenium yeast and Sodium selenite) on haematology, blood chemistry and thyroid hormones in male goats (*Capra hircus*). *Indian J Anim Res* 2015; 49(6):788-792.
8. Faixová Z, Piešová E, Maková Z, Cobanová K, Faix S. Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on ruminal enzyme activities and blood chemistry in sheep. *Acta Vet Brno* 2016; 85(2):185-194.
9. Freitas AS, Prestes AS, Wagner C, Sudati JH, Alves D, Porciúncula LO, Kade IJ, Rocha JBT. Reduction of diphenyl diselenide and analogs by mammalian thioredoxin reductase is independent of their glutathione peroxidase-like activity: a possible novel pathway for their antioxidant activity. *Molec* 2010; 15(11):7699-7714.
10. Nicolodi PRSJ, Camargo EV, Zeni D, Rocha RX, Cyrillo FC, Souza FN, Della Libera AMM, Bondan C, Leal MLR. Perfil proteico e metabolismo oxidativo de cordeiros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus contortus* e suplementados com selênio e vitamina E. *Cienc Rural* 2010; 40(3):561-567.
11. Barbosa CF, Tonin AA, Da Silva AS, Azevedo MI, Monteiro DU, Waczuk EP, Duarte T, Hermes C, Camillo G, Vogel FF, Faccio L, Tonin PT, Wolkmer P, Leal MR, Duarte MMF, Moresco RN, Lopes STA, De La Rue ML. Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation. *Parasitol* 2014; 141(13):1761-1768.
12. Azizi P. Characterization of Humic Fertilizers from Horse, Sheep and Cattle Dung by their Density. *Asian J Chem* 2007; 19(5):3677-3680.
13. Gil-Díaz MDM, Perez-Sanz A, Martín M, Lobo MC. Potential diffusion of doramectin into a soil amended with female pig manure. A Field Experiment. *J Agric Food Chem* 2011; 59(19):10635-10640.
14. Zhao Z, Zhang Y, Xuan Y, Song W, Si W, Zhao Z, Rao Q. Ion-exchange solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of veterinary drugs in organic fertilizers. *J Chromat* 2016; 1022(1):281-289.
15. Gordon HM, Whitlock HV. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res* 1939; 12(1):50-52.
16. ISO 11267. *Soil Quality – Inhibition of Reproduction of Collembola (Folsomia candida) by Soil Pollutants*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 1999.
17. R-Core-Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.

18. Cemek M, Büyükben A, Büyükokuroglu ME, Aymelek F, Tür L. Protective roles of vitamin E (-tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: a comparative study. *Pest Biochem Physiol* 2010; 96(3):113–118.
19. El-Demerdash FM. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 18(1):113–122.
20. Piccione G, Casella S, Assenza A, Fazio F, Caola G. Evaluation of serum homocysteine and oxidative stress during lactation in ewes. *Czech J Anim Sci* 2008; 53:462-465.
21. Bianchi AE, Macedo VP, França RT, Lopes STA, Lopes LS, Stefani LM, Volpato A, Lima HL, Paiano D, Machado G, Da Silva AS. Effect of adding palm oil to the diet of dairy sheep on milk production and composition, function of liver and kidney, and the concentration of cholesterol, triglycerides and progesterone in blood serum. *Small Rum Res* 2014; 117: 78–83.
22. Reddy KP, Sailaja G, Krishnaiah C. Protective effects of selenium on fluoride induced alterations in certain enzymes in brain of mice. *J Environ Biol* 2009; 30(5):859–864.
23. Hujeriletu H, Bobe G, Vorachek WR, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ, Hall JA. Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. *Biol Trace Elem Res* 2013; 154(1):28–44.
24. Cutz-Pool LQ, Palacios-Vargas JG, Castañomeneses G, García-Calderón, NE. Edaphic Collembola from two agroecosystems with contrasting irrigation type in Hidalgo State, México. *Appl Soil Ecol* 2007; 36(1):46-52.
25. Maccari AP, Baretta D, Paiano D, Leston S, Freitas A, Ramos F, Sousa JP, Klauberg-Filho O. Ecotoxicological effects of pig manure on *Folsomia candida* in subtropical Brazilian soils. *J Hazardous Materials* 2016; 314:113-120.