

Efeito da suplementação com óleo essencial de gengibre na integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de coelhos

Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Andreia Souza Lopes¹, Heverton Rodrigues Gally¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Júlia do Nascimento Cardoso¹, Israel Paiva Linhares¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia
*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

A utilização de prebióticos, probióticos, óleos essenciais, ácidos orgânicos e alguns extratos vegetais podem atuar de maneira positiva no organismo animal, melhorando o desempenho e substituindo, em alguns casos, aditivos nas dietas. A cunicultura também emprega o uso de óleos essenciais com o intuito de substituir o uso de aditivos sintéticos. O objetivo com esse estudo foi avaliar o efeito da suplementação oral com óleo essencial de gengibre na qualidade seminal de coelhos. Utilizou-se 10 coelhos adultos das raças Nova Zelândia, Chinchila e Califórnia, distribuídas de forma igualitária entre os dois tratamentos, com peso médio de $2,45 \pm 0,27$ kg, com escore da condição corporal médio de $3,10 \pm 0,30$. Os tratamentos (T) tiveram cinco repetições e o ejaculado como unidade experimental, sendo: T1 = controle, coelhos suplementados diariamente com água via oral e T2 = coelhos suplementados diariamente com 0,2mL de solução a 0,5% de óleo essencial de gengibre (Therra by Laszlo[®]), via oral. Por um período de 82 dias antes da realização da coleta, os animais receberam diariamente, o óleo essencial de gengibre. O fornecimento ocorreu sempre no período da manhã e com o auxílio de seringa de 1 mL sem agulha. Os animais, do tratamento controle, receberam água, para que fossem submetidos ao mesmo manejo diário e às mesmas condições de estresse de contenção física dos animais tratados. As coletas de sêmen foram realizadas uma vez por semana pela técnica de vagina artificial, totalizando cinco coletas por animal e 25 ejaculados por tratamento. Após as coletas, a fração gel dos ejaculados foram retiradas para mensuração do volume seminal (mL) e em seguida mensurados os demais parâmetros físicos seminais, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática foi realizado o teste hiposmótico, o qual adicionou-se em 1mL de solução hiposmótica a base de frutose (100mOsmol/Kg), 10 μ L de sêmen de cada tratamento, seguido de incubação em banho maria a 37 °C por 30 minutos. Após o tempo de incubação, as lâminas foram preparadas e avaliadas em microscópio de contraste de fase, contando 200 células em aumento de 400 vezes, classificando-as em células com membrana plasmática íntegra ou lesionada. A integridade da membrana acrossomal foi avaliada por meio da preparação de esfregaços seminais corados com Vermelho Congo. Após a coloração, com auxílio de microscopia de luz em aumento de 1.000 vezes sob imersão, 200 células foram contadas e classificadas como: 1) acrossoma íntegro; 2) acrossoma irregular; 3) desprendimento parcial do acrossoma; 4) desprendimento total do acrossoma. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, sendo que para as variáveis que atenderam aos pressupostos de normalidade, utilizou-se a análise de variância e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste Mann-Whitney. O nível de significância adotado para todas as avaliações foi de 5%. Houve diferença entre os tratamentos para integridade de membrana plasmática espermática ($P < 0,05$), com maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra para o tratamento suplementado (T1=28,07 \pm 21,49% e T2=53,68 \pm 26,13%). Conforme estudo realizado por Khalil et al. (2019), a suplementação com óleo essencial de gengibre, com dose diária de 100 mg/kg por 6 semanas, também melhorou a integridade da membrana plasmática espermática de coelhos em comparação ao grupo controle. Além disso, os níveis de malondialdeído, um marcador de estresse oxidativo, foram significativamente reduzidos no grupo suplementado com óleo essencial de gengibre. Contudo, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para integridade acrossomal, em nenhuma das classes avaliadas, com média de 94,30 \pm 3,74% e 90,88 \pm 7,82% para acrossoma íntegro para o tratamento controle e tratado, respectivamente. Khalil et al. (2019), no mesmo estudo citado anteriormente, também relataram que não houve diferença na integridade acrossomal espermática entre os coelhos suplementados e não suplementados. A suplementação oral com óleo essencial de gengibre na concentração de 0,5%, melhora a qualidade seminal, sendo benéfico o seu fornecimento, apesar de não influenciar na integridade do acrossoma, o seu uso potencializa um efeito protetor sobre a integridade da membrana plasmática espermática de coelhos.

Palavras-chave: Teste hiposmótico, qualidade seminal, cunicultura.

Effect of ginger essential oil supplementation on plasma and acrosomal membrane integrity of rabbit spermatozoa

Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Andreia Souza Lopes¹, Heverton Rodrigues Gally¹, Jamile Santos Nardi Gomes¹, Júlia do Nascimento Cardoso¹, Israel Paiva Linhares¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

The use of prebiotics, probiotics, essential oils, organic acids and some plant extracts may act in a positive way in the organism of the animal, improving performance and replacing, in some cases, additives in the diets. Rabbit farming also employs the use of essential oils to replace the use of synthetic additives. The objective of this study was to evaluate the effect of oral supplementation with ginger essential oil on the seminal quality of rabbits. Ten adult rabbits of the breeds New Zealand, Chinchilla and California were used, distributed in equal way between treatments, with mean weight of 2.45 ± 0.27 kg, with mean body condition score of 3.10 ± 0.30 . The treatments (T) had five repetitions and the ejaculate as experimental unit, being: T1 = control, rabbits daily supplemented with water orally and T2 = rabbits daily supplemented with 0.2 mL of 0.5% solution of ginger essential oil (Therra by Laszlo®), orally. For 82 days prior to the collection period, the animals received ginger essential oil once a day. Supplying occurred always in the morning period using a 1 mL syringe without a needle. The control animals received water, so that they were subjected to the same daily management and stress conditions of physical restraint as the treated animals. The semen was collected once a week, in the morning, using the artificial vagina technique, totalling five collections per animal and 25 ejaculates per treatment. After the collections the gel fraction of the ejaculates was removed for the measurement of seminal volume (mL) and then the other seminal physical parameters were measured, according to the Brazilian College of Animal Reproduction. To evaluate the functional integrity of the plasma membrane, the hyposmotic test was performed, in which 10 μ L of semen of each treatment were added in 1 mL of fructose-based hyposmotic solution (100mOsmol/Kg), followed by incubation in a 37°C water bath for 30 minutes. After the incubation time, the slides were prepared and evaluated under a phase-contrast microscope, counting 200 cells at 400x magnification, classifying them into cells with an intact or damaged plasma membrane. The acrosomal membrane integrity was evaluated by preparing seminal smears stained with Congo Red. After staining, with the aid of light microscopy at 1000x magnification under immersion, 200 cells were counted and classified as: 1) acrosome intact; 2) acrosome irregular; 3) partial detachment of the acrosome; 4) total detachment of the acrosome. The normality of the data was verified by the Shapiro-Wilk test, being that the variable that met the normalcy assumptions, the variance analysis was used and for variables that did not present normal distribution, the Mann-Whitney test was used. A 5% significance level was adopted for all evaluations. There was a difference between treatments for sperm plasma membrane integrity ($P < 0.05$), with greater percentage of spermatozoa with intact plasma membrane for the supplemented treatment (T1=28.07 \pm 21.49% and T2=53.68 \pm 26.13%). According to a study performed by Khalil et al. (2019), supplementation with ginger essential oil, with a daily dose of 100mg/kg for 6 weeks also improved sperm plasma membrane integrity of rabbits in comparison to the control group. Besides, the levels of malondialdehyde, an oxidative stress marker, were significantly reduced in the group supplemented with ginger essential oil. However, there was no difference ($P > 0.05$) between treatments for acrosomal integrity, in any of the evaluated classes, with a mean of 94.30 \pm 3.74% and 90.88 \pm 7.82% for intact acrosome for unsupplemented and supplemented groups, respectively. Khalil et al. (2019), in the same previously quoted study, also reported there was no difference in sperm acrosomal integrity between supplemented and unsupplemented rabbits. The oral supplementation with ginger essential oil at a concentration of 0.5%, improves seminal quality, its supply being beneficial, although not influencing the acrosome integrity, its use potentiates a protective effect on the integrity of the sperm plasma membrane of rabbits.

Keywords: Hyposmotic test, semen quality, rabbit breeding.

O uso do antioxidante taurina para criopreservação de sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Vinicius Wagner Silva¹; Renan Cassaroto Appel²; Karine Nicole Siqueira³; Laurival Antônio Vilas Bôas³; Lucienne Garcia Pretto Giordano¹; Jorge Manuel de Oliveira Fernandes²; José Beirão dos Santos²; Maria Isabel Mello Martins^{1*}

¹Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina, Paraná - Brasil

²Faculdade de Biociências e Aquicultura – Nord University, Bodø, Norway

³Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Paraná - Brasil

*e-mail: imartins@uel.br

O processo de tecnificação das cadeias produtivas visa reduzir os custos de produção, enquanto aumenta as taxas de produção para atender uma demanda ascendente do mercado consumidor. Na aquicultura, a Tilápia do Nilo vem se mostrando uma boa alternativa neste cenário, tendo em vista que é uma espécie que pode se adaptar a diferentes condições ambientais, é precoce reprodutivamente, além de ser uma fonte proteica saudável e de baixo custo. Tendo como objetivo o desenvolvimento de linhagens de Tilápia do Nilo com maiores índices zootécnicos e resistência a patógenos, a criopreservação do gameta masculino se torna uma importante biotecnologia reprodutiva, uma vez que a genética de linhagens desejadas pode ser transportada a diversos criatórios. Durante o processo de criopreservação espermática pode ocorrer perda do material devido a formação de cristais de gelo e de espécies reativas de oxigênio (EROS) que desestabilizam a membrana plasmática causando lesão irreversível dos espermatozoides. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição no diluente do antioxidante taurina em três concentrações (1, 5 e 50 mMol) sobre as características espermáticas de Tilápia do Nilo. Foram utilizados quatro animais (n=4) de dois anos, mantidos em um sistema de recirculação aquícola (RAS) de 1500 L com temperatura da água variando de 27 a 30°C recebendo dieta comercial com 30% de proteína bruta. Os animais foram previamente anestesiados com solução de Eugenol[®] 120 ppm e as colheitas foram realizadas por massagem abdominal. Amostras contaminadas com muco, urina, sangue ou fezes foram descartadas. O ejaculado foi mantido a 4°C até o início das análises. Para análise da cinética a amostra foi ativada com água do tanque a 27-30°C em uma proporção de 1:10 e 3 µL foram depositados em uma lâmina Cell-Vu[®] e após dez segundos avaliada pelo CASA (*Computer-assisted sperm analysis*, MICROTIC S.L. - Espanha) utilizando o *software* SCA[®] (*Sperm Class Analyzer*) e *setup* para peixes (*frame rate*: 50fps, *number of images* 25; *area* 2µm²; *drifting* 10 µm/s). Para a criopreservação, o sêmen deveria possuir no mínimo 80% de motilidade total. Para a avaliação de integridade de membrana plasmática foram utilizadas duas sondas fluorescentes. A amostra foi diluída com 0,5 µL de SYBR[®] green diluído em 1:50 em albumina sérica bovina (BSA) e 2,5 µL de iodeto de propídeo (IP) (1µg/µL). Após o preparo, as amostras foram avaliadas por microscopia de epifluorescência (Nikon[®] Eclipse Ci, Nikon, Tokio, Japão), sendo contadas um total de 300 células em 400x de magnitude. Para criopreservação a amostra foi diluída em uma proporção 1:3 em meio composto por diluente iônico (75mMol L⁻¹ NaCl; 70mMol L⁻¹ KCl; 2mMol L⁻¹ CaCl₂; 1mMol L⁻¹ MgSO₄ e 20mMol L⁻¹ Tris – pH = 8,0) e como crioprotetor metanol 10%, divididos nos grupos: controle (sem adição de taurina), 1 mMol, 5 mMol e 50 mMol de taurina. As amostras foram envasadas em palhetas francesas (0,5 mL) seladas com álcool polivinílico, mantidas sob refrigeração (4°C) por 30 minutos e congeladas em vapor a 6 cm da coluna de nitrogênio líquido (N₂) por dez minutos e posteriormente submersas no N₂. A descongelação foi em banho-maria a 30°C por 30 segundos. As análises realizadas no sêmen fresco foram repetidas, todas realizadas em triplicatas. A diferença entre os resultados do sêmen a fresco e após os tratamentos foram expressos. Foi utilizado o método estatístico de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% pelo programa Statistica[®] v10.0. Foi identificada menor perda de motilidade total no meio com 1 mMol de taurina em relação as outras concentrações de taurina (1 mMol = 33,4% versus 5 mMol= 46% e 50 mMol = 45,5%) e menor perda na subpopulação Média em relação no meio com 5 mMol de taurina (1 mMol = 13% versus 5 mMol= 21%). Baseado nos resultados obtidos, pode se inferir que o acréscimo de 1 mMol de taurina no meio de diluição iônico pode permitir uma redução nas perdas cinéticas ocasionadas pela criopreservação de espermatozoides de Tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Espermatozoide; peixe; estresse oxidativo.

Agradecimentos: Ao Conselho de Pesquisa da Noruega (projeto n ° 310103) pela colaboração e bolsa de estudos pelo projeto Norbraqua. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos.

The use of antioxidant taurine for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm cryopreservation

Vinicius Wagner Silva¹; Renan Cassaroto Appel²; Karine Nicole Siqueira³; Laurival Antônio Vilas Bôas³; Lucienne Garcia Pretto Giordano¹; Jorge Manuel de Oliveira Fernandes²; José Beirão dos Santos²; Maria Isabel Mello Martins^{1*}

¹Center of Agrarian Sciences – State University of Londrina, Paraná, Brazil

²Faculty of Bioscience and Aquaculture – Nord University, Bodø, Norway

³Center of Biological Sciences – State University of Londrina, Paraná, Brazil

*e-mail: imartins@uel.br

The process of production chain technification aims to reduce production costs, while increasing production rates, to meet increasing demand from the consumer market. In aquaculture, Nile Tilapia has been proving to be a good alternative in this scene, considering that it is a species that can adapt to different environmental conditions, is reproductively precocious, in addition to being a healthy and low-cost protein source. With the objective of developing Nile Tilapia lineages with higher zootechnical indexes and resistance to pathogens, cryopreservation of the male gamete becomes important reproductive biotechnology since the desired lineage genetics can be transported to several breeding sites. During the process of sperm cryopreservation, the material loss may occur due to the formation of ice crystals and reactive oxygen species (ROS) that destabilize the plasmatic membrane, causing irreversible damage to the spermatozoa. The aim of this study was to evaluate the effects of adding the antioxidant taurine to the extender at three concentrations (1, 5, and 50mMol) on sperm characteristics of Nile Tilapia. Four animals (n=4) of two years were used, kept in an aquaculture recirculation system (RAS) of 1500L with water temperature varying from 27 to 30°C receiving a commercial diet with 30% of protein brute. The animals were previously anesthetized with a 120ppm Eugenol® solution and the collections were performed by abdominal massage. Samples contaminated with mucus, urine, blood, or feces were discarded. The ejaculate was kept at 4°C until the beginning of the analyses. For kinetic analysis, the sample was activated with tank water at 27-30°C in a ratio of 1:10, and 3µL were deposited on a Cell-Vu® slide and after ten seconds evaluated by the CASA (Computer-assisted sperm analysis, MICROTIC S.L. - Spain) using the software SCA® (Sperm Class Analyzer), and setup for fish (frame rate: 50fps, number of images 25; area 2µm²; drifting 10 µm/s). For cryopreservation, the sperm should have at least 80% of total motility. For the evaluation of plasmatic membrane integrity, two fluorescent probes were used. The sample was diluted with 0.5 µL of SYBR® green diluted in 1:50 in bovine serum albumin (BSA) and 2.5 µL of Propidium Iodide (PI) (1µg/µL) After preparation, the samples were evaluated by epifluorescence microscopy (Nikon® Eclipse Ci, Nikon, Tokyo, Japan) counted in a total of 300 cells at 400x of magnitude. For cryopreservation, the sample was diluted in a 1:3 ratio in an extender composed of an ionic extender (75mMol L-1 NaCl; 70mMol L-1 KCl; 2mMol L-1 CaCl₂; 1mMol L-1 MgSO₄ and 20mMol L-1 Tris - pH = 8.0) and 10% methanol as a cryoprotectant, divided into groups: control (without the addition of taurine), 1mMol, 5mMol and 50mMol of taurine. The samples were filled in French straws (0.5mL) sealed with polyvinyl alcohol, kept under refrigeration (4°C) for 30 minutes, and frozen in steam at 6cm from the liquid nitrogen (N₂) column for ten minutes and subsequently submerged in N₂. Thawing was performed in a water bath at 30°C for 30 seconds. The analyzes performed on fresh semen were repeated, all performed in triplicates. The difference between the results of fresh semen and after treatments were expressed. The Kruskal-Wallis statistical method was used with a significance level of 5% by the Statistica® v10.0 program. Less loss of total motility was identified in the extender with 1mMol of taurine compared to the other concentrations of taurine (1 mMol = 33,4% versus 5 mMol= 46% e 50 mMol = 45,5%), and less loss in the Medium subpopulation compared to the extender with 5mMol of taurine (1 mMol = 13% versus 5 mMol= 21%). Based on the results obtained, it can be inferred that the addition of 1mMol of taurine in the ionic extender may allow a reduction in the kinetic losses caused by the cryopreservation of Nile Tilapia spermatozoa.

Keywords: Spermatozoa; fish; oxidative stress.

Acknowledgment: To the Research Council of Norway (project n° 310103) for collaboration and scholarship by the Norbraqua project. To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarships.

Qualidade espermática de coelhos suplementados com óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Lucas Oliveira Pinheiro¹, Heverton Rodrigues Gally¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Diego Silva Macedo², Josiene Nascimento de Almeida¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

*E-mail: larissa@ufrb.edu.br

A necessidade de melhoria nos índices reprodutivos dos animais de produção fomenta a pesquisa e intensifica busca de alternativas que promovam a utilização de prebióticos, probióticos, óleos essenciais, que podem agir de forma positiva no organismo animal, além de diminuir resíduos de substâncias nos produtos e subprodutos de origem animal, sendo apontada como segura pela indústria brasileira. A cunicultura também emprega o uso de óleos essenciais com o intuito de substituir o uso de aditivos sintéticos, como também, apresenta outros fatores que justificam seu uso, uma vez que exercem funções antioxidantes e antimicrobianas. O objetivo com este estudo foi avaliar o efeito da suplementação oral com óleo de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) nos aspectos físicos e na vitalidade seminal de coelhos. Foram utilizados 10 coelhos machos adultos divididos em dois tratamentos, sendo: T1 (controle) - sem suplementação com óleo essencial de gengibre (OEG) e o T2 - com suplementação de OEG a 0,5%. O OEG foi diluído em óleo fracionado de coco. Os animais foram alimentados com dieta à base de ração peletizada comercial na quantidade de 150g/animal/dia e volumoso Rami (*Boehmeria nivea*). A água foi fornecida *ad libitum*. Os animais receberam o óleo essencial de gengibre por um período de 82 dias antes da realização das coletas seminais, compreendendo mais de um ciclo espermatogênico completo e o trânsito epididimário, para que o efeito da ingestão de óleo essencial de gengibre fosse avaliado. O fornecimento oral do OEG foi realizado com auxílio de seringa, desprovida de agulha, diariamente, sempre no período da manhã. Os animais do tratamento controle receberam água, da mesma forma, para que fossem submetidos ao mesmo manejo diário e às mesmas condições de estresse de contenção física dos animais tratados. As coletas de sêmen foram realizadas pela técnica de vagina artificial e uma fêmea como manequim foi utilizada. As coletas ocorreram uma vez por semana, nas gaiolas dos machos, durante cinco semanas consecutivas. Imediatamente após as coletas, a fração gel dos ejaculados foi retirada, seguido da mensuração do volume seminal (mL) e das avaliações dos demais parâmetros físicos seminais, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Foram avaliados o aspecto seminal (aquoso, leitoso e cremoso; acinzentado), o turbilhonamento espermático (0-5), a motilidade espermática progressiva (%), vigor espermático (0-5), em microscopia de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão). Para avaliação da integridade da membrana plasmática foi realizada a coloração espermática com os corantes eosina-nigrosina. Foram contadas duzentas células, sendo os espermatozoides corados em rosa considerados com membrana plasmática lesada e espermatozoides não corados considerados com membrana plasmática íntegra. Os ejaculados, independente do tratamento, apresentaram em sua maioria aspecto branco aquoso. Não houve diferença ($P>0,05$) para turbilhonamento espermático entre os grupos T1 ($0,00\pm 1,50$) e T2 ($1,50\pm 1,50$). Houve melhora na motilidade espermática progressiva ($P=0,001$), para coelhos suplementados ($85,00\pm 18,75\%$) em detrimento dos não suplementados ($50,00\pm 82,50\%$). Da mesma forma, o vigor espermático apresentou melhora ($P=0,002$), entre os animais suplementados ($3,50\pm 2,00$) e não suplementados ($1,50\pm 2,50$). As concentrações espermáticas encontradas estão dentro do esperado para a espécie no tratamento controle e estão acima da média esperada para o grupo suplementado, sendo os valores obtidos para T1 de $225\times 10^6\pm 150\times 10^6$, e para T2, de $987,5\times 10^6\pm 387,5\times 10^6$ espermatozoides/mL ($P<0,05$). Não houve diferença para integridade de membrana plasmática espermática de coelhos suplementados com óleo essencial de gengibre na dose de 0,5% via oral ($P>0,05$). A melhora na motilidade espermática progressiva e no vigor espermático dos animais suplementados com óleo essencial de gengibre, coloca-o como uma alternativa para melhoria da qualidade seminal de coelhos.

Palavras-chave: antioxidante, cunicultura, óleo essencial

Sperm quality of rabbits supplemented with ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil

Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Lucas Oliveira Pinheiro¹, Heverton Rodrigues Gally¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Diego Silva Macedo², Josiene Nascimento de Almeida¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*E-mail: larissa@ufrb.edu.br

The need for improvement in the reproductive indexes of production animals foment research, and intensifies the search for alternatives that promote the use of prebiotics, probiotics, and essential oils, which can act in a positive way in the animal organism, besides reducing residues of substances in products and by-products of animal origin, and being pointed out as safe by the Brazilian industry. Rabbit farming also employs the use of essential oils to replace the use of synthetic additives, as well as other factors that justify their use, since they have antioxidant and antimicrobial functions. The objective with this study was to evaluate the effect of oral supplementation with ginger oil (*Zingiber officinale* Roscoe) on physical aspects and seminal vitality of rabbits. An amount of 10 adult male rabbits were used, divided into two treatments: T1 (control) - without ginger essential oil (GEO) supplementation and T2 - with 0.2mL of GEO supplementation at a concentration of 0.5%. The GEO was diluted in fractionated coconut oil. The animals were fed a diet based on commercial pelleted ration in the amount of 150g/animal/day, with Rami (*Boehmeria nivea*) roughage and water was supplied *ad libitum*. The animals received ginger essential oil for a period of 82 days before seminal collections were performed, comprising more than one complete spermatogenic cycle and epididymal transit, so that the effect of ginger essential oil intake could be evaluated. The oral supply of GEO was performed using a syringe, with no needle, daily, always during the morning. The animals in the control treatment received the same form and volume of water, so that they were subjected to the same daily management and stress conditions of physical restraint as the treated animals. Semen collections were performed using the artificial vagina technique and a female dummy once a week in the cages of the males, during five consecutive weeks. Immediately after the collections the gel fraction of the ejaculates was removed, then the seminal volume (mL) was measured and then evaluated the other seminal physical parameters, according to the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 2013). Seminal appearance (watery, milky and creamy; grayish), sperm swirling (0-5), progressive sperm motility (%), sperm vigor (0-5) were evaluated in phase-contrast microscopy (Olympus, Tokyo, Japan). To evaluate the integrity of the plasma membrane, sperm were stained with eosin-nigrosin. Two hundred cells were counted, with pink stained spermatozoa considered to have damaged plasma membranes and uncolored spermatozoa considered to have healthy plasma membranes. The ejaculates, regardless of treatment, presented mostly a watery white aspect. There was no difference ($P>0.05$) for sperm whirling between groups T1 (0.00 ± 1.50) and T2 (1.50 ± 1.50). There was improvement in progressive sperm motility ($P=0.001$), for supplemented rabbits (85.00 ± 18.75) over non-supplemented rabbits (50.00 ± 82.50). Similarly, sperm vigor showed improvement ($P=0.002$), between supplemented (3.50 ± 2.00) and non-supplemented (1.50 ± 2.50) animals. Sperm concentrations were within the expected range for the species in the control treatment and above the expected mean for the supplemented group, with values for T1, $225\times 10^6\pm 150\times 10^6$, and for T2, $987,5\times 10^6\pm 387,5\times 10^6$ spermatozoa/mL ($P<0.05$). There was no difference for vitality of semen from rabbits supplemented with ginger essential oil at a dose of 0.5% orally ($P>0.05$). The improvement in progressive sperm mobility and sperm vigor of the animals supplemented with ginger essential oil, makes it an alternative to improve the semen quality of rabbits.

Keywords: antioxidant, rabbit farming, essential oil

Qualidade seminal de coelhos submetidos à suplementação com óleo de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Lorena Ribeiro Silva Andrade¹, Heverton Rodrigues Gally¹, Luiz Edmundo Cincurá de Andrade Sobrinho¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Rosileia Silva Souza¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – Bahia

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

A utilização de óleos essenciais na suplementação animal vem sendo fonte de experimentações, alcançando resultados satisfatórios nas pesquisas. O óleo essencial de gengibre, por possuir ação analgésica, antitumoral, anti-diabética, anti-inflamatória e inseticida, é utilizado na cunicultura a fim de reduzir o uso de aditivos sintéticos que possam prejudicar o desempenho reprodutivo do animal e se torna aliado na melhora na qualidade seminal dos coelhos. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar se a suplementação com óleo essencial de gengibre apresenta um potencial efeito benéfico na qualidade seminal de coelhos, por meio da atividade mitocondrial e integridade de cromatina. Utilizou-se 10 coelhos das raças Nova Zelândia, Chinchila e Califórnia, distribuídos de forma igualitária entre os dois tratamentos (T), sendo: T1 (controle) (n=5): sem suplementação com óleo essencial de gengibre e T2 (n=5): suplementação com óleo essencial de gengibre a 0,5%. O óleo essencial foi diluído em óleo de coco fracionado. O fornecimento oral foi realizado com seringa, uma vez ao dia. Por um período de 82 dias antes da realização da coleta, os animais receberam diariamente, o óleo essencial de gengibre. Os animais do grupo controle receberam a mesma quantidade em água para serem submetidos ao mesmo manejo. Foram feitas coletas de sêmen uma vez na semana, durante cinco semanas consecutivas, pelo método da vagina artificial. Para avaliar a atividade mitocondrial, 20µL de sêmen foi adicionado em 20µL de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com 1mg/mL de fosfato salino tamponado (PBS), seguido de incubação a 37°C, por 60 minutos, na ausência de luz. Após o período de incubação, foram feitos esfregaços e os mesmos fixados durante 10 minutos em formaldeído a 10%. As lâminas foram lavadas com água destilada após a fixação e secas ao ar na ausência de luz. A leitura das lâminas foi realizada no microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000 vezes, com auxílio do óleo de imersão. Em cada lâmina foram contadas e classificadas 200 células espermáticas: classe I (peça intermediária totalmente corada); classe II ($\geq 50\%$ da peça intermediária corada); classe III ($\leq 50\%$ da peça intermediária corada) e classe IV (ausência de coloração da peça intermediária). Na avaliação da compactação de cromatina, fez-se esfregaços com cada tratamento, que foram fixados em solução de Carnoys por 1 minuto e etanol a 70% por 3 minutos. Após a fixação, as lâminas foram hidrolisadas por 15 minutos em ácido clorídrico, lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. Para obter coloração, foi depositada sobre a lâmina uma gota de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0 e posto uma lamínula após este processo. Foram avaliadas 500 células com objetiva de 1000 vezes sob imersão e classificadas em cromatina íntegra (região da cabeça corada em azul claro); cromatina fragmentada (região da cabeça corada em azul escuro ou violeta). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk, sendo que para as variáveis que atenderam aos pressupostos de normalidade, utilizou-se a análise de variância e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste Mann-Whitney. O nível de significância adotado para todas as avaliações foi de 5%. Não houve diferença na porcentagem de cromatina íntegra e fragmentada entre os dois grupos ($P > 0,05$). O grupo controle apresentou 95,26 \pm 3,10% de cromatina íntegra e 4,73 \pm 3,10% de cromatina fragmentada e o grupo tratado apresentou 95,30 \pm 3,66% de cromatina íntegra e 4,69 \pm 3,66% de fragmentada. Não houve diferença entre os grupos que receberam o óleo essencial de gengibre e o grupo controle em relação à atividade mitocondrial espermática ($P > 0,05$), o grupo controle apresentou valores para classe I = 89,50 \pm 11,00; classe II = 6,50 \pm 8,00; classe III = 2,50 \pm 3,50 e classe IV = 0,50 \pm 1,50% e o grupo tratado apresentou para a classe I = 91,00 \pm 7,25; classe II = 5,50 \pm 5,25; classe III = 2,00 \pm 1,75 e classe IV = 0,50 \pm 1,00%. A suplementação oral com óleo essencial de gengibre na concentração de 0,5% para coelhos não apresentou efeito na qualidade seminal com base na compactação de cromatina e atividade mitocôndria.

Palavras-chave: atividade mitocondrial, compactação de cromatina, qualidade espermática.

Seminal quality of rabbits submitted to supplementation with ginger oil (*Zingiber officinale* Roscoe)

Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Lorena Ribeiro Silva Andrade¹, Heverton Rodrigues Gally¹, Luiz Edmundo Cincurá de Andrade Sobrinho¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Rosileia Silva Souza¹, Larissa Pires Barbosa^{1,*}

Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas - Bahia - Brazil

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

The use of essential oils in animal supplementation has been the source of experiments, achieving satisfactory results in research. The essential oil of ginger is used in rabbit breeding, for having analgesic, antitumor, antidiabetic, anti-inflammatory and insecticide action, in order to reduce the use of synthetic additives that can harm the reproductive performance of the animal and becomes an ally in improving the seminal quality of rabbits. Thus, the objective of this study was to evaluate if the supplementation with ginger essential oil presents a potential beneficial effect in the seminal quality of rabbits, by means of mitochondrial activity and chromatin integrity. A group of 10 rabbits of the breeds New Zealand, Chinchilla and California were used, distributed randomly into two treatments (T), being: T1 (control) (n=5): no ginger essential oil supplementation and T2 (n=5): ginger essential oil supplementation of 0.5%. The essential oil was diluted in fractionated coconut oil. Oral supplementation was performed with a syringe, once a day. For a period of 82 days before collection, the animals received the ginger essential oil daily. The animals in the control group received the same amount of water to be submitted to the same handling. Semen collections were made once a week, throughout five consecutive weeks, using the artificial vagina technique. To evaluate mitochondrial activity, 20µL of semen was added to 20µL of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) with 1mg/mL of phosphate buffered saline (PBS), followed by incubation at 37°C for 60 minutes in the absence of light. After the incubation period, smears were taken and fixed for 10 minutes in 10% formaldehyde. The slides were washed with distilled water after fixation and air-dried in the absence of light. The reading of the slides was done under a phase-contrast microscope at 1000x magnification with the aid of immersion oil. In each slide was counted and classified 200 sperm cells: class I (fully stained midpiece); class II ($\geq 50\%$ of the midpiece stained); class III ($\leq 50\%$ of the midpiece stained) and class IV (no staining of the midpiece). In the evaluation of chromatin compaction, smears were made in each treatment, which were fixed in Carnoy's solution for 1 minute and 70% ethanol for 3 minutes. After fixation, the slides were hydrolyzed for 15 minutes in hydrochloric acid, washed with distilled water, and dried at room temperature. To obtain staining, a drop of 0.025% toluidine blue in McIlvaine buffer, pH 4.0 and a coverslip was placed after this process. A total of 500 cells were evaluated with a 1000x objective under immersion and classified as whole chromatin (head region stained in light blue); fragmented chromatin (head region stained in dark blue or violet). Data normality was verified using the Shapiro-Wilk test, for the variables that reached the standards of normality, variance analysis was used and for variables that did not present normal distribution, the Mann-Whitney test was used. The significance level adopted for all assessments was 5%. There was no difference in the percentage of whole and fragmented chromatin between the groups ($P>0.05$). The control group presented 95.26 \pm 3.10% of whole chromatin and 4.73 \pm 3.10% of fragmented chromatin and the treated group presented 95.30 \pm 3.66% whole chromatin and 4.69 \pm 3.66% fragmented. There was no difference between the groups that received ginger essential oil and the control group regarding the spermatid mitochondrial ability ($P>0.05$), the control group presented values for class I = 89.50 \pm 11.00; class II = 6.50 \pm 8.00; class III = 2.50 \pm 3.50 and class IV = 0.50 \pm 1.50% and the group treated presented for class I = 91.00 \pm 7.25; class II = 5.50 \pm 5.25; class III = 2.00 \pm 1.75 and class IV = 0.50 \pm 1.00%. Oral supplementation with ginger essential oil in the concentration of 0.5% for rabbits did not present effect in seminal quality based on chromatin compaction and mitochondrial activity.

Keywords: mitochondrial activity, chromatin compaction, sperm quality.