

Efecto del 3,4-dihidroxifenilglicol en la calidad de semen de gallo (*Gallus gallus*) criopreservado

Díaz Ruíz, E.¹; León Jurado, J.M.²; Bermúdez Oria, A.³; González Ariza, A.^{1,2}; Fernández Prior, A.³; Navas González, F.J.^{1,4}; Peláez Caro, M.^{1,5}; Delgado Bermejo, J.V.¹ y Arando Arbulu, A.¹

¹ Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

² Centro Agropecuario Provincial. Diputación de Córdoba. Córdoba. España.

³ Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Sevilla. España.

⁴ Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Alameda del Obispo. Córdoba. España.

⁵ Asociación Nacional de Criadores de Caprino de Raza Murciano Granadina. Granada. España.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), antioxidante derivado del olivo (*Olea europea*), en el diluyente de criopreservación sobre la calidad espermática post-descongelación en gallos. Para ello, se criopreservaron 5 réplicas de un pool de semen que procedían de 16 gallos de la raza Utrerana. De cada réplica, se obtuvieron cuatro alícuotas que contenían diferentes concentraciones de DHPG: Control (sin DHPG); T1: DHPG 50 µg/mL; T2: DHPG 100 µg/mL y T3: DHPG 150 µg/mL. Finalmente, las muestras se descongelaron y se evaluaron los siguientes parámetros: motilidad espermática, morfología, funcionalidad de membrana (HOST), viabilidad espermática, integridad del acrosoma, glutatión, concentración de EROs y peroxidación lipídica (LPO). Se observó que los valores de viabilidad, integridad del acrosoma, funcionalidad de membrana, motilidad total, motilidad progresiva y parámetros cinemáticos disminuyeron significativamente ($P > 0.05$) en las muestras sometidas a congelación en comparación con las del semen fresco. Sin embargo, en cuanto a las muestras sometidas a criopreservación, no se apreciaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para estos parámetros entre el tratamiento control y las muestras suplementadas con diferentes concentraciones de DHPG. En conclusión, la adición de estas concentraciones de DHPG al diluyente de criopreservación no tuvo ningún efecto significativo sobre los distintos parámetros de calidad seminal evaluados en semen de gallo criopreservado. Así, futuros estudios aumentando la concentración de este antioxidante se tornan necesarios.

Effect of 3,4-dihydroxyphenylglycol on the quality of cryopreserved rooster (*Gallus gallus*) semen

SUMMARY

The present study aimed to evaluate the effect of adding 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), that is an antioxidant derived from the olive tree (*Olea europea*), to the cryopreservation extender on post-thaw sperm quality in roosters. For this, 6 replicas of a semen pool which were obtained from 16 Utrerana breed roosters were cryopreserved. From each replicate, four aliquots containing different DHPG concentrations were obtained: Control: no DHPG; T1: DHPG 50 µg/mL; T2: DHPG 100 µg/mL and T3: DHPG 150 µg/mL. It was observed that the values of viability, acrosome integrity, HOST, total motility, progressive motility, linear velocity, rectilinear velocity, curvilinear velocity, and the mean amplitude of lateral displacement of the sperm head decreased significantly ($P > 0.05$) in samples subjected to freezing compared to those of fresh semen. However, for samples subjected to cryopreservation, no significant differences ($P < 0.05$) were observed for these parameters between the control treatment and samples supplemented with different concentrations of DHPG. In conclusion, the addition of these concentrations of DHPG to the cryopreservation extender had no significant effect on the different semen quality parameters evaluated in cryopreserved rooster semen. Thus, future studies increasing the concentration of this antioxidant become necessary.

PALABRAS CLAVE

Antioxidante.
Criopreservación.
Semen.
Avicultura.

ADDITIONAL KEYWORDS

Antioxidant.
Cryopreservation.
Semen.
Poultry.

INFORMATION

Cronología del artículo.

Recibido/Received: 20.01.2023

Aceptado/Accepted: 10.07.2023

On-line: 15.07.2023

Correspondencia a los autores/Contact e-mail:

estherddrr@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es un método eficaz para proteger los recursos genéticos de las distintas poblaciones aviares (Santiago-Moreno *et al.* 2011). De hecho, actualmente es el único método efectivo para el almacenamiento “*ex situ*” de células reproductivas

(Iaffaldano *et al.* 2016), ya que la criopreservación de oocitos no es posible dada la alta concentración de yema presente en los huevos de aves (Blesbois 2007).

Sin embargo, el proceso de congelación-descongelación provoca distintas lesiones celulares debido a cambios osmóticos, a la formación de cristales de hielo

intracelulares y a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), entre otros, que dan lugar a la disminución de la integridad y la permeabilidad de la membrana celular, que en definitiva repercute en la capacidad de fertilización y en la viabilidad espermática (Matsuoka *et al.* 2006).

Los espermatozoides aviares contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con los mamíferos, especialmente ácido docosahexaenoico (22:4n-6) y araquidónico (20:4n6) (Surai *et al.* 2001), y en consecuencia éstos sufren una mayor peroxidación lipídica en presencia de EROs (Longobardi *et al.* 2017). Altas concentraciones de EROs derivan en estrés oxidativo que provoca alteraciones en la funcionalidad espermática (Aziz *et al.* 2004) al comprometer la actividad mitocondrial, la producción de ATP y, por lo tanto, en la motilidad espermática, lo que en última instancia influye negativamente en la fertilidad (Sangani *et al.* 2017).

Para contrarrestar este efecto, el plasma seminal contiene varias enzimas antioxidantes, como son la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, así como otros compuestos antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E, el piruvato, el glutatión y la carnitina (Agarwal & Saleh 2002). Sin embargo, durante la criopreservación, la actividad de este sistema endógeno se ve afectado, por lo que la protección que proporciona puede ser insuficiente. En este sentido, resulta interesante la adición de antioxidantes exógenos (Naijian *et al.* 2013), existiendo una gran cantidad de compuestos antioxidantes que difieren en sus mecanismos de acción, toxicidad y efectividad (Mata-Campuzano *et al.* 2012).

Diversos extractos de plantas poseen propiedades antioxidantes dado el elevado contenido que presentan en polifenoles, flavonoides, carotenos, ácido gálico, taninos y aceites esenciales, los cuales tienen unas mayores ventajas sobre los antioxidantes sintéticos ya que generan menor cantidad de residuos y provocan una menor citotoxicidad (Zhong & Zhou, 2013). En concreto, el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) es un compuesto fenólico derivado del aceite de oliva (*Olea europaea*), el cual posee efectos antioxidantes (Fernandez-Bolanos *et al.* 2008) ya que reduce la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, protege contra la citotoxicidad del H₂O₂ y minimiza la actividad de la lactato deshidrogenasa (Hashimoto *et al.* 2004; Roche *et al.* 2009; Cicerale *et al.* 2010).

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antioxidante de distintas concentraciones de DHPG en la calidad post-descongelación del semen aviar usando N-Metilacetamida (NMA) como agente crioprotector.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA ANIMAL

En el presente estudio se incluyeron un total de 16 sementales de la raza aviar Utrerana con una edad comprendida entre uno y tres años, los cuales se alojaron en las instalaciones del Centro Agropecuario Provin-

cial de la Diputación de Córdoba (Andalucía, España) en jaulas individuales (95 x 95 x 95 cm) bajo un fotoperiodo natural.

Los animales fueron tratados de acuerdo con la Legislación Europea (Directiva 2010/63/UE "sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos"), la cual ha sido traspuesta al derecho español a través del RD 53/2013.

RECOGIDA Y PROCESADO DEL SEMEN

Tras un período de tres meses en el cual se entrenaron los animales, la extracción seminal se realizó dos veces a la semana (cinco en total) mediante el método descrito por Burrows y Quinn (1937). Se realizó un pool con todos los eyaculados individuales que presentaron una calidad aceptable. Los criterios mínimos de calidad seminal fueron los siguientes: volumen (>0.2 mL), concentración (>3 x 10⁹ spz/mL), motilidad (≥80% de motilidad total) y morfología (≤10-15% de espermatozoides con forma anormal).

Una vez hecho el pool, el semen se refrigeró durante una hora hasta alcanzar 5°C en una nevera programable (Cell incubator SH-020S, Welson, Korea) reduciéndose la temperatura en un radio de 0.3°C/min.

Con el objetivo de determinar el efecto del DHPG en la calidad del semen descongelado, a las muestras de semen se les añadió un diluyente de dos fracciones que contenía distintas concentraciones del antioxidante, y que, a su vez, se corresponde con los distintos tratamientos: Control (semen diluido sin antioxidante); T1 (50 µg/mL); T2 (100 µg/mL) y T3 (150 µg/mL).

Para la criopreservación, se realizó una primera dilución con la fracción A del diluyente propuesto por Sasaki *et al.* (2010) y transcurridos 30 minutos se llevó a cabo una segunda dilución con la fracción B del diluyente en que se estaba estudiando en el presente estudio, el cual contenía un 18% de NMA (concentración final 9%) como crioprotector.

Transcurridos 10 minutos desde la segunda dilución, las muestras se envasaron en pajuelas de 0.25 mL con una concentración final de 500 x 10⁶ spz/pajuela y se colocaron en vapores de nitrógeno a una altura de 4.5 cm durante 30 minutos sumergiéndose seguidamente en nitrógeno líquido (-196°C) hasta su uso.

Para la descongelación, las pajuelas fueron sumergidas en un baño de agua a 5 °C durante 1 minuto y 40 segundos (Sasaki *et al.* 2010).

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

Para la evaluación de la calidad seminal, se midieron un conjunto de parámetros tanto en semen fresco como en semen descongelado.

Para la valoración de la morfología espermática se realizó una tinción Diff-Quick (Kubus, Madrid, España) para, posteriormente, proceder a un conteo de 200 espermatozoides al microscopio (Olympus CX21FS2) a 40x, distinguiendo aquellos espermatozoides morfológicamente normales de aquellos que presentaban alguna anomalía.

La funcionalidad de membrana se evaluó mediante la prueba hipoosmótica de HOST. Para ello, se depositaron 25 µL de la muestra en 500 µL de solución HOST (1.351 g de fructosa y 0.735 g de citrato de sodio por 100 mL de agua destilada). Tras la incubación a 37°C durante 30 minutos, se añadieron 500 µL de glutaraldehído al 2% para fijar los espermatozoides. A continuación, se evaluaron un total de 200 espermatozoides con el microscopio (Olympus CX21FS2) a 100x.

Para el estudio de la motilidad espermática se utilizó el equipo IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience, MA, USA). Los parámetros estudiados fueron: motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad lineal (VAP, µm/s), índice de linealidad (LIN, %), índice de rectitud (STR, %), índice de oscilación (WOB, %), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm) y frecuencia de batida (BCF, Hz).

Para el resto de los parámetros estudiados se utilizó el citómetro CyFlow® Cube 6 (Sysmex Europe GmbH). Para el estudio de la viabilidad espermática se empleó el kit de viabilidad LIVE/DEAD (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos). Se diluyeron 200 µL de semen (20 x 10⁶ spz/mL) con 300 µL de fluido de citómetro y se añadieron 5 µL de SYBR-14 (2 µM) y 20 µL de yoduro de propidio (IP, 480 µM). Seguidamente, la muestra se incubó durante 15 minutos en oscuridad y se procedió a su análisis, considerándose que aquellos espermatozoides que emiten en la longitud de onda verde (FL1) son los que presentan membranas plasmáticas intactas.

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se depositaron 300 µL de semen (20 x 10⁶ spz/mL) en un tubo de citómetro y se añadieron 15 µL de aglutinina de cacahuete conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PNA-FITC, 100 µg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 30 µL de IP (6 µM). A continuación, la muestra se incubó durante 5 minutos en oscuridad, se añadieron 1200 µL de fluido de citómetro y se procedió a su análisis. Los resultados han sido corregidos según lo propuesto por Petrunkina *et al.* (2010), evitando la presencia de eventos que no se corresponden con espermatozoides.

Para la evaluación del glutatión, 1000 µL de semen (4 x 10⁶ spz/mL) fueron depositados en un tubo de citómetro donde se añadió 0,5 µL de CMFDA Cell-Tracker™ (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands) (5 µM) para proceder seguidamente a la incubación de la mezcla durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra a 2600 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 1000 µL de fluido de citómetro para llevar a cabo la evaluación.

Para la medición de las especies reactivas de oxígeno (EROs), se utilizó el kit comercial DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para ello, se depositaron 1000 µL de semen (4 x 10⁶ spz/mL) en un tubo de citómetro y se añadió 1 µL de DCFH-DA (25 µM) para proceder a su incubación en oscuridad durante 30 minutos a 25°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 2600 rpm durante 5 minutos, se retiró

el sobrenadante y se añadieron 1000 µL de fluido de citómetro para su lectura.

Para la evaluación de la peroxidación lipídica (LPO) se depositaron 200 µL de semen (20 x 10⁶ spz/mL) en un tubo de citómetro y se añadieron 10 µL de C11-BO-DIPY581/591 (10 µM) procediéndose a su incubación durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Transcurrido dicho tiempo la muestra se centrifugó a 2600 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 1000 µL de fluido de citómetro.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para ver la distribución de los datos se realizó un test de normalidad. Como los datos no seguían una distribución normal, estos fueron transformados según su naturaleza, para después realizar un análisis de One-way ANOVA seguido de un test de Tukey para determinar diferencias entre tratamientos. Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

Como se puede observar en la **Tabla I**, los valores de MT, MP, VAP, VSL, VCL y ALH disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) en las muestras sometidas a congelación en comparación con las del semen fresco. Así mismo, según los resultados reflejados en la **Tabla II**, los parámetros de HOST, viabilidad espermática e integridad del acrosoma aumentaron de forma significativa ($P > 0.05$) en las muestras de semen fresco en comparación con las de semen congelado. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas ($P > 0.05$) para estos parámetros entre el tratamiento control (sin antioxidante) y las muestras suplementadas con diferentes concentraciones de DHPG post-descongelación.

DISCUSIÓN

Las propiedades antioxidantes del DHPG han sido contrastadas y estudiadas anteriormente (Fernández-Prior *et al.* 2020). Sin embargo, su aplicación en diluyentes de conservación de semen es reciente, observándose resultados variados acorde a la especie. Arando *et al.* (2019) comprobaron la eficacia de la adicción de DHPG en el diluyente de criopreservación en la especie ovina al disminuir los valores de peroxidación lipídica en las muestras de semen descongeladas, al igual que ocurría con la adicción de hidroxitirol (HT), otro compuesto fenólico derivado del aceite de oliva, y con la mezcla de ambos a diferentes concentraciones. Igualmente, en esta misma especie, se observó un ligero aumento de los parámetros de motilidad cuando se suplementa el medio de dilución con estos antioxidantes para el caso de semen refrigerado (Arando *et al.* 2020).

De otro lado, en la especie canina, Shakouri *et al.* (2021) también observaron una mejoría en los parámetros de motilidad, viabilidad espermática e integridad de la membrana plasmática del espermatozoide en muestras de semen descongeladas tras el empleo de DHPG en el medio de congelación.

Por el contrario, en la especie caprina donde también se ha testado el efecto del antioxidante en cues-

Tabla I. Resultados correspondientes a los distintos parámetros de motilidad estudiados (MEDIA ± DE) (Results corresponding to the different motility parameters studied (MEAN ± SD)).

	FRESCO	CONTROL	T1	T2	T3
MT (%)	85.40±5.13	23.00±14.58	27.60±12.60	24.20±7.66	33.60±12.60
MP (%)	41.80±12.54	6.80±4.76	6.80±3.35	5.80±3.56	10.60±5.59
VAP (MM/S)	70.88±19.83	57.48±15.86	55.48±14.84	45.50±7.66	57.20±10.75
VSL (MM/S)	56.36±16.86	45.26±13.61	41.34±9.76	33.02±5.84	42.02±9.38
VCL (MM/S)	122.62±31.02	97.98±22.38	96.96±23.52	85.66±10.89	104.20±16.40
ALH (MM)	4.76±0.87	5.00±1.38	5.30±1.81	4.66±1.25	5.96±1.94
BCF (HZ)	22.88±4.78	22.26±5.17	22.56±3.37	24.98±3.04	24.82±2.56
STR (%)	75.00±2.35	72.80±2.17	69.60±4.56	67.80±4.38	67.60±6.95
LIN (%)	45.20±3.56	45.80±3.49	44.00±4.18	39.80±4.44	40.80 ±6.34

Tabla II. Resultados correspondientes a los parámetros de morfología, HOST, viabilidad espermática, integridad del acrosoma, glutatión, ROS y LPO (MEDIA ± DE) (Results corresponding to the parameters of morphology, HOST, sperm viability, acrosome integrity, glutathione, ROS and LPO (MEAN ± SD))

	FRESCO	CONTROL	T1	T2	T3
MORFOLOGÍA NORMAL (%)	81.14±8.38	84.95±4.36	85.31±2.75	82.73±6.64	77.47±7.64
HOST (%)	82.54±3.12	45.05±18.13	43.81±15.80	40.32±11.23	43.70±16.78
VIABILIDAD ESPERMÁTICA (%)	86.60±3.29	13.40±12.48	14.60±9.21	15.40±9.29	25.00±15.72
INTEGRIDAD DEL ACROSOMA (%)	83.29±2.48	10.76±8.45	11.88±10.87	11.88±7.86	15.47±9.63
GLUTATIÓN (MFI)	873.20±44.77	966.60±209.47	890.80±177.25	1039.20±181.38	1081.60±143.96
ROS (MFI)	910.00±94.54	992.60±165.00	951.20±155.64	1012.00±124.72	1015.80±175.32
LPO (MFI)	941.80±97.21	865.60±158.72	902.40±178.24	939.00±258.54	1003.80±79.05

ción, no se han encontrado efectos significativos tras la adición de DHPG en el diluyente en las muestras sometidas a criopreservación (Arando Arbulu et al. 2021). En el presente estudio, al igual que ocurría en la especie caprina, no se ha observado efecto alguno sobre los parámetros estudiados en las muestras de semen sometidas a congelación-descongelación tras la adición de DHPG al diluyente de criopreservación.

A pesar de no observar efecto significativo del DHPG en el presente trabajo, Al-Daraji (2012) observó como la adición de aceite de oliva a diferentes concentraciones en el diluyente de criopreservación daba lugar a una mejora en la calidad del semen post-descongelación en gallos al aumentar los parámetros de motilidad, viabilidad espermática e integridad del acrosoma. De igual forma, la suplementación de aceite de oliva vía oral en gallos ha resultado en un incremento de la viabilidad y de la motilidad, así como en una disminución de los espermatozoides morfológicamente anormales (Kacel & Iguer-Ouada 2018; Oliveira et al. 2022). Estos efectos son atribuidos a que el aceite de oliva mejora de la función gonadal, a la reducción del estrés oxidativo y de la peroxidación de lípidos, así como a promover la señalización de óxido nítrico lo que, en definitiva, preserva la calidad seminal (Banihani 2017).

En esta línea, existe otro derivado del aceite de oliva como es el ácido oleico que tras su suplementación al semen de gallo refrigerado ha dado lugar a la disminución de los efectos negativos de la peroxidación lipídica tanto en el plasma seminal como en los espermatozoides (Eslami, Ghaniei & Rad 2016).

En todo caso, la adición de antioxidantes al diluyente de congelación de gallos es un tema que se ha venido estudiando desde hace varios años atrás, com-

probándose la eficacia de otros tipos de antioxidantes sobre la calidad del semen descongelado. Tal es el caso del tempol, cuya adición reporta un aumento de la viabilidad espermática, funcionalidad de membrana, así como de la motilidad total y progresiva y de ciertos parámetros cinemáticos, al tiempo que disminuye el nivel de peroxidación lipídica (Najafi et al. 2022). Del mismo modo, tras la suplementación del diluyente aviar con 0.5 mM de glutatión se ha observado una mejora en la calidad seminal post-descongelación debido a un aumento de la viabilidad espermática, la funcionalidad de membrana, la integridad del acrosoma y de la motilidad (Ansari et al. 2021). Como último ejemplo, Siari et al. (2022) también han encontrado efectos beneficiosos tras la adición de 10 mM de quercetina al diluyente de criopreservación ya que aumenta la viabilidad espermática, la funcionalidad de membrana y la motilidad a la vez que reduce la cantidad de espermatozoides morfológicamente anormales y el nivel de peroxidación lipídica.

Aunque en el presente estudio no se han observado efectos beneficiosos del DHPG, el estudio de este tipo de antioxidantes derivados del aceite de oliva es fundamental teniendo en cuenta que el DHPG es extraído del alperujo, un subproducto del aceite de oliva del que se produce aproximadamente 5 millones de toneladas al año en España lo que tiene graves consecuencias ambientales debido a la alta presencia de compuestos fitotóxicos y contenido orgánico (Bermúdez-Oria et al. 2019; Rubio-Senent et al. 2015).

CONCLUSIONES

En conclusión, la adición de DHPG al diluyente de criopreservación no tuvo ningún efecto significativo, ni

positivo ni negativo, sobre la calidad seminal durante el proceso de congelación-descongelación. Por ello podría ser interesante aumentar la concentración del antioxidante dado que quizás no sea suficiente para paliar el estrés oxidativo originado durante el proceso de criopreservación. Igualmente, la ausencia de efecto podría atribuirse al hecho de que la extracción seminal no se llevó a cabo durante la época reproductiva de los sementales lo que podría haber afectado al éxito del proceso de criopreservación originando daños irreparables en los espermatozoides aviares. Por este motivo, sería interesante llevar a cabo futuros estudios durante la estación reproductiva más favorable.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer su colaboración al Centro Agropecuario de la Diputación de Córdoba por el mantenimiento de los animales empleados en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A & Saleh, RA 2002, 'Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment', *Urologic Clinics*, vol. 29, no. 4, pp. 817-27.
- Al-Daraji, HJ 2012, 'Adding olive oil to rooster semen diluents for improving semen quality and storage ability during liquid storage', *Baltic Journal of Comparative and Clinical Systems Biology*, vol. 42, no. 2, pp. 3-11.
- Ansari, M, Rakha, B, Akhter, S, Akhter, A, Blesbois, E & Santiago-Moreno, J 2021, 'Effect of glutathione on pre and post-freezing sperm quality of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*)', *Theriogenology*, vol. 172, pp. 73-9.
- Arando, A, Delgado, J, Fernández-Prior, A, León, J, Bermúdez-Oria, A, Nogales, S & Pérez-Marín, C 2019, 'Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm', *Cryobiology*, vol. 86, pp. 33-9.
- Arando, A, Delgado, JV, Bermúdez-Oria, A, León, JM, Fernández-Prior, Á, Nogales, S & Pérez-Marín, CC 2020, 'Effect of olive-derived antioxidants (3, 4-dihydroxyphenylethanol and 3, 4 dihydroxyphenylglycol) on sperm motility and fertility in liquid ram sperm stored at 15° C or 5° C', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 55, no. 3, pp. 325-32.
- Arando Arbulu, A, Navas González, FJ, Bermúdez-Oria, A, Delgado Bermejo, JV, Fernández-Prior, Á, González Ariza, A, León Jurado, JM & Pérez-Marín, CC 2021, 'Bayesian Analysis of the Effects of Olive Oil-Derived Antioxidants on Cryopreserved Buck Sperm Parameters', *Animals*, vol. 11, no. 7, p. 2032.
- Aziz, N, Saleh, RA, Sharma, RK, Lewis-Jones, I, Esfandiari, N, Thomas Jr, AJ & Agarwal, A 2004, 'Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index', *Fertility and sterility*, vol. 81, no. 2, pp. 349-54.
- Banihani, SA 2017, 'Semen quality as affected by olive oil', *International journal of food properties*, vol. 20, no. sup2, pp. 1901-6.
- Bermúdez-Oria, A, Rodríguez-Gutiérrez, G, Alaiz, M, Vioque, J, Girón-Calle, J & Fernández-Bolaños, J 2019, 'Pectin-rich extracts from olives inhibit proliferation of Caco-2 and THP-1 cells', *Food & Function*, vol. 10, no. 8, pp. 4844-53.
- Blesbois, E 2007, 'Current status in avian semen cryopreservation', *World's Poultry Science Journal*, vol. 63, no. 2, pp. 213-22.
- Burrows, W & Quinn, J 1937, 'The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey', *Poultry science*, vol. 16, no. 1, pp. 19-24.
- Cicerale, S, Lucas, L & Keast, R 2010, 'Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil', *International journal of molecular sciences*, vol. 11, no. 2, pp. 458-79.
- Eslami, M, Ghaniei, A & Rad, HM 2016, 'Effect of the rooster semen enrichment with oleic acid on the quality of semen during chilled storage', *Poultry Science*, vol. 95, no. 6, pp. 1418-24.
- Fernandez-Bolanos, JG, Lopez, O, Fernandez-Bolanos, J & Rodriguez-Gutierrez, G 2008, 'Hydroxytyrosol and derivatives: Isolation, synthesis, and biological properties', *Current Organic Chemistry*, vol. 12, no. 6, pp. 442-63.
- Fernández-Prior, MÁ, Fatuarte, JCP, Oria, AB, Viera-Alcaide, I, Fernández-Bolaños, J & Rodríguez-Gutiérrez, G 2020, 'New liquid source of antioxidant phenolic compounds in the olive oil industry: Alperujo water', *Foods*, vol. 9, no. 7, p. 962.
- Hashimoto, T, Ibi, M, Matsuno, K, Nakashima, S, Tanigawa, T, Yoshikawa, T & Yabe-Nishimura, C 2004, 'An endogenous metabolite of dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no. 5, pp. 555-64.
- Iaffaldano, N, Di Iorio, M, Miranda, M, Zaniboni, L, Manchisi, A & Cerolini, S 2016, 'Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapour using DMSO or DMA: Effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality', *British poultry science*, vol. 57, no. 2, pp. 264-70.
- Kacel, A & Iguer-Ouada, M 2018, 'Effects of olive oil dietary supplementation on sperm quality and seminal biochemical parameters in rooster', *Journal of animal physiology and animal nutrition*, vol. 102, no. 6, pp. 1608-14.
- Longobardi, V, Zullo, G, Salzano, A, De Candidis, C, Cammarano, A, De Luise, L, Puzio, MV, Neglia, G & Gasparrini, B 2017, 'Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm', *Theriogenology*, vol. 88, pp. 1-8.
- Mata-Campuzano, M, Álvarez-Rodríguez, M, Del Olmo, E, Fernández-Santos, MR, Garde, JJ & Martínez-Pastor, F 2012, 'Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 C in presence of several antioxidants', *Theriogenology*, vol. 78, no. 5, pp. 1005-19.
- Matsuoka, T, Imai, H, Kohno, H & Fukui, Y 2006, 'Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa', *Journal of Reproduction and Development*, vol. 52, no. 5, pp. 675-83.
- Najjian, HR, Kohram, H, Shahneh, AZ, Sharafi, M & Bucak, MN 2013, 'Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process', *Cryobiology*, vol. 66, no. 2, pp. 151-5.
- Najafi, A, Mehdipour, M, Mohammadi, H, Mehdipour, Z, Khorrami, B & Nazari, M 2022, 'Effect of tempol and straw size on rooster sperm quality and fertility after post-thawing', *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, pp. 1-9.
- Oliveira, COd, Tavares, AT, Castro, JPN, Ávila, SLcd, Gheller, SMM, Soares, SL, Gonçalves, FM & Bongalhardo, DC 2022, 'Reproductive parameters and weight gain of roosters fed with waste oil from olive culture', *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, vol. 44.
- Petrunkina, A, Waberski, D, Bollwein, H & Sieme, H 2010, 'Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach', *Theriogenology*, vol. 73, no. 7, pp. 995-1000.
- Roche, M, Dufour, C, Loonis, M, Reist, M, Carrupt, P-A & Dangles, O 2009, 'Olive phenols efficiently inhibit the oxidation of serum albumin-bound linoleic acid and butyrylcholine esterase', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1790, no. 4, pp. 240-8.
- Rubio-Senent, F, Rodríguez-Gutiérrez, G, Lama-Muñoz, A & Fernández-Bolaños, J 2015, 'Pectin extracted from thermally treated olive oil by-products: Characterization, physico-chemical properties, in vitro bile acid and glucose binding', *Food Hydrocolloids*, vol. 43, pp. 311-21.
- Sangani, AK, Masoudi, A & Torshizi, RV 2017, 'Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow and fast-growing roosters', *Poultry Science*, vol. 96, no. 1, pp. 211-9.
- Santiago-Moreno, J, Castaño, C, Toledano-Díaz, A, Coloma, M, López-Sebastián, A, Prieto, M & Campo, J 2011, 'Semen cryopreservation

- for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time', *Poultry science*, vol. 90, no. 9, pp. 2047-53.
- Sasaki, K, Tatsumi, T, Tsutsui, M, Niinomi, T, Imai, T, Naito, M, Tajima, A & Nishi, Y 2010, 'A method for cryopreserving semen from Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent', *The Journal of Poultry Science*, pp. 1009030069.
- Shakouri, N, Soleimanzadeh, A, Rakhshanpour, A & Bucak, MN 2021, 'Antioxidant effects of supplementation of 3, 4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 56, no. 7, pp. 1004-14.
- Siari, S, Mehri, M & Sharafi, M 2022, 'Supplementation of Beltsville extender with quercetin improves the quality of frozen-thawed rooster semen', *British poultry science*, vol. 63, no. 2, pp. 252-60.
- Surai, P, Fujihara, N, Speake, B, Brillard, J, Wishart, G & Sparks, N 2001, 'Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review', *Asian-Australasian journal of animal sciences*, vol. 14, no. 7, pp. 1024-50.
- ZHONG, R-z & ZHOU, D-w 2013, 'Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction', *Journal of integrative agriculture*, vol. 12, no. 10, pp. 1826-38.