



Produção e preservação do sêmen de galos

Production and preservation of rooster semen

D.C. Bongalharo

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Correspondência: denisecb@ufpel.edu.br

Resumo

A seleção de reprodutores capazes de transmitir características de valor econômico para a progênie é fundamental para o sucesso da indústria de aves. Nesse sentido, os machos devem produzir sêmen de boa qualidade, com volume e concentração adequados. O ejaculado de galos é composto por uma grande quantidade de células espermáticas suspensas em um pequeno volume de plasma seminal, proveniente dos túbulos seminíferos. Por esse motivo, a adição de diluentes ao sêmen é uma prática de rotina nos estabelecimentos que realizam inseminação artificial, com a finalidade de aumentar o aproveitamento do ejaculado. A diluição também permite manter a qualidade do sêmen por várias horas, quando resfriado, ou por períodos mais longos, quando congelado. Para a manutenção da capacidade fertilizante do sêmen resfriado, substratos energéticos e agentes tampões devem ser incluídos no diluente. Para diminuir os danos sofridos pelos espermatozoides durante o congelamento, crioprotetores são adicionados ao sêmen. Entre eles, a dimetilacetamida vem sendo o mais utilizado nos protocolos para o congelamento de sêmen de galos nos últimos anos. A modulação lipídica do espermatozoide, por meio de dietas ou por adição de gema de ovo ou de seus derivados ao diluente, também auxilia na preservação do sêmen. Os benefícios são ainda maiores quando antioxidantes são incluídos.

Palavras-chave: concentração espermática, crioprotetores, diluentes, fertilidade, inseminação artificial, volume de sêmen.

Abstract

Selecting breeders capable of transmit characteristics of economic value to the offspring is fundamental to poultry industry success. In this sense, males must produce good quality semen, with appropriate volume and concentration. Rooster ejaculates are composed of a great amount of sperm cells suspended in a small volume of seminal plasma, originated in the seminiferous tubules. For this reason, adding diluents to semen is a common practice in artificial insemination establishments, aiming to increase ejaculate use. Dilution also allows semen quality maintenance for hours, when refrigerated, or for longer periods, when frozen. To keep fertilizing capacity of refrigerated sperm, energetic substrates and buffer agents must be included into the diluents. To decrease sperm damage during freezing, cryoprotectants are added to the semen. Among them, dimethylacetamide has been the most used in freezing protocols for rooster semen in the last years. Sperm lipid modulation, by dietary means or by adding egg yolk or its derivatives to the diluents, also helps in semen preservation. Benefits are improved when antioxidants are included.

Keywords: artificial insemination, cryoprotectants, diluents, fertility, sperm concentration, sperm volume.

Introdução

Uma das metas da indústria de aves é a produção de progênie de alta qualidade: tanto no setor de aves de corte quanto no de postura, cada pinto produzido possui grande valor econômico. Para atingir essa meta, é necessário selecionar reprodutores capazes de transmitir características de relevância comercial para seus descendentes (Amann, 1999). Nesse processo, a seleção dos machos torna-se extremamente importante, visto que, no período de um ano, um único galo pode gerar uma progênie muito maior do que uma fêmea. Desta forma, a seleção de um pequeno número de machos com alto potencial genético é eficiente para melhorar a qualidade dos pintos produzidos (Hammerstedt, 1999).

Para que possam transmitir características de valor econômico para a progênie, os galos devem, necessariamente, produzir sêmen de boa qualidade. O uso da inseminação artificial proporciona um melhor aproveitamento desse sêmen, podendo aumentar em até 10 vezes o número de pintos produzidos em relação à monta natural (Amann, 1999). A utilização de sêmen refrigerado ou congelado, por sua vez, torna a prática da inseminação mais flexível, aumentando sua aplicabilidade e diminuindo ainda mais os custos da produção de pintinhos (Blesbois e Hermier, 1990; Blesbois e Grasseau, 1998).

A seguir serão abordados alguns aspectos da produção e da preservação do sêmen de galos.



Produção de sêmen

O aparelho reprodutor dos galos é composto por um par de testículos, localizados no interior da cavidade abdominal, pelos epidídimos, formados por uma série de ductos, e pelos ductos deferentes, que acompanham o trajeto dos ureteres e abrem-se numa papila na cloaca (Whittow, 2000; Rutz et al., 2006). Devido à localização interna dos testículos das aves, a espermatogênese ocorre em temperaturas mais elevadas do que nos mamíferos. A duração da espermatogênese é de aproximadamente duas semanas e os espermatozoides são liberados na luz dos túbulos seminíferos juntamente a um fluido proveniente desses túbulos. Nos epidídimos, onde as células permanecem por mais de 100 min, ocorre uma grande reabsorção de líquidos, resultando na formação do plasma seminal e na concentração do sêmen. Os ductos deferentes são os reservatórios extragonadais de espermatozoides, que podem permanecer no local por mais de 22 h antes da ejaculação (Ritchson, 2013).

Devido à ausência de glândulas acessórias, o ejaculado é composto por uma grande quantidade de células espermáticas suspensas em um pequeno volume de plasma seminal (Whittow, 2000). Desse modo, a concentração do sêmen de galos pode variar de um a cinco bilhões de espermatozoides por mL de ejaculado.

O volume de sêmen produzido depende da linhagem do macho (de um modo geral, galos de linhagens leves produzem maior volume do que galos de linhagens pesadas), podendo-se obter volumes de 0,1 a 1,0 mL. Dentro da mesma linhagem, os galos maiores tendem a produzir um maior volume de sêmen, visto que o volume depende do tamanho do testículo que, por sua vez, está correlacionado com o peso corporal (Etches, 1996). Além disso, o volume ejaculado pode ser afetado pela técnica de coleta utilizada, pela experiência do coletor e por variações no manejo da ave (como, por exemplo, estresse, fornecimento de água e temperatura ambiente).

A concentração espermática e o volume do ejaculado são importantes para determinar o número de fêmeas que podem ser inseminadas por um único macho (para sêmen fresco, utiliza-se a dose inseminante de 100 milhões de espermatozoides); entretanto, a avaliação funcional do gameta também é necessária no momento de selecionar um reprodutor. Um sêmen de boa qualidade deve apresentar um número de células vivas com morfologia normal maior ou igual a 90% e motilidade espermática maior ou igual a 80% (Bakst e Long, 2010).

Preservação de sêmen

A diluição do sêmen é uma prática de rotina nos estabelecimentos que usam a inseminação artificial, visto que maximiza o uso do ejaculado e permite manter a qualidade do sêmen por algumas horas (Donoghue e Wishart, 2000). Soluções salinas simples são suficientes para preservação do sêmen por uma hora à temperatura ambiente. Para manutenção do sêmen diluído por mais tempo, substratos energéticos (o principal para sêmen de aves é a frutose) e agentes tampões devem ser adicionados ao diluente (Bootwalla e Miles, 1992; Christensen, 1995). Desta forma, o sêmen pode ser utilizado no dia posterior à coleta, desde que mantido refrigerado (5°C). Após esse período, haverá diminuição da fertilidade (Bakst e Cecil, 1992).

Quando estocado *in vivo*, nas glândulas hospedeiras de espermatozoides da fêmea, a célula espermática é capaz de manter sua capacidade fertilizante por várias semanas (Bakst e Cecil, 1992). Mecanismos para estabilização das membranas e inibição da motilidade e da atividade enzimática provavelmente auxiliem na preservação do gameta masculino dentro dessas glândulas. A sobrevivência do espermatozoide nas glândulas hospedeiras também pode ser dependente da modulação lipídica de sua membrana; é possível que vesículas membranosas, semelhantes a lipossomas, liberadas das microvilosidades das células epiteliais glandulares, contribuam para a manutenção da membrana plasmática do espermatozoide (Bakst, 1993). A diluição do sêmen em um meio que reproduza as condições encontradas pelos espermatozoides nas glândulas hospedeiras aumentará sua capacidade de preservação *in vitro*.

Um componente comumente utilizado em diluentes de sêmen é a gema do ovo, que é rica em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), cujos principais fosfolípidios são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina (Anton et al., 2003). Esses fosfolípidios são os mesmos encontrados, em grande quantidade, nas membranas dos espermatozoides de aves (Blesbois et al., 1997a, b; Cerolini et al., 1997; Kelso et al., 1997 a, b; Bongalhardo et al., 2002). As propriedades protetoras da gema do ovo são atribuídas ao seu conteúdo de LDL; possivelmente a membrana do espermatozoide incorpore fosfolípidios e colesterol dessas lipoproteínas (Bergeron et al., 2004). Neste sentido, foi observado que a adição de proteolipossomas ricos em fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina ao diluente para sêmen de galos promoveu incrementos na motilidade e na viabilidade do espermatozoide após quatro horas de armazenamento à temperatura ambiente (Bongalhardo e Buhr, 2002).

A incorporação de lípidios na membrana do espermatozoide também pode ser feita por meio da alimentação. A inclusão de óleos ricos em ômega-3 na dieta promove aumento da viabilidade espermática e da fertilidade do sêmen fresco. Os óleos de peixe e de linhaça são os mais utilizados para a modificação do espermatozoide de aves (Blesbois et al., 1997a, b; Cerolini et al., 1997, 2005; Kelso et al., 1997a, b; Bongalhardo et al., 2009).

A diminuição da fertilidade do sêmen armazenado é ainda mais drástica quando o sêmen é



criopreservado (Bakst e Sexton, 1979; Hammerstedt, 1995). Cristais de gelo são formados durante os processos de congelamento e descongelamento, causando danos na membrana espermática (Maeda et al., 1986). A criopreservação também aumenta a peroxidação lipídica, danificando ainda mais a membrana. Em consequência, há uma diminuição da motilidade, da viabilidade e da integridade morfológica do espermatozoide (Mahapatra et al., 1994), bem como da habilidade em hidrolisar a membrana perivitelina interna do ovo (Alexander et al., 1993; Donoghue, 1996). A adição de antioxidantes ao diluente de congelamento, ou na dieta das aves, pode reduzir a peroxidação e melhorar a qualidade do sêmen descongelado (Zaniboni et al., 2006; Partyka et al., 2011, 2012). Os principais antioxidantes naturalmente encontrados no sêmen de aves são as vitaminas E e C, a glutatona e as enzimas glutatona peroxidase e superóxido dismutase, enquanto aqueles mais comumente adicionados são o selênio orgânico e a vitamina E (Surai, 2003; Cerolini et al., 2005).

A formação de cristais de gelo é afetada pelas curvas de congelamento utilizadas (rápido ou lento), bem como pelo crioprotetor adicionado ao diluente. O tamanho e o local de maior formação (dentro ou fora da célula) dos cristais de gelo determinam o grau de prejuízo à membrana (Tselutin et al., 1995; Wishart, 1997). Por muitos anos, o glicerol foi o crioprotetor de eleição para o congelamento de sêmen de galos, por ser mais efetivo no que se refere à proteção da célula espermática (Maeda et al., 1984; Donoghue e Wishart, 2000). Entretanto, o glicerol apresenta um efeito contraceptivo quando no trato da fêmea e deve ser removido antes da inseminação, o que causa danos ao espermatozoide (Buss, 1993; Gill et al., 1996). O efeito contraceptivo do glicerol pode estar relacionado com o choque osmótico que ocorre dentro do oviduto; provavelmente o influxo de água na célula hiperosmótica seja mais rápido que o efluxo de glicerol, provocando o rompimento da membrana espermática (Lake e Ravie, 1984; Hammerstedt e Graham, 1992). Portanto, a remoção do glicerol é fundamental para que se obtenha fertilidade. A remoção pode ser feita por centrifugação em gradiente de densidade de Percoll, por diálise ou por lavagem com Accudenz, porém a fertilidade obtida ainda é baixa quando comparada àquela alcançada com sêmen fresco (Van Voorst e Leenstra, 1995; Iaffaldano e Meluzzi, 2003; Long e Kulkarni, 2004; Purdy et al., 2009).

Nos últimos anos, a dimetilacetamida (DMA) passou a ser uma boa alternativa para o congelamento de sêmen de aves. Esse crioprotetor não precisa ser removido antes da inseminação e apresenta fertilidade comparável àquela obtida com sêmen fresco quando um protocolo com curva de congelamento rápido é utilizado (Chalah et al., 1999). Desta forma, observa-se um aumento na porcentagem de espermatozoides viáveis em comparação com os protocolos de congelamento lento com DMA (Blanco et al., 2000). A diminuição do tempo para o congelamento facilita grandemente a rotina do laboratório e é outra vantagem em relação ao uso do glicerol, que necessita de curva de congelamento lento para ser efetivo.

Outra diferença entre os dois crioprotetores é a forma como o sêmen é armazenado. Nos protocolos com glicerol, o sêmen é colocado em palhetas, enquanto nos protocolos com DMA, o sêmen é armazenado na forma de *pellets*: gotas de sêmen são pipetadas diretamente no nitrogênio líquido, formando os *pellets*, que são recolhidos e armazenados em criotubos (Tselutin et al., 1999). Essa forma de armazenamento é mais utilizada, visto que as palhetas, quando lançadas diretamente no nitrogênio líquido, não resistem ao choque térmico e tendem a se romper. Esse problema pode ser solucionado pelo congelamento em dois passos: as palhetas são colocadas inicialmente no vapor de nitrogênio (em grade posicionada 1cm acima do nitrogênio), onde permanecem por um minuto antes de serem imersas no nitrogênio líquido (Van der Laan, 2007).

Vários outros crioprotetores já foram utilizados para o congelamento do sêmen de galos, mas foram menos efetivos em preservar a qualidade do espermatozoide. O dimetilsulfóxido (DMSO), por exemplo, quando comparado com o glicerol e com o DMA, sempre causou maior toxicidade para a célula (Tselutin et al., 1999; Donoghue e Wishart, 2000).

Considerações finais

Atualmente, a prática de rotina nos estabelecimentos que utilizam a inseminação artificial é usar o sêmen dentro de algumas horas após a coleta e a diluição, embora a fertilidade seja mantida por até 24 horas, quando o sêmen é refrigerado. A preservação de sêmen na forma congelada ainda não apresenta vantagens para uso industrial, visto que os protocolos desenvolvidos até o momento não são capazes de reproduzir as taxas de fertilidade obtidas com sêmen fresco.

A habilidade de preservar o sêmen de galos por períodos longos seria benéfica não somente para aumentar o potencial de uso da inseminação artificial, mas também pela perspectiva de comercializar o sêmen de animais com alto potencial genético e valor econômico (Bakst e Cecil, 1992).

Ao longo dos anos, vários estudos foram (e continuam sendo) conduzidos na tentativa de encontrar um protocolo eficiente para criopreservação de sêmen de galos e, embora existam vários relatos de sucesso, nenhum deles é viável economicamente para a indústria de aves. Entretanto, esses protocolos podem ser utilizados para a formação de bancos de genes, especialmente para a preservação do germoplasma de aves comerciais de elite ou de linhagens especializadas (Fulton, 2006).



Referências

- Alexander A, Graham J, Hammerstedt RH, Barbato GF.** Effects of genotype and cryopreservation of avian semen on fertility and number of perivitelline spermatozoa. *Br Poult Sci*, v.34, p.757-764, 1993.
- Amann RP.** Symposium: Managing poultry reproduction to satisfy market demands - Introduction and dedication. *Poult Sci*, v.78, p.412-413, 1999.
- Anton M, Martinet V, Dagalarrondo M, Beaumal V, David-Briand E, Rabesona H.** Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem*, v.83, p.175-183, 2003.
- Bakst MR.** Oviducal sperm storage in poultry: a review. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.595-599, 1993.
- Bakst M, Cecil H.** Effect of modifications of semen diluent with cell culture serum replacements on fresh and stored turkey semen quality and hen fertility. *Poult Sci*, v.71, p.754-764, 1992.
- Bakst MR, Long JA.** Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. 2nd ed. Buffalo, MN: The Midwest Poultry Federation, 2010.
- Bakst MR, Sexton TJ.** Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing. *J Reprod Fertil*, v.55, p.1-7, 1979.
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P.** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Blanco JM, Gee G, Wildt DE, Tselutin K, Donoghue AM.** Semen cryopreservation in poultry and non-domestic species: a comparative approach to understanding the fundamentals of avian spermatozoa cryobiology. *Br Poult Sci*, v. 41, suppl.1, p.S6-S7, 2000. Abstract.
- Blesbois E, Grasseau I.** Effects of *in vitro* storage (48 h at 2-5°C) on the lipid content of fowl semen. *Int Symp Spermatol*, v. 8, p.117, 1998. Abstract.
- Blesbois E, Hermier D.** Effects of high-density lipoproteins on storage at 4°C of fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.90, p.473-482, 1990.
- Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM, Hermier D.** Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod*, v.56, p.1216-1220, 1997a.
- Blesbois E, Lessire M, Hermier D.** Effect of cryopreservation and diet on lipids of fowl sperm and fertility. *Poult Avian Biol Rev*, v.8, p.149-154, 1997b.
- Bongalhardo DC, Buhr MM.** Proteoliposomes improve rooster sperm function. In: Annual Meeting of the Poultry Science Association, 91, 2002, Newark, Delaware. Proceedings... Newark, Delaware: Poultry Science Association, 2002. p.106-107. Abstract.
- Bongalhardo DC, Leeson S, Buhr MM.** Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. *Poult Sci*, v.88, p.1060-1069, 2009.
- Bongalhardo DC, Somnapan-Kakuda N, Buhr MM.** Isolation and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. *Poult Sci*, v.81, p.1877-1883, 2002.
- Bootwalla SM, Miles RD.** Development of diluents for domestic fowl semen. *World's Poult Sci J*, v.48, p.121-128, 1992.
- Buss EG.** Cryopreservation of rooster sperm. *Poult Sci*, v.72, p.944-954, 1993.
- Cerolini S, Kelso KA, Noble RC, Speake BK, Pizzi F, Cavalchini LG.** Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol Reprod*, v.57, p.976-980, 1997.
- Cerolini S, Surai PF, Speake BK, Sparks NH.** Dietary fish and evening primrose oil with vitamin E effects on semen variables in cockerels. *Br Poult Sci*, v.46, p.214-222, 2005.
- 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*, v.39, p.185-191, 1999.
- Christensen VL.** Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. In: International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, 1, 1995, Savoy, IL. Proceedings... Savoy, IL: Poultry Science Association, 1995. p.90-106.
- Donoghue AM.** The effect of twenty-four hour *in vitro* storage on sperm hydrolysis through the perivitelline layer of ovipositioned turkey eggs. *Poult Sci*, v.75, p.1035-1038, 1996.
- Donoghue AM, Wishart GJ.** Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.213-232, 2000.
- Etches RJ.** Reproduction in poultry. Cambridge, UK: CAB International, 1996.
- Fulton JE.** Avian Genetic Stock Preservation: An Industry Perspective. *Poult Sci*, v.85, p.227-231, 2006.
- Gill SPS, Buss EG, Mallis RJ.** Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poult Sci*, v.75, p.254-256, 1996.
- Hammerstedt RH.** Cryopreservation of poultry semen - Current status and economics. In: International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, 1, 1995, Savoy, IL. Proceedings... Savoy, IL: Poultry Science Association, 1995. p.229-250.
- Hammerstedt RH.** Symposium summary and challenges for the future. *Poult Sci*, v.78, p.459-466, 1999.



- Hammerstedt RH, Graham JK.** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-38, 1992.
- Iaffaldano N, Meluzzi A.** Effect of dialysis on quality characteristics of turkey semen during liquid storage. *Theriogenology*, v.60, p.421-427, 2003.
- Kelso KA, Cerolini S, Noble RC, Sparks NHC, Speake BK.** The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. *Comp Biochem Physiol*, v.118B, p.65-69, 1997a.
- Kelso KA, Cerolini S, Speake BK, Cavalchini LG, Noble RC.** Effects of dietary supplementation with α -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *J Reprod Fertil*, v.110, p.53-59, 1997b.
- Lake PE, Ravie O.** An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br Poult Sci*, v.25, p.145-150, 1984.
- Long JA, Kulkarni G.** An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poult Sci*, v.83, p.1594-1601, 2004.
- Maeda T, Terada T, Tsutsumi Y.** Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. *Br Poult Sci*, v.25, p.547-553, 1984.
- Maeda T, Terada T, Tsutsumi Y.** Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing. *Br Poult Sci*, v.27, p.695-702, 1986.
- Mahapatra PS, Mohanty BP, Bisoi PC, Mishra SC, Nayak NR, Mishra MS.** Effect of storage on the physical and biochemical parameters of broiler semen. *Indian J Poult Sci*, v.29, p.146-150, 1994.
- Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W.** Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, v.77, p.1497-1504, 2012.
- Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W, Twardon J.** Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C(11)-BODIPY(581/591). *Theriogenology*, v.75, p.1623-1629, 2011.
- Purdy PH, Song Y, Silversides FG, Blackburn HD.** Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poult Sci*, v.88, p.2184-2191, 2009.
- Ritchison G.** Avian reproduction: anatomy & the bird egg. Disponível em: <http://people.eku.edu/ritchison/avianreproduction.html>. Acessado em: 06 fev. 2013.
- Rutz F, Anciuti MA, Pan EA.** Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. 2006. 93f. Apostila (Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia, Pelotas, RS, 2006.
- Surai PF.** Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Thrupptom, Nottingham: University Press, 2003.
- Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T, Tur B.** Cryopreservation of poultry semen. *Br Poult Sci*, v.36, p.805-811, 1995.
- Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E.** Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult Sci*, v.78, p.586-590, 1999.
- Van der Laan GM.** Criopreservação de sêmen de galos. 2007. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Pelotas, RS, 2007.
- Van Voorst A, Leenstra FR.** Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. *Poult Sci*, v.74, p.141-146, 1995.
- Whittow GC.** *Sturkie's avian physiology*. 5.ed. San Diego, CA: Academic Press, 2000.
- Wishart GJ.** Cryopreservation of avian spermatozoa. *Methods Mol Biol*, v.38, p.167-177, 1997.
- Zaniboni L, Rizzi R, Cerolini S.** Combined effect of DHA and α -tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. *Theriogenology*, v.65, p.1813-1827, 2006.
-