

Desafios na coleta e preservação do sêmen de aves

Challenges in poultry semen collection and preservation

Denise Calisto Bongalhardo¹

¹Laboratório de Biotécnicas da Reprodução de Aves (LABRA), UFPel, Pelotas, RS, Brasil

Resumo

O sucesso da reprodução assistida depende da eficiente coleta e preservação do sêmen. A técnica mais utilizada para a coleta de sêmen em aves é a massagem dorso-abdominal e, embora seja uma técnica bem estabelecida, a grande diversidade de espécies de aves muitas vezes se impõe como um desafio, sendo necessárias adaptações na metodologia de coleta para atender às especificidades dos machos. No que se refere à preservação do sêmen, o desafio está em encontrar um protocolo eficiente de congelamento, que seja capaz de preservar o material genético (tanto de aves de produção quanto de aves selvagens) sem que haja diminuição da fertilidade. Nesta revisão, serão abordados os métodos utilizados para a coleta e criopreservação do sêmen de aves, com a intenção de compilar as informações e auxiliar na superação dos desafios presentes.

Palavras-chave: antioxidantes, criopreservação, crioprotetores, massagem dorso-abdominal.

Abstract

Successful assisted reproduction depends on efficient semen collection and preservation. The most used technique for avian semen collections is dorsal-abdominal massage and, although it is a well-established technique, the great diversity of avian species often poses a challenge, requiring adaptations in collection methodology to attend male specificities. Regarding semen preservation, the challenge is to establish an efficient freezing protocol, capable of preserving genetic material (both from production and wild birds), without reducing fertility. In this review, methods used for poultry semen collection and preservation will be addressed, aiming to compile information and to help to overcome the present challenges.

Key words: antioxidants, cryopreservation, cryoprotectors, dorsal-abdominal massage.

Introdução

Biotecnologias da reprodução vêm sendo utilizadas em aves para aumentar os índices reprodutivos das diferentes espécies. Entretanto, o sucesso da reprodução assistida depende da eficiente coleta e preservação do sêmen. Muitas técnicas já foram descritas para a coleta de sêmen em aves, incluindo a interceptação do ejaculado durante a cópula, a massagem dorso-abdominal, a coleta com o uso de cloaca artificial ou eletroejaculador e a coleta cooperativa. Dentre estas, a técnica de massagem dorso-abdominal é a mais difundida, podendo ser utilizada tanto em aves domésticas quanto em aves selvagens. Mesmo sendo uma técnica bem estabelecida, a grande diversidade de espécies de aves muitas vezes se impõe como um desafio, sendo necessárias adaptações na metodologia de coleta para atender às especificidades dos machos. No que se refere à preservação do sêmen, o desafio está em encontrar um protocolo eficiente de criopreservação, que seja capaz de preservar o material genético (tanto de aves domésticas quanto de aves selvagens) sem que haja diminuição da fertilidade. Neste artigo, serão abordados os métodos utilizados para a coleta e criopreservação do sêmen de aves, com a intenção de compilar as informações e auxiliar na superação dos desafios presentes.

Coleta de sêmen

Os primeiros relatos de coleta de sêmen em aves foram feitos no início dos anos 1900 e acompanham as primeiras tentativas de inseminação artificial em galinhas. De acordo com Burrows e Quinn (1937), o primeiro método utilizado foi a coleta de sêmen do ducto deferente de galos mortos, feita

*Correspondência: denisecb@ufpel.edu.br

Recebido: 29 de abril de 2023

Aceito: 25 de maio de 2023

por Ivanov em 1913. O segundo método foi a coleta do sêmen depositado na cloaca da fêmea logo após a cópula, utilizando-se de uma colher (Payne em 1914 e Craft e colaboradores em 1926) ou de uma seringa (Jull e Quinn em 1931). A interceptação do sêmen durante a cópula foi o método utilizado por Amantea em 1922 e por Dunn em 1927, enquanto uma cloaca artificial foi utilizada para coletar o ejaculado de galos (Ishikawa em 1930, Nikitina em 1932 e Adamstone e Card em 1934) e de perus (Warren e Scott em 1935). Em 1935, foi descrita a técnica de massagem dorso-abdominal para coletar sêmen de aves (Burrows e Quinn, 1935) que, até os dias de hoje, é o método de preferência para a coleta de sêmen da maioria das espécies de aves.

Os galos, perus e codornas não possuem pênis; eles têm um falo que é ingurgitado e evertido durante a cópula, fazendo contato com a vagina. Não ocorre penetração, apenas um breve contato do falo com a cloaca da fêmea, conhecido como “beijo cloacal”. A coleta é geralmente realizada por duas pessoas; enquanto uma faz a massagem, a outra faz a contenção da ave (Burrows e Quinn, 1937; Leite e Viveiros, 2007). O macho é contido pelas patas e colocado com o peito sobre uma almofada. Em perus, é mais fácil fazer a contenção com o animal em pé, posicionado entre as pernas do auxiliar, que fica sentado. Para a massagem, uma mão é colocada no dorso, embaixo das asas, e a outra é colocada no abdômen. A mão do dorso irá massagear os testículos, que nas aves estão localizados dentro da cavidade celomática, posicionados ventralmente aos rins e logo abaixo da coluna espinhal. A massagem no abdômen irá simular o contato com a fêmea, que ocorre durante a monta natural. Com as duas mãos, são realizados movimentos coordenados para frente e para trás; o macho irá responder elevando as penas da cauda e fazendo a eversão da cloaca, com ingurgitamento e exposição do falo. Em aves pesadas, a massagem é feita somente no dorso do macho, usando as duas mãos. Este tipo de massagem permite que seja exercida uma maior pressão na região pericloacal, visto que nestes animais, a liberação do sêmen é dificultada pelo acúmulo de gordura local.

Os machos de codorna possuem uma glândula cloacal que deve ser esvaziada antes da coleta, para que a espuma produzida não se misture ao ejaculado. A obtenção de sêmen em codornas é facilitada pela presença de uma fêmea dócil: o macho é colocado com a fêmea por alguns segundos e, no momento em que faz a monta e antes de completar a cópula, é retirado rapidamente para a realização da massagem e coleta do sêmen (Chelmonska et al., 2008).

Embora a técnica de massagem dorso-abdominal esteja bem estabelecida para a coleta de sêmen em aves domésticas, adaptações devem ser feitas para aves selvagens, de acordo com o tamanho do macho e anatomia do órgão copulatório. A sazonalidade e outros aspectos comportamentais também devem ser levados em consideração para uma eficiente coleta de sêmen.

As aves aquáticas (patos e marrecos), assim como os machos de emas e perdizes, possuem órgão copulatório mais desenvolvido do que o dos galináceos; o falo ingurgitado projeta-se da cloaca formando um espiral. Nestas aves, deve ser feita pressão na base do falo, para facilitar a exposição do órgão e o sêmen pode ser coletado logo que emerge na base do falo, com o auxílio de uma seringa ou de um tubo capilar (Góes, 2004).

A coleta de sêmen com o auxílio de eletroejaculador pode ser realizada em algumas espécies. Esta forma de coleta é bastante utilizada em psitacídeos de médio e grande porte (Peixoto, 2023) e em aves aquáticas (Samour et al., 1985).

Outra forma de obtenção de sêmen é a coleta cooperativa, na qual os machos são treinados e voluntariamente copulam com um manequim (passeriformes) (Pellatt e Birkhead, 1994) ou depositam o sêmen em um local específico em resposta a um estímulo comportamental (aves de rapina) (Pereira e Blank, 2017).

Preservação de sêmen

A preservação de sêmen, seja por curtos ou longos períodos, é essencial para o sucesso da inseminação artificial e reprodução assistida. O resfriamento do sêmen permite que o mesmo seja utilizado algumas horas após a coleta, enquanto a criopreservação possibilita o armazenamento por longos períodos, viabilizando o transporte e a ampla distribuição do material genético, além de permitir a estocagem de doses viáveis até o momento apropriado para a inseminação.

Para o armazenamento do sêmen por curtos períodos, diluentes devem ser adicionados ao ejaculado. São utilizadas soluções salinas com pH neutro (entre 6,8 e 7,4), osmolaridade entre 320 e 450 mOsm/L e contendo uma fonte de energia (glicose ou frutose) (Blesbois, 2012). Como exemplo, podemos citar o diluente de Lake e o Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) (Bootwalla e Miles, 1992). O diluente deve estar à temperatura ambiente (20 – 25°C) ao ser misturado com o sêmen, para evitar choque térmico. O sêmen diluído mantém sua qualidade por aproximadamente uma hora nesta temperatura. O

sêmen de galos pode ser mantido em recipiente fechado, entretanto o sêmen de perus necessita de aeração constante e deve ser agitado frequentemente e mantido em recipiente que permita o fluxo de ar (Bakst and Cecil, 1992). Se o intervalo entre coleta e inseminação for maior do que uma hora, o sêmen deve ser refrigerado (5°C). Nesta temperatura, a capacidade fertilizante se mantém por 24 – 48h (Blesbois, 2012).

Para o congelamento, substâncias crioprotetoras devem ser adicionadas ao diluente, para evitar a formação de cristais de gelo e consequentes danos ao espermatozoide (Holt, 2000). Embora as aves tenham sido os primeiros animais reproduzidos por meio de espermatozoide criopreservado, a tecnologia para congelamento de sêmen de aves não evoluiu nas mesmas proporções que o congelamento de sêmen de mamíferos (Partyka and Nizański, 2022). Ao longo dos anos, vários protocolos e diferentes crioprotetores vêm sendo testados (Janosikova et al., 2023) e, embora alguns tenham resultado em boa fertilidade após inseminação artificial, nenhum deles atingiu índices semelhantes àqueles obtidos com sêmen fresco (Long, 2006). Entretanto, estes protocolos podem ser utilizados para preservar o germoplasma de aves comerciais de elite ou de linhagens com características econômicas desejáveis (Fulton, 2006), bem como de aves em risco ou ameaçadas de extinção.

Entre os crioprotetores mais utilizados para o congelamento do sêmen de aves estão o glicerol e a dimetilacetamida (DMA). (Chalah et al., 1999; Tselutin et al., 1999; Abouelezz et al., 2015; Kowalczyka and Łukaszewicz, 2015; Murugesan and Mahapatra, 2020; Wu et al, 2020; Behnamifar et al., 2021; Tang et al., 2021; Heng et al, 2022; O'Brien et al, 2022; Mehaisen et al, 2022; Polsang et al., 2022; Woelders et al., 2022; Zaniboni et al, 2022; Zong et al., 2022; Hamad et al., 2023; Madeddu et al., 2023).

O glicerol é eficiente em proteger o espermatozoide contra as injúrias sofridas durante o processo de congelamento, entretanto deve ser removido do diluente antes da inseminação artificial, por possuir efeito contraceptivo quando no trato reprodutivo da fêmea (Long e Kulkarni, 2004; Zong et al., 2022; Lin et al., 2023a; Lin et al., 2023b; Lin et al., 2024). O processo de remoção acaba por danificar as estruturas espermáticas, diminuindo o potencial fertilizante da amostra. Já a dimetilacetamida não necessita ser removida após o descongelamento, entretanto pode apresentar citotoxicidade nas etapas iniciais do processo de criopreservação (Zaniboni et al., 2014); por este motivo deve ser adicionada na amostra já refrigerada (Gatti et al., 2021).

Outros crioprotetores já testados para o congelamento de semen de aves são o dimetilsulfóxido (DMSO), a dimetilformamida (DMF), a metilformamida (MF), a metilacetamida (MA), a dietilformamida (DF), o etilenoglicol (EG) e o propilenoglicol (Chalah et al., 1999; Miranda et al, 2017; Murugesan e Mahapatra, 2020; Rakha et al., 2020; Thananurak et al., 2020a; Balusa et al., 2022; Murugesan e Mahapatra, 2022; Petricáková et al, 2022; Polsang et al., 2022; Taskin et al., 2022; Woelders et al., 2022; Zaniboni et al, 2022).

Esta grande variedade de crioprotetores estudados evidencia que, mesmo sob as melhores condições de congelamento, a criopreservação ocasiona danos celulares em diversos graus, sendo que, de um modo geral, mais da metade da população inicialmente viável não resiste às etapas do processo e os espermatozoides remanescentes apresentam comprometimento de suas funções (Parks e Graham, 1992; Watson, 2000). Uma das razões para este declínio da função espermática está associada ao estresse oxidativo: a criopreservação causa um desequilíbrio entre a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante do espermatozoide, ou seja, há um aumento da peroxidação e uma diminuição da atividade antioxidante (Partyka et al., 2012).

A suplementação do diluente com antioxidantes reduz os níveis de estresse oxidativo, aumentando a funcionalidade da membrana, a integridade do acrossoma e a motilidade do sêmen de galos após o descongelamento (Sun et al., 2022b). Por este motivo, vários estudos investigando a ação de diferentes substâncias antioxidantes sobre a função espermática pós-descongelamento foram realizados nos últimos anos (Appiah et al., 2020; Li et al., 2020; Mehaisen et al., 2020; Mehdipour et al., 2020; Najafi et al., 2020a; Najafi et al., 2020b; Thananurak et al., 2020b; Zhandi et al., 2020; Ansari et al, 2021; Leão et al., 2021; Masoudi et al., 2021; Rezaie et al., 2021; Salih et al., 2021; Najafi et al., 2022; Nazari et al, 2022; Siari et al., 2022; Sun et al., 2022a; Alipour-Jenaghard et al., 2023a, Alipour-Jenaghard et al., 2023b; Díaz Ruiz et al, 2023; Najafi et al, 2024). Substâncias antioxidantes também podem ser adicionadas às dietas ministradas aos machos (Kamrani et al., 2021; Raei et al., 2022; Sabzian-Melei et al., 2022).

A criopreservação espermática é uma biotecnologia reprodutiva que pode auxiliar no ganho genético em aviários de produção de matrizes, pois maximiza o uso de animais de alto valor zootécnico, permitindo tanto a difusão de seu material, quanto a sua conservação em longo prazo. Esta tecnologia também é de interesse para a reprodução assistida de aves selvagens que estão em risco ou ameaçadas de extinção. A grande quantidade de estudos realizada até o momento, com diversos crioprotetores e protocolos, evidencia o maior desafio na preservação do sêmen de aves: encontrar uma metodologia de criopreservação que permita taxas de fertilidade mais próximas àquelas obtidas com sêmen fresco,

viabilizando sua aplicação e repetibilidade.

Referências

- Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Campo JL, Santiago-Moreno J.** Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reprod Dom Anim*, vol 50, p.135–141, 2015.
- Alipour-Jenaghard P, Daghigh-Kia H, Masoudi R.** Preservation of the quality and fertility potential of post-thawed rooster sperm using MitoQ. *Theriogenology*, vol 208, p.165-170, 2023.
- Alipour-Jenaghard P, Daghigh-Kia H, Masoudi R, Moghaddam G, Qasemi-Panahi B.** Mitochondria-targeted antioxidant "MitoQ" improves rooster's cooled sperm quality indicators and reproductive performance. *Theriogenology*, vol 197, p.26-30, 2022.
- Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Akhter A, Blesbois E, Santiago-Moreno J.** Effect of glutathione on pre and post-freezing sperm quality of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology*. Vol 172, p.73-79, 2021.
- Appiah MO, Li W, Zhao J, Liu H, Dong Y, Xiang J, Wang J, Lu W.** Quercetin supplemented casein-based extender improves the post-thaw quality of rooster semen. *Cryobiology*, vol 94, p.57-65, 2020.
- Balusa P, Bommu S, Murugesan S.** Effect of betaine and raffinose in cryopreservation medium on fertility in Kadaknath Chicken. *Cryo Letters*, vol 43(5), p.283-288, 2022.
- Behnamifar A, Bernal B, Torres O, Luis-Chincoya H, Gil MG, García-Casado P, Rahimi S, Woelders H, Santiago-Moreno J.** Research Note: Evaluation of two methods for adding cryoprotectant to semen and effects of bovine serum albumin on quality characteristics of cryopreserved rooster spermatozoa. *Poult Sci*, vol 100(6), p.101093, 2021.
- Bakst MR, Cecil HC.** Research Note: Effects of agitation and temperature changes on turkey sperm viability after twenty-four hour storage. *Poult Sci*, vol 71, p. 395-397, 1992.
- Blesbois E.** Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. *J Poult Sci*, vol 49, p.141-149, 2012.
- Bootwalla SM, Miles RD.** Development of diluents for domestic fowl semen. *W Poult Sci J*, vol 48, p.121-128, 1992.
- Burrows WH, Quinn JP.** A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poult Sci*, vol 14, p.251-254, 1935.
- Burrows WH, Quinn JP.** The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult Sci*, vol 16(1), p.19-24, 1937.
- Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP.** *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology*, vol 39, p.185-191, 1999.
- Chelmonska B, Jerysz A, Lukaszewicz E, Kowalczyk A, Malecki I.** Semen collection from Japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. *Turk J Vet Anim Sci*, vol 32(1), p.19-24, 2008.
- Díaz Ruiz E, González Ariza A, León Jurado JM, Arando Arbulu A, Bermúdez Oria A, Fernández Prior Á, Delgado Bermejo JV, Navas González FJ.** Discriminant Analysis and Data Mining CHAID Decision Tree as Tools to Evaluate the Buffering Effect of Hydroxytyrosol on Reactive Oxygen Species in Rooster Sperm Cryopreservation. *Animals*, vol 13, 3079, 2023.
- Fulton JE.** Avian Genetic Stock Preservation: An Industry Perspective. *Poult Sci*, vol 85, p.227-231, 2006.
- Gatti NLS, Corcini CD, Filho JS, Soares SL, Anciuti AN, Barbosa RM, Knabah NW, Tavares AT, Bongalhardo DC, Varela Junior AS.** Dimethylacetamide in rooster semen cryopreservation. *Cryo Letters*, vol 42(1), p.39-43, 2021.
- Góes PAA.** *Características reprodutivas de emas macho (Rhea americana) criadas em cativeiro no estado de São Paulo*. 2004. 79p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.
- Hamad SK, Elomda AM, Sun, Y, Li Y, Zong Y, Chen J, Abbas AO, Stino FKR, Nazmi A, Mehaisen GMK.** The *in vitro* evaluation of rooster semen pellets frozen with Dimethylacetamide. *Animals*, vol 13, 1603, 2023.
- Heng N, Zhao Z, Guo Y, Gao S, Cai D, Fu B, Sheng X, Wang X, Xing K, Xiao L, Long C, Ni H, Zhu H, Qi X.** RhoA improves cryopreservation of rooster sperm through the Rho/RhoA-associated kinase/cofilin pathway. *Poult Sci*, vol 101(10), 102051, 2022.
- Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, vol 53, p.47-58, 2000.
- Janosikova M, Petricakova K, Ptacek M, Savvulidi FG, Rychtarova J, Fulka J.** New approaches for

- long-term conservation of rooster spermatozoa. *Poult Sci*, vol 102(2), 102386, 2023
- Kamrani N, Karimi A, Nazari M, Masoudi R.** Modulation of negative effects of physiological stress on frozen-thawed semen with nutrition of organic selenium in Ross 308 rooster. *Arch Razi Inst*, vol 76 (6), p.1787-1795, 2021.
- Kowalczyk A, Łukaszewicz E.** Simple and effective methods of freezing Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) semen. *PLoS ONE*, vol 10(1), e0116797, 2015.
- Leão APA, Souza AV, Mesquita NF, Pereira LJ, Zangeronimo MG.** Antioxidant enrichment of rooster semen extenders - A systematic review. *Res Vet Sci*, vol 136, p.111-118, 2021.
- Leite MAS, Viveiros ATM.** *Coleta de sêmen e inseminação artificial em galinhas*. Boletim Técnico n. 71, 19p. Ed. UFLA, Lavras, MG, 2007.
- Li W, Appiah MO, Zhao J, Liu H, Wang J, Lu W.** Effects of k-carrageenan supplementation or in combination with cholesterol-loaded cyclodextrin following freezing-thawing process of rooster spermatozoa. *Cryobiology*, vol 95, p.36-43, 2020.
- Lin HH, Grasseau I, Mermillod P, Chen L, Blesbois E, Carvalho AV.** A simple and fast alternative method to remove glycerol from chicken semen after cryopreservation. *Cryobiology*, vol 112, 104567, 2023a.
- Lin HH, Mermillod P, Grasseau I, Brillard JP, Gérard N, Reynaud K, Chen L, Blesbois E, Carvalho AV.** Is glycerol a good cryoprotectant for sperm cells? New exploration of its toxicity using avian model. *Anim Repr Sci*, vol 258, 107330, 2023b.
- Lin HH, Mermillod P, Grasseau I, Blesbois E, Carvalho AV.** Exploring how sucrose-colloid selection improves the fertilizing ability of chicken sperm after cryopreservation with glycerol. *Poult Sci*, vol 103(3), 103448, 2024.
- Long JA.** Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poult Sci*, vol 85, p.232-236, 2006.
- Long JA, Kulkarni G.** An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poult Sci*, vol 83, p.1594-1601, 2004.
- Madeddu M, Zaniboni L, Marelli SP, Comazzi S, Cerolini S.** Flow cytometry data on the effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide used at different concentrations on the quality of cryopreserved chicken semen. *Data in Brief*, vol 47, 108916, 2023.
- Masoudi R, Asadzadeh N, Sharafi M.** Effects of freezing extender supplementation with mitochondria-targeted antioxidant Mito-TEMPO on frozen-thawed rooster semen quality and reproductive performance. *Anim Reprod Sci*, vol 225, 106671, 2021.
- Mehaisen GMK, Partyka A, Ligockab Z, Nizańskib W.** Cryoprotective effect of melatonin supplementation on postthawed rooster sperm quality. *Anim Reprod Sci*, vol 212, 106238, 2020.
- Mehaisen GMK, Elomda AM, Hamad SK, Ghaly MM, Sun Y, Li Y, Zong Y, Chen J, Partyka A, Nazmi A, Abbas AO, Stino FKR.** Effect of Dimethylacetamide concentration on motility, quality, antioxidant biomarkers, anti-freeze gene expression, and fertilizing ability of frozen/thawed rooster sperm. *Animals*, vol 12, 2739, 2022.
- Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Mohammadi H, Álvarez-Rodríguez M.** Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. *PLoS ONE*, vol 15(10), e0241105, 2020.
- Miranda M, Kulíková B, Vašíček J, Olexiková L, Iaffaldano N, Chrenek P.** Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. *Reprod in Dom Anim*, vol 53(1), p.93-100, 2017.
- Murugesan S, Mahapatra R.** Cryopreservation of Ghagus chicken semen: Effect of cryoprotectants, diluents and thawing temperature. *Reprod Domest Anim*, vol 55(8), p.951-957, 2020.
- Murugesan S, Mahapatra R.** Effect of permeable cryoprotectants and dextran in cryopreserving semen of broiler breeder lines. *Braz Arch of Biol and Tech*, vol 65, e22210056, 2022.
- Najafi A, Kia HD, Mehdipour M, Hamishehkar H, Álvarez-Rodríguez M.** Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. *Theriogenology*, vol 152, p.122-128, 2020a.
- Najafi A, Daghigh-Kia H, Mehdipour M, Mohammadi H, Hamishehkar H.** Comparing the effect of rooster semen extender supplemented with gamma-oryzanol and its nano form on post-thaw sperm quality and fertility. *Poult Sci*, vol 101(3), 101637, 2022.
- Najafi A, Mohammadi H, Sharifi D, Rahimi A.** Apigenin supplementation substantially improves rooster sperm freezability and post-thaw function. *Scientific Reports*, vol 14, 4527, 2024.
- Najafi D, Taheri RA, Najafi A, Shamsollahi M, Alvarez-Rodríguez M.** Effect of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. *Poult Sci*, vol 99, p.1678-1686, 2020b.

- Nazari M, Daghigh-Kia H, Mehdipour M, Najafi A.** Comparison of the performance of targeted mitochondrial antioxidant mitoquinone and non-targeted antioxidant pentoxifylline in improving rooster sperm parameters during freezing and thawing. *Poult Sci*, vol 101(9), 102035, 2022.
- O'Brien E, Castaño C, Toledano-Díaz A, Caamaño JN, Hidalgo C, Fidalgo LE, López-Beceiro AM, Esteso MC, Balsera R, García-Casado P, Lukaszewicz E, Santiago-Moreno J.** Use of native chicken breeds (*Gallus gallus domesticus*) for the development of suitable methods of Cantabrian capercaillie (*Tetrao urogallus cantabricus*) semen cryopreservation. *Vet Med Sci*, vol 8(3), p.1311-1318, 2022.
- Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, vol 38, p.209-222, 1992.
- Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W.** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, vol 77, p.1497-1504, 2012.
- Partyka A, Nizański W.** Advances in storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci*, vol 246, 106921, 2022.
- Peixoto JV.** Particularidades da reprodução de aves silvestres. *Rev Bras Reprod Anim*, vol 47(2), p.220-225, 2023.
- Pellatt EJ, Birkhead TR.** Ejaculate size in zebra finches *Taeniopygia guttata* and a method for obtaining ejaculates from passerine birds. *Ibis*, vol 136 (1), p.97-101, 1994.
- Pereira RJG, Blank MH.** Desafios e atualidades no emprego de técnicas de reprodução assistida em aves selvagens. *Rev Bras Reprod Anim*, vol 41(1), p.237-242, 2017.
- Petricáková K, Janošíková M, Ptáček M, Zita L, Savvulidi FG, Partyka A.** Comparison of commercial poultry semen extenders modified for cryopreservation procedure in the Genetic Resource Program of Czech Golden Spotted Hen. *Animals*, vol 12, 2886, 2022.
- Polsang S, Thananurak P, Polsang P, Inchaya S, Ponchunchoovong S, Chapanya J, Kunhareang S, Vongpralub T.** Effects of extenders and cryoprotectants on cryopreservation of Thai red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) spermatozoa. *Cryobiology*, vol 106, p.48-54, 2022.
- Raei H, Torshizi MAK, Sharafi M, Ahmadi H.** Sperm flow cytometric parameters, antioxidant status, and testicular histomorphology in roosters fed diets supplemented with camphor. *Poult Sci*, vol 101(9), 102014, 2022.
- Rakha BA, Ansari MS, Akhter S, Akhter A, Blesbois E, Santiago-Moreno J.** Effect of dimethylformamide on sperm quality and fertilizing ability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology*, vol 149, p.55-61, 2020.
- Rezaie FS, Hezavehei M, Sharafi M, Shahverdi A.** Improving the post-thaw quality of rooster semen using the extender supplemented with resveratrol. *Poult Sci*, vol 100(9), 101290, 2021.
- Sabzian-Melei R, Zare-Shahneh A, Zhandi M, Yousefi AR, Rafeian-Naeini HR.** Effects of dietary supplementation of different sources and levels of selenium on the semen quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. *Poult Sci*, vol 101(10), 101908, 2022.
- Salih SA, Daghigh-Kia H, Mehdipour M, Najafi A.** Does ergothioneine and thawing temperatures improve rooster semen post-thawed quality? *Poult Sci*, vol 100(10), 101405, 2021.
- Samour HJ, Spratt DMJ, Hutton RE, Jones DM.** Studies on semen collection in waterfowl by electrical stimulation. *Br. Vet. J.*, vol 141(3), p.265-268, 1985.
- Siari S, Mehri M, Sharafi M.** Supplementation of Beltsville extender with quercetin improves the quality of frozen-thawed rooster semen. *Br Poult Sci*, vol 63(2), p.252-260, 2021.
- Sun L, He M, Xu J, Wu C, Zhang S, Zhang D, Dai J, Gao J.** Does Antioxidant Mitoquinone (MitoQ) Ameliorate Oxidative Stress in Frozen-Thawed Rooster Sperm? *Animals*, vol 12, 3181, 2022a.
- Sun Y, Li Y, Zong Y, Mehaisen GMK, Chen J.** Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges. *J of Anim Sci and Biotech*, vol 13, 115, 2022b.
- Tang M, Cao J, Yu Z, Liu H, Yang F, Huang S, He J, Yan H.** New semen freezing method for chicken and drake using dimethylacetamide as the cryoprotectant. *Poult Sci*, vol 100(8), 101091, 2021.
- Taskin A, Ergun F, Karadavut U, Ergun D.** Effect of different extenders on sperm motility and vitality in goose semen cryopreservation. *Braz J of Poult Sci*, vol 24(3), e1429, 2020.
- Thananurak P, Chuaychu-Noo N, Phasuk Y, Vongpralub T.** Comparison of TNC and standard extender on post-thaw quality and in vivo fertility of Thai native chicken sperm. *Cryobiology*, vol 92, p.197-202, 2020a.
- Thananurak P, Chuaychu-Noo N, Thélie A, Phasuk Y, Vongpralub T, Blesbois E.** Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. *Poult Sci*, vol 99(2), p.1185-1198, 2020b.
- Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E.** Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult Sci*, vol 78, p.586-590, 1999.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, vol 61, p.481-

492, 2000.

Woelders H, de Wit AAC, Engel B, Hulsege B, Grasseau I, Blesbois E, Bernal B, Santiago-Moreno J. Freezing chicken semen: Influence of base medium osmolality, cryoprotectants, cryoprotectant concentration, and cooling rate on post-thaw sperm survival. *Cryobiology*, vol 108, p.67-77, 2022.

Wu BX, Yang XH, Yan HF. Improving the quality of rooster semen frozen in straws by screening the glycerol concentration and freezing rate. *Br Poult Sci*, vol 61(2), p.173-179, 2020.

Zaniboni L, Cassinelli C, Mangiagalli MG, Gliozzi TM, Cerolini S. Pellet cryopreservation for chicken semen: effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology*, vol 82, p.251-258, 2014.

Zaniboni L, Madeddu M, Mosca F, Sayed AA, Marelli SP, Di Iorio M, Iaffaldano N, Cerolini S. Concentration dependent effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of cryopreserved chicken semen. *Cryobiology*, vol 106, p.66-72, 2022.

Zhandi M, Seifi-Ghajalo E, Shakeri M, Yousefi AR, Sharafi M, Seifi-Jamadi A. Effect of glutathione supplementation to semen extender on post-thawed rooster sperm quality indices frozen after different equilibration times. *Cryo Letters*, vol 41(2), p.92-99, 2020.

Zong Y, Sun Y, Li Y, Mehaisen GMK, Yuan J, Ma H, Ni A, Wang Y, Hamad SK, Elomda AM, Abbas AO, Chen J. Effect of glycerol concentration, glycerol removal method, and straw type on the quality and fertility of frozen chicken semen. *Poult Sci*, vol 101(6), 101840, 2022.
