



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ  
VETERINARĂ  
„ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI  
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ VETERINARĂ  
SPECIALIZAREA OBSTETRICĂ ȘI ANDROLOGIE  
VETERINARĂ**

Doctorand,  
**Iulian Andrei IBĂNESCU**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

Coordonator științific,  
**Prof. univ. dr. Dan DRUGOCIU**

**- IAȘI 2016 -**







**UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND  
VETERINARY MEDICINE  
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE  
DOMAIN: VETERINARY MEDICINE  
SPECIALIZATION: VETERINARY OBSTETRICS AND  
ANDROLOGY**

PhD student,  
**Iulian Andrei IBĂNESCU**

**DOCTORAL THESIS**

Scientific coordinator,  
**Prof. Dan DRUGOCIU, PhD**

**- IAȘI 2016 -**







## **Investește în oameni!**

Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013

Axa prioritară: **1. „Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

Domeniul major de intervenție: **1.5 „Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării”**

Titlul proiectului: **„Programe doctorale si postdoctorale pentru promovarea excelenței in cercetare, dezvoltare si inovare in domeniile prioritare – agronomic si medical veterinar, ale societatii bazate pe cunoastere”**

Beneficiar: **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA**

ID Proiect: **132765**

Cod contract: **POSDRU/159/1.5/S/132765**

## **TEZĂ DE DOCTORAT**

### **CERCETĂRI PRIVIND VARIAȚIILE SEZONIERE ALE INDICATORILOR SPERMATICI LA VIER ȘI FERTILITATEA ACESTORA**

Coordonator științific,

Prof. Univ. Dr. Dan DRUGOCIU

Doctorand,

Iulian Andrei IBĂNESCU

**- IAȘI 2016 –**







### **Invest in people!**

Project co-financed by European Social Fund, through Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007 - 2013

Priority axis: **1. „Vocational education and training in support of economic growth and development of knowledge based society”**

Major field of intervention: **1.5 „Doctoral programs and postdoctoral research support”**

Project title: **„Doctorale and postdoctorale programs to promote excellence in research, development and innovation in the priority areas - agronomic and veterinary medical, of the knowledge-based society”.**

Beneficiary: **UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES and VETERINARY MEDICINE CLUJ-NAPOCA**

ID Project: **132765**

Contract code: **POSDRU/159/1.5/S/132765**

## **DOCTORAL THESIS**

### **SEASONAL VARIATIONS OF SEMINAL PARAMETERS IN BOARS AND THEIR FERTILITY**

Scientific coordinator,  
Prof. Dan DRUGOCIU, PhD

PhD student,  
Iulian Andrei IBĂNESCU

**- IAȘI 2016 -**







## LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE

### Articole publicate în extenso ca rezultat al activităților doctorale

#### *Prim autor*

- **În reviste indexate ISI**

1. **Iulian Ibănescu**, Claus Leiding, Ștefan Gregore Ciornei, Petru Roșca, Ioana Sfartz, Dan Drugociu. Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 2016, 166:72-79. **Factor Impact - 1.511.**
2. **Iulian Ibănescu**, Dan Drugociu, Petru Roșca, Ioana Sfartz, Claus Leiding. The effect of chamber type on liquid stored boar sperm examined with computer-assisted instruments. *Acceptată pentru publicare în Romanian Biotechnological Letters*. **Factor Impact - 0.404.**

- **În reviste indexate BDI**

1. **I. Ibănescu**, D. Drugociu. Fertility of sows in relation to raw semen parameters. *Revista Română de Medicină Veterinară*, 2016, 26 (2):35-42.
2. **Iulian Ibanescu**. The Type of Container and Filling Method Have Consequences on Semen Quality in Swine AI Doses. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2016, 49(1):88-95.
3. **Ibănescu I.**, Roșca P., Sfartz Ioana, Crivei Ioana, Drugociu D. - Correlations between some parameters of raw and stored semen in boar. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine* 72(2):341-347.
4. **Ibănescu I.**, Roșca P., Drugociu D. - Short-term and long-term extenders for boar semen and their impact on kinetic parameters within five days of storage. *Accepted, to be published in: Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară. Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*, 58(2):217-225.
5. **Iulian Ibănescu**, Petru Roșca, Ioana Sfartz, Gelu Pavel, Dan Drugociu. Seasonal variation of some sperm parameters in boars housed in





standardized conditions. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science, 5(1):52-54.

6. **I. Ibănescu**, Adriane Woehl-Wenigerkind, Ioana Sfartz, D. Drugociu. The effectiveness of two different media used for in-vitro maturation of pig oocytes. *Lucrări Științifice: Medicină Veterinară Timișoara*, 48(4): 61-69.
7. **I. Ibănescu**, P. Roșca, Sabina Neculai-Văleanu, D. Drugociu, 2015. The influence of season on kinetic parameters of boar extended semen. *Lucrări Științifice: Medicină Veterinară Timișoara*, 48(4): 61-69.
8. **Ibănescu I.**, Drugociu D., Roșca P., Sfartz Ioana - Factors influencing sperm motility in boar. *Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*, 57(1-2):116-126.
9. **Ibănescu I.**, Drugociu D., Roșca P., Ciornei Ș., Nechifor F. - Monthly variation of seminal parameters in boar. *Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară*, 57(1-2):127-134.

### Co-autor

#### • În reviste indexate ISI

1. Ciornei Ș.G., Roșca P., Drugociu D., Mare M., Nechifor F. and **Ibănescu I.** - *Reproduction biotechnologies in Mangalita breed boars*. Research Journal of Biotechnology, 2013. Vol. 8 (11):51-56. **Factor impact – 0.293.**

#### • În reviste indexate BDI

1. Nechifor F., Drugociu D., Roșca P., Ștefan Ciornei, **Iulian Ibănescu** 2013 - *The bacterial flora of the uterus according to parturation type cows*, *Lucrări Științifice de Medicină Veterinară* Vol. 56, Nr. 3-4, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 290-297.
2. Nechifor F., Drugociu D., Roșca P., Ciornei Șt., **Ibănescu I.** 2014 - *Observation concerning the values of biochemical parameters in cows during puerperium* *Medicină Veterinară, Timișoara* Vol. XLVII, Nr.1, 69-74.
3. Nechifor F., Drugociu D., Roșca P., Ștefan Ciornei, **Iulian Ibănescu** 2013- *Remarks concerning the physiological constants in cows during puerperium*. *Lucrări Științifice de Medicină Veterinară* Vol. 56, Nr. 3-4, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 298-302.





4. Roșca P., Drugociu D., Ciornei Ș.G., Nechifor F., Văleanu (Neculai) Sabina, **Ibănescu I.** - *Observations regarding vaginal prolapse in bitch – case study.* **2013.** Lucrări Științifice de Medicină Veterinară Vol. 56, Nr. 3-4, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 245-249.
5. I. Sfartz, D. Drugociu, P.Roșca, **Iulian Ibănescu** - Cystic endometrial hyperplasia (CEH)-pyometra complex in bitch. Resumption of reproductive activity in sows after weaning, using PG600, 2014. Lucrări Științifice de Medicină Veterinară Vol. 57, Nr. 1-2, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 108-115.
6. Ștefan Ciornei, Petru Roșca, Dan Drugociu, Florin Nechifor, **Iulian Ibănescu**, Ionel Stăuceanu. Resumption of reproductive activity in sows after weaning, using PG600, 2014. Lucrări Științifice de Medicină Veterinară Vol. 57, Nr. 3-4, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași, 126-130.
7. Stăuceanu I., Ciornei Ș.G., Nechifor F., **Ibănescu I.**, Agape G., Roșca P., Drugociu D., Runceanu L. (2014) – Evaluation of the sperm production in boars grown in intensiv reproduction, Revista Română de Medicină Veterinară Vol. 24 nr. 2, 107-112.







## CUPRINS

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| INTRODUCERE .....                                                                                                                                    | 1   |
| REZUMAT .....                                                                                                                                        | 9   |
| INDEX ABREVIERI .....                                                                                                                                | 35  |
| <b>PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>                                                                                                      |     |
| CAPITOLUL I. MORFO-FIZIOLOGIA FUNCȚIEI GENITALE LA VIER.....                                                                                         | 37  |
| 1.1. Morfologia sistemului genital la vier .....                                                                                                     | 37  |
| 1.2. Fiziologia funcției genitale la vier .....                                                                                                      | 41  |
| CAPITOLUL II. SEZONALITATEA PROCESELOR DE REPRODUCȚIE LA SUINE.....                                                                                  | 49  |
| CAPITOLUL III. BIOTEHNOLOGIA ÎNSĂMÂNȚĂRILOR ARTIFICIALE LA SUINE.....                                                                                | 63  |
| 3.1. Recoltarea materialului seminal de vier .....                                                                                                   | 63  |
| 3.2. Evaluarea valorii biologice a materialului seminal de vier .....                                                                                | 66  |
| 3.3. Prelucrarea și conservarea materialului seminal de vier.....                                                                                    | 80  |
| 3.4. Inocularea materialului seminal de vier.....                                                                                                    | 84  |
| <b>PARTEA a II-a CERCETĂRI PROPRII</b>                                                                                                               |     |
| CAPITOLUL IV. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR .....                                                                                               | 89  |
| CAPITOLUL V. OPTIMIZAREA EXAMINĂRII COMPUTERIZATE A MATERIALULUI SEMINAL DE VIER .....                                                               | 91  |
| 5.1. Material și metodă.....                                                                                                                         | 92  |
| 5.2. Rezultate și discuții .....                                                                                                                     | 94  |
| 5.3. Concluzii parțiale.....                                                                                                                         | 102 |
| CAPITOLUL VI. OPTIMIZAREA PROCESĂRII ȘI CONSERVĂRII MATERIALULUI SEMINAL DE VIER .....                                                               | 103 |
| 6.1. Studiu comparativ privind eficiența a doi diluanți din clase diferite (diluant pe termen scurt și diluant pe termen lung).....                  | 104 |
| 6.1.1 Material și metodă.....                                                                                                                        | 104 |
| 6.1.2 Rezultate și discuții .....                                                                                                                    | 106 |
| 6.1.3 Concluzii parțiale.....                                                                                                                        | 113 |
| 6.2. Studiu privind corelațiile între unii parametri ai materialului seminal brut și cei ai materialului seminal după prelucrare și conservare ..... | 113 |
| 6.2.1 Material și metodă.....                                                                                                                        | 113 |
| 6.2.2. Rezultate și discuții .....                                                                                                                   | 116 |
| 6.2.3 Concluzii parțiale.....                                                                                                                        | 122 |





|                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3. Studiu comparativ privind eficiența recipientelor folosite la conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă..... | 123 |
| 6.3.1. Material și metodă .....                                                                                                   | 123 |
| 6.3.2. Rezultate și discuții.....                                                                                                 | 124 |
| 6.3.3. Concluzii parțiale .....                                                                                                   | 133 |
| CAPITOLUL VII. CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA SEZONULUI ASUPRA PARAMETRILOR CANTITATIVI ȘI CALITATIVI AI SPERMEI DE VIER .....       | 135 |
| 7.1. Variațiile sezoniere ale parametrilor seminali la vierii cazați în condiții obișnuite.....                                   | 136 |
| 7.1.1. Variațiile parametrilor materialului seminal brut.....                                                                     | 136 |
| 7.1.1.1. Material și metodă .....                                                                                                 | 136 |
| 7.1.1.2. Rezultate și discuții .....                                                                                              | 136 |
| 7.1.1.3. Concluzii parțiale.....                                                                                                  | 144 |
| 7.1.2. Variațiile parametrilor materialului seminal diluat și conservat.....                                                      | 145 |
| 7.1.2.1. Material și metodă.....                                                                                                  | 145 |
| 7.1.2.2. Rezultate și discuții .....                                                                                              | 145 |
| 7.1.2.3. Concluzii parțiale.....                                                                                                  | 152 |
| 7.2. Variațiile sezoniere ale parametrilor seminali la vierii cazați în condiții standardizate.....                               | 152 |
| 7.2.1. Material și metodă .....                                                                                                   | 152 |
| 7.2.2. Rezultate și discuții.....                                                                                                 | 153 |
| 7.2.3. Concluzii parțiale .....                                                                                                   | 158 |
| CAPITOLUL VIII. SUBPOPULAȚIILE DE SPERMATOZOIZI DIN MATERIALUL SEMINAL DE VIER ȘI VARIAȚIA SEZONIERĂ A ACESTORA .....             | 159 |
| 8.1. Material și metodă .....                                                                                                     | 160 |
| 8.2. Rezultate și discuții.....                                                                                                   | 162 |
| 8.3. Concluzii parțiale .....                                                                                                     | 168 |
| CAPITOLUL IX. FERTILITATEA SCROAFELOR ÎN RAPORT CU VALOAREA BIOLOGICĂ A MATERIALULUI SEMINAL .....                                | 169 |
| 9.1. Material și metodă .....                                                                                                     | 170 |
| 9.2. Rezultate și discuții.....                                                                                                   | 173 |
| 9.3. Concluzii parțiale .....                                                                                                     | 185 |
| CAPITOLUL X. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI .....                                                                              | 187 |
| BIBLIOGRAFIE .....                                                                                                                | 195 |
| INDEX FIGURI .....                                                                                                                | 209 |
| INDEX TABELE .....                                                                                                                | 209 |





## TABLE OF CONTENTS

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| INTRODUCTION .....                                                                                                                             | 3   |
| SUMMARY .....                                                                                                                                  | 25  |
| ABBREVIATIONS .....                                                                                                                            | 35  |
| <b><i>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</i></b>                                                                                                       |     |
| CHAPTER I. MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF GENITAL TRACT IN BOAR .....                                                                            | 37  |
| 1.1. Morphology of genital tract in boar.....                                                                                                  | 37  |
| 1.2. Physiology of reproduction in boar.....                                                                                                   | 41  |
| CHAPTER II. SEASONALITY OF REPRODUCTION IN SWINE .....                                                                                         | 49  |
| CHAPTER III. ARTIFICIAL INSEMINATION IN SWINE.....                                                                                             | 63  |
| 3.1. Boar semen collection.....                                                                                                                | 63  |
| 3.2. Boar semen examination .....                                                                                                              | 66  |
| 3.3. Boar semen processing and storage .....                                                                                                   | 80  |
| 3.4. Sows insemination .....                                                                                                                   | 84  |
| <b><i>PERSONAL CONTRIBUTIONS</i></b>                                                                                                           |     |
| CHAPTER IV. THE AIM AND OBJECTIVES OF THE PHD THESIS.....                                                                                      | 89  |
| CHAPTER V. THE OPTIMIZATION OF COMPUTERIZED EXAMINATION OF BOAR SEMEN.....                                                                     | 91  |
| 5.1. Materials and methods.....                                                                                                                | 92  |
| 5.2. Results and discussion .....                                                                                                              | 94  |
| 5.3. Partial conclusions .....                                                                                                                 | 102 |
| CHAPTER VI. RESEARCH ACTIVITIES FOR THE IMPROVEMENT OF BOAR SEMEN PROCESSING .....                                                             | 103 |
| 6.1. Short-term versus long-term extenders for boar semen: Differences in preserving the kinetic parameters within seven days of storage ..... | 104 |
| 6.1.1 Materials and methods.....                                                                                                               | 104 |
| 6.1.2 Results and discussion .....                                                                                                             | 106 |
| 6.1.3 Partial conclusions .....                                                                                                                | 113 |
| 6.2. Correlations among some parameters of raw and stored semen in boar.....                                                                   | 113 |
| 6.2.1 Materials and methods.....                                                                                                               | 113 |
| 6.2.2. Results and discussion .....                                                                                                            | 116 |
| 6.2.3. Partial conclusions .....                                                                                                               | 122 |





|                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3. Comparative study on the efficacy of the containers used for boar semen storage .....      | 123 |
| 6.3.1. Materials and methods .....                                                              | 123 |
| 6.3.2. Results and discussion.....                                                              | 124 |
| 6.3.3. Partial conclusions .....                                                                | 133 |
| CHAPTER VII. THE INFLUENCE OF THE SEASON ON THE MAIN SEMINAL PARAMETERS IN BOAR .....           | 135 |
| 7.1. Seasonal variations of seminal parameters in boars housed in normal conditions .....       | 136 |
| 7.1.1. Seasonal variations of raw semen .....                                                   | 136 |
| 7.1.1.1. Materials and methods.....                                                             | 136 |
| 7.1.1.2. Results and discussion.....                                                            | 136 |
| 7.1.1.3. Partial conclusions.....                                                               | 144 |
| 7.1.2. Seasonal variations of stored semen .....                                                | 145 |
| 7.1.2.1. Materials and methods.....                                                             | 145 |
| 7.1.2.2. Results and discussion.....                                                            | 145 |
| 7.1.2.3. Partial conclusions.....                                                               | 152 |
| 7.2. Seasonal variations of seminal parameters in boars housed in standardized conditions ..... | 152 |
| 7.2.1. Materials and methods .....                                                              | 152 |
| 7.2.2. Results and discussion.....                                                              | 153 |
| 7.2.3. Partial conclusions .....                                                                | 158 |
| CHAPTER VIII. MOTILE SPERM SUBPOPULATIONS IN BOAR SPERM AND THEIR SEASONAL VARIATION .....      | 159 |
| 8.1. Materials and methods .....                                                                | 160 |
| 8.2. Results and discussion.....                                                                | 162 |
| 8.3. Partial conclusions .....                                                                  | 168 |
| CHAPTER IX. FERTILITY OF SOWS IN RELATION TO RAW SEMEN PARAMETERS .....                         | 169 |
| 9.1. Materials and methods .....                                                                | 170 |
| 9.2. Results and discussion.....                                                                | 173 |
| 9.3. Partial conclusions .....                                                                  | 185 |
| CHAPTER X. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS ...                                          | 191 |
| REFERENCES .....                                                                                | 195 |
| FIGURES INDEX .....                                                                             | 209 |
| TABLES INDEX .....                                                                              | 215 |





## INTRODUCERE

Cu o populație mondială în continuă creștere, există nevoia unei creșteri proporționale a producției de alimente, atât vegetale cât și animale. O atenție însemnată se îndreaptă către fermele de porci, carnea de porc fiind unul dintre cele mai consumate tipuri de carne la nivel global. Creșterea numărului de ferme nu reprezintă cea mai bună soluție, deoarece presupune cheltuieli ridicate precum și ocuparea de spațiu suplimentar. În aceste condiții, varianta optimă este creșterea eficienței unităților deja existente. Pentru obținerea acestui deziderat este nevoie de însumarea a două acțiuni: eficientizarea tehnologiei de creștere (cu sporirea ratei de conversie a hranei) și optimizarea funcției de reproducție a suinelor.

Optimizarea reproducției la suine implică o cunoaștere în detaliu a fenomenelor intime ce se desfășoară în cadrul acesteia, inclusiv în ceea ce privește producția de material seminal.

Producția de material seminal la vier este influențată de o serie de factori, cum ar fi rasa, vârsta, nutriția, factorii de mediu, starea de sănătate și frecvența recoltărilor, care determină variații ale parametrilor spermatici. Din momentul implementării înșămânțării artificiale la suine, a existat un interes continuu legat de aceste variații, mai ales la vierii de mare valoare genetică.

De-a lungul anilor, mai mulți autori au dezbătut efectele sezonului asupra funcției de reproducție la suine, atât la masculi cât și la femele. La vierii modificările sezoniere par să fie influențate mai ales de fotoperioadă și temperatură. Aceasta din urmă, în cazul valorilor ridicate din timpul verii, are un efect dăunător ce cauzează destrucții ale liniei germinale, rezultând într-o scădere temporară a producției de spermatozoizi și a fertilității, fenomen ce a dus la apariția termenului de „infertilitate de sezon” la suine, pentru a reflecta rezultatele mai slabe obținute după înșămânțările artificiale din timpul verii. Conform unor autori, producția de spermă la vierii poate oscila cu până la 25-30% în cursul unui an, fapt ce forțează centrele de înșămânțare artificială să dețină vierii suplimentari pentru a compensa aceste fluctuații. Așadar, o cunoaștere mai bună a factorilor ce influențează atât cantitatea cât și calitatea spermei poate ajuta la creșterea eficienței unităților de producție a materialului seminal de vier.

Pentru a putea aprecia corect variațiile parametrilor seminali, trebuie acordată atenție mijloacelor de examinare. Evaluarea tradițională a materialului seminal, folosind microscopul optic oferă o interpretare subiectivă, în funcție de specialistul ce o realizează conducând la o mare variabilitate a rezultatelor. Gradul ridicat de subiectivitate al evaluării clasice o face mai puțin eficientă, iar rezultatele pot avea consecințe economice nedorite. Prin urmare, analiza

computerizată a materialului seminal (sistemul CASA) a devenit din ce în ce mai populară, ajungând să fie preferată pe scară largă la momentul actual datorită capacității de analiză rapidă și obiectivă a numeroși indicatori spermatici. Majoritatea autorilor susțin că, în cazul în care este aplicat corect, sistemul CASA este cea mai eficientă metodă de examinare a materialului seminal, realizând un examen obiectiv, precis, rapid și ușor de obținut. Nu este de neglijat însă că și rezultatele analizei computerizate pot fi influențate de o serie de factori ce țin de protocolul de lucru și de echipamentul utilizat iar din această cauză examinatorii trebuie să aleagă întotdeauna materialele adecvate.

Nu în ultimul rând, pentru a eficientiza activitatea centrelor de producție a materialului seminal de vier, este necesară aprofundarea cunoștințelor legate de prelucrarea și conservarea acestuia. Informații utile ar putea fi oferite, printre altele, de studierea diluanților aflați pe piață în vederea alegerii diluantului potrivit, de examinarea efectelor pe are metoda de prelucrare, ambalare și conservare le are asupra calității materialului seminal și de detectarea unor eventuale corelații între parametrii seminali calculați după ejaculare și potențialul ejaculatului de a-și păstra calitatea în timpul conservării.

\*\*\*

Teza de doctorat „**Cercetări privind variațiile sezoniere ale indicatorilor spermatici la vier și fertilitatea acestora**” a fost realizată și cu sprijinul Fondului Social European, Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, proiectul POSDRU/159/1.5/S/132765 – „Programe doctorale și postdoctorale pentru promovarea excelenței în cercetare, dezvoltare și inovare în domeniile prioritare – agronomic și medical veterinar, ale societății bazate pe cunoaștere”.

## **INTRODUCTION**

The world population continues to grow, which brings the need of a proportional grow in food production, both of vegetal and animal origin. Special attention goes to pig farms, because pork is one of the most consumed types of meat on a global level. Increasing the number of pig farms is not always the best solution, because it implies high expenses and the need of large surfaces. In these conditions, the optimal choice would be to improve the efficiency of the already existent farms. This can be achieved essentially by summing two actions: improvement of pig farming technology (with increases of food conversion rate) and optimization of pig reproduction.

The optimization of reproduction in swine requires a detailed knowledge of the phenomena that it implies, including semen production.

Semen production in boars is influenced by a series of factors, such as breed, age, nutrition, climate, health status and collection frequency, which determine variations in seminal parameters. Since the implementation of artificial insemination biotechnologies in swine, there is a continuous interest on these variations, particularly in boars of high genetic value.

Over the year, many authors debated about the effects of the season on the reproductive function in pigs, both in males and females. In boars, the seasonal changes seem to be determined particularly by photoperiod and temperature. In case of high values, the latter has a harmful effect causing destructions of germinal line, resulting in a temporary decline of sperm production and fertility, a phenomenon that led to the usage of a term called “seasonal infertility” in swine for referring to the poor results after artificial inseminations in summer. According to some authors, the semen production can oscillate as much as 25-30% during a year, forcing semen production centers to keep additional boars to compensate these fluctuations. Thus, a better knowledge of the factors that influence the quantity and quality of semen could help in increasing the efficacy of boar semen production units.

For a better assessment of seminal parameters variations, one must pay attention to the examination method. The traditional evaluation of semen using optical microscope offers a subjective interpretation according to the technician, leading to a high variability of the results. The high degree of subjectivity makes the classical evaluation less effective, and the results could have negative economic consequences. Thus, the examination using computerized instruments (CASA systems) became the most popular method, being nowadays largely preferred thanks to its capacity of a rapid and objective analysis of numerous seminal parameters. The majority of the authors in

literature state that, when correctly applied, the computer assisted sperm analysis (CASA) is the most efficient method of semen examination, offering accurate, rapid and easily obtained results. However, one must keep in mind that the results of CASA can also be affected by a series of factors related to operation protocol and equipment and for this reason the examiners must always choose the adequate materials.

Last but not least, for improved efficiency of boar semen production centers, it is necessary to deepen the knowledge related to semen processing and storage. Useful information could be offered, among others, by studying the extenders currently available on market for choosing the right extender, by examining the effects that the method of semen processing and packing can have on its quality, and also by detecting the possible correlations between the parameters of raw semen and its capacity of maintaining good quality during storage.

## MULȚUMIRI

Adresez sincere mulțumiri domnului **Prof. Dr. Dan Drugociu**, pentru îndrumarea și sfaturile pe care mi le-a oferit în vederea elaborării acestei teze de doctorat.

De asemenea, mulțumesc domnului **Prof. Dr. Dr. H.C. Liviu Runceanu** și domnului Conf. Dr. **Petru Roșca**, pentru disponibilitatea permanentă de a oferi sfaturi precum și pentru criticile constructive.

Sunt profund recunoscător unităților **BVN Neustadt a.d. Aisch din Germania** și Semtest BVN Târgu-Mureș care prin directorii **Dr. Claus Leding** și **Ing. Valer Sician** cât și prin personalul aferent mi-au arătat o amabilitate ieșită din comun și mi-au înlesnit efectuarea în mare parte a cercetărilor.

În același timp, gândurile mele de mulțumire se îndreaptă către **Suinprod S.A. Roman**, care mi-a permis să desfășor o parte din activitățile de cercetare în cadrul unității.

Mulțumesc comisiei de îndrumare precum și colectivului de la Disciplina de Obstetrică și Andrologie Veterinară, FMV Iași, pentru sfaturile oferite pe parcursul celor patru ani de doctorat.

De asemenea, aș dori să mulțumesc conducerii Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad", precum și conducerii Facultății de Medicină Veterinară pentru sprijinul acordat pe durata desfășurării studiilor doctorale.

Nu în ultimul rând, mulțumesc familiei pentru susținerea necondiționată pe care mi-au oferit-o.



## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Prof. Dr. Dan Drugociu, but also **Prof. Dr. Dr. H.C. Runceanu Liviu** and **Assoc Prof. Petru Roșca** for the guidance and advices they offered me during my doctoral studies.

Special thanks to **Dr. Claus Leiding** and **Eng. Valer Sician** from **BVN Neustadt a.d. Aisch e.V., Germany** and **Semtest-BVN S.A. Târgu-Mureș, Romania**, who showed me outstanding kindness and allowed me to conduct multiple internships that enhanced my research activities. I am also grateful to the friendly staff of the two companies.

Also, I would like to thank **Suinprod S.A. Roman**, for allowing me to perform a part of my research activities within their unit.

Last, but not least, I would like to thank my family for their support during all these years.

\*\*\*

A part of financial support for the implementation of this doctoral thesis was secured from the European Social Fund, through Sectorial Operational Program Human Resources Development 2007 - 2013, the draft POSDRU/ 159/ 1.5/S/132765 "Doctoral and postdoctoral programs to promote excellence in research, development and innovation in the priority areas - agronomic and veterinary medical, of the knowledge-based society".



## REZUMAT

**Cuvinte cheie:** vier, material seminal, prelucrare, variații sezoniere, CASA

Teza de doctorat intitulată „**Cercetări privind variațiile sezoniere ale indicatorilor spermatici la vier și fertilitatea acestora**” a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” din Iași.

Teza cuprinde 219 pagini și este constituită din două părți principale, conform normativelor aflate în vigoare la ora actuală. Pentru realizarea acesteia s-au utilizat ca sursă de documentare un număr de 192 titluri bibliografice din literatura de specialitate din țară și din străinătate relevante pentru subiectul tezei. Datele prezentate sunt susținute de 66 figuri și 45 tabele.

Originalitatea cercetărilor constă în compararea în premieră a trei modele specifice de camere de analiză utilizate pentru examinarea computerizată a materialului seminal de vier. De asemenea, pentru prima oară în țara noastră au fost monitorizate variațiile sezoniere ale parametrilor materialului seminal provenit de la vieri întreținuți în condiții standardizate. Nu în ultimul rând, teza prezintă primul studiu asupra variației sezoniere a distribuției subpopulațiilor de spermatozoizi mobili din materialul seminal prelucrat de vier. Toate acestea vor contribui la îmbunătățirea practicii de evaluare a spermei de vier prin alegerea dispozitivelor adecvate, la optimizarea producției de material seminal de vier prin oferirea unei soluții împotriva așa-numitei „infertilitate de sezon” descrisă la suine, precum și la o cunoaștere mai detaliată a fenomenelor ce stau la baza variațiilor sezoniere ale parametrilor seminali la vier.

Prima parte, intitulată „Stadiul actual al cunoașterii” cuprinde trei capitole (51 pagini), oferind informații disponibile în literatura de specialitate referitoare la morfologia și fiziologia aparatului genital de vier, la sezonabilitatea funcției genitale la suine precum și la biotehnologia de însămânțare artificială la această specie, inclusiv date cu privire la recoltarea, evaluarea prin metode clasice și metode moderne, prelucrarea, conservarea și inocularea materialului seminal.

Partea a doua, intitulată „Cercetări proprii”, este structurată pe șapte capitole (104 pagini) și prezintă scopul și importanța cercetărilor, materialele și metodele de lucru, rezultatele obținute în urma analizelor efectuate, interpretarea rezultatelor și discuțiile pe baza interpretării prezum și concluziile ce pot fi notate în urma cercetărilor și recomandările practice.

În conținutul tezei se regăsesc date proprii publicate în lucrările științifice susținute în cadrul simpozioanelor organizate de Facultatea de Medicină Veterinară Iași sau de alte facultăți de profil din țară, manifestări științifice

internaționale și reviste de specialitate cu indexare internațională (B+) și factor de impact (ISI).

În primul capitol din partea a doua a (**Capitolul IV** în cadrul tezei), intitulat “SCOPUL SI OBIECTIVELE TEZEI” sunt prezentate obiectivele cercetării și anume:

- Optimizarea protocolului de examinare computerizată a materialului seminal de vier prin aprecierea efectului pe care tipul de cameră utilizat în cadrul analizei computerizate a materialului seminal de vier diluat îl poate avea asupra rezultatelor obținute;

- Aprofundarea cunoștințelor legate de prelucrarea și conservarea materialului seminal de vier prin identificarea unor eventuale diferențe în ceea ce privește parametrii cinetici între un diluant pe termen scurt și unul pe termen lung în timpul unei perioade de conservare de șapte zile, prin depistarea eventualei influențe pe care ambalarea automată a materialului seminal o poate avea asupra calității acestuia precum și prin detectarea unor posibile corelații între parametrii seminali calculați după ejaculare și potențialul ejaculatului de a-și păstra calitatea în timpul conservării; toate acestea ar putea ajuta la îmbunătățirea protocolului de prelucrare a materialului seminal prin alegerea metodei și ejaculatelor potrivite;

- Consemnarea variațiilor sezoniere ale principalilor parametri spermatici la vierii întreținuți în condiții obișnuite, atât pentru materialul seminal brut cât și pentru materialul seminal prelucrat;

- Consemnarea variațiilor sezoniere ale principalilor parametri spermatici la vierii întreținuți în condiții standardizate;

- Depistarea subpopulațiilor de spermatozoizi mobili în materialul seminal de vier și observarea variației sezoniere a acestora;

- Studiarea relațiilor dintre variațiile parametrilor spermatici și fertilitatea materialului seminal de vier;

- Propunerea unei soluții de combatere a „infertilității de sezon” descrisă la vier.

**Capitolul V**, intitulat CERCETĂRI PRIVIND OPTIMIZAREA EXAMINĂRII COMPUTERIZATE A MATERIALULUI SEMINAL DE VIER a avut scopul de a observa dacă rezultatele analizei computerizate a materialului seminal de vier diluat pot fi influențate semnificativ de către tipul de cameră de analiză folosit iar dacă da, care dintre tipurile de cameră comparate oferă cel mai bun grad de precizie.

În vederea atingerii scopului, a fost examinat material seminal provenit de la cinci vierii sănătoși din rasa Pietrain, utilizați în mod uzual pentru reproducție într-o unitate comercială din Germania ce produce doze pentru însămânțarea

artificială a scroafelor. Examinarea a fost realizată după prelucrare și conservarea timp de două zile în stare lichidă, la 17°C. Pentru evaluarea parametrilor seminali a fost utilizat sistemul CASA, cu software-ul SpermVision versiunea 3.7

În cadrul examinărilor au fost utilizate trei tipuri comerciale de camere de unică folosință: camera Leja, camera MofA și camera Minitube, toate având înălțimea de 20  $\mu\text{m}$ . Toate cele trei tipuri de cameră de analiză au fost umplute conform specificațiilor producătorului. Fiecare probă de material seminal a fost analizată cu câte 3 lame (12 camere) din fiecare tip, atât imediat cât și la 6 și 12 minute după umplerea camerei, însumând astfel un număr total de 540 de examinări (5 probe  $\times$  12 camere  $\times$  3 tipuri  $\times$  3 intervale de timp).

Următorii parametri seminali au fost determinați: concentrația în spermatozoizi (Conc.), mobilitatea totală (TMot), mobilitatea progresivă (PMot), viteza medie a spermatozoizilor (VAP), viteza curbilinie (VCL), viteza în linie dreaptă (VSL), coeficientul de rectilitate (STR), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de oscilație (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF).

Pentru a verifica precizia rezultatelor oferite de sistemul CASA în ceea ce privește concentrația în spermatozoizi a probelor, s-au folosit unele metode suplimentare, utilizate pe scară largă și considerate ca fiind precise: dispozitivul SQA-Vp, aparatul Nucleocounter® NC-100™ precum și camera de numărat Thoma.

Datele obținute au fost prelucrate statistic cu ajutorul programului IBM SPSS® Statistics, versiunea 21. Pentru a evidenția cazurile în care diferențele între cele 3 tipuri de lame au fost semnificative a fost aplicată analiza One-Way ANOVA.

Rezultatele au evidențiat o influență clară asupra tipului de cameră de analiză utilizat și valorile calculate de CASA. La examinarea imediat după umplerea camerelor, toți parametrii cinetici au prezentat diferențe semnificative în funcție de tipul de lamă folosit. Rezultatele cele mai bune au fost oferite de camera Leja pentru parametrii TMot, PMot, VAP, VCL, VSL și ALH, în timp ce camera Minitube a oferit rezultate superioare pentru parametrii STR, LIN, WOB și BCF. Toți parametrii cinetici analizați au prezentat valori mai mici atunci când s-a folosit camera MofA. Și la 6 minute după umplere, camerele Leja și Minitube au oferit rezultate mai bune și relativ asemănătoare pentru procentul mobilității, fără diferențe semnificative ( $p < 0.05$ ) între ele. În ceea ce privește parametrii seminali calculați la 12 minute după umplerea camerei de analiză, s-a observat o scădere a parametrilor cinetici pentru toate cele trei tipuri de cameră de analiză, însă mai ales în cazul camerei MofA, unde valoarea mobilității

progresive a scăzut până la 5,42%. Așadar, valorile mobilității (atât cea totală cât și cea progresivă) au fost mai mici în cazul camerei MofA, iar efectul timpului trecut de la umplerea camerei a fost mult mai accentuat. Sunt necesare studii suplimentare asupra camerei de numărare MofA, pentru a confirma sau infirma efectul negativ exercitat asupra parametrilor cinetici ai materialului seminal și pentru a determina dacă acesta se datorează unor factori chimici sau mecanici. De asemenea, se recomandă efectuarea unui studiu și pe material seminal provenit de la alte specii, fiind cunoscută sensibilitatea mai mare a spermatozoizilor de vier.

Pentru concentrația în spermatozoizi a materialului seminal, tipul MofA a prezentat valoarea cea mai mare, tipul Leja o valoare intermediară iar tipul Minitube valoarea cea mai mică. Totuși, nici una dintre camere nu s-a apropiat de rezultatele obținute cu metodele suplimentare de analiză. Deoarece atât aparatele SQA-Vp și Nucleocounter cât și camera de numărare Thoma pot fi considerate metode de referință, se pare că sistemul CASA poate prezenta unele deficiențe în ceea ce privește determinarea concentrației materialului seminal diluat de vier indiferent de tipul de cameră folosit pentru analiză, rezultate asemănătoare fiind obținute și de alți autori. Imprecizia se datorează cel mai probabil aglutinării spermatozoizilor în proba analizată.

Studiul sugerează că rezultatele oferite de sistemul CASA la examinarea materialului seminal diluat de vier sunt influențate într-o măsură apreciabilă de tipul de cameră folosit la analiză, iar examinatorii care folosesc sistemul CASA ar trebui să țină cont de tipul de cameră de analiză pe care îl folosesc și să regleze pragul de acceptare a unui ejaculat în funcție de aceasta. Nu în ultimul rând, studiul sugerează că pentru determinarea concentrației în spermatozoizi e mai recomandată utilizarea metodelor special concepute în acest sens, iar sistemul CASA ar trebui folosit doar când celelalte metode nu sunt disponibile.

**Capitolul VI**, cu titlul CERCETĂRI PRIVIND OPTIMIZAREA PROCESĂRII ȘI CONSERVĂRII MATERIALULUI SEMINAL DE VIER este structurat pe trei subcapitole.

Primul subcapitol, intitulat „Studiu comparativ privind eficiența a doi diluanți din clase diferite (diluant pe termen scurt și diluant pe termen lung)” și-a propus identificarea eventualelor diferențe în ceea ce privește parametrii cinetici între un diluant pe termen scurt și unul pe termen lung, în timpul unei perioade de conservare de șapte zile.

În acest scop, cinci ejaculate provenite de la cinci vieri clinic sănătoși și apți din punct de vedere sexual au fost împărțite în două alicote și diluate în două moduri: cu un diluant pe termen scurt, ce asigură conservarea materialului seminal pentru trei zile și respectiv cu un diluant pe termen lung, conceput

pentru a păstra calitatea materialului seminal timp de șapte zile. Sperma diluată astfel a fost examinată zilnic începând cu ziua diluției și finalizând la șapte zile după efectuarea diluției, cu ajutorul sistemului CASA, programul SpermVision versiunea 3.7. Au fost determinați următorii parametri: mobilitate totală (TMot), mobilitate progresivă (PMot), viteză în linie dreaptă (VSL), viteza medie (VAP), viteza curbilinie (VCL), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de rectilitate (STR), coeficientul wobble (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH), frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF). Datele înregistrate au fost procesate folosind programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21. Diferențele între valorile oferite de cei doi diluanți folosiți la prelucrarea materialului seminal au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic atunci când  $p < 0,05$ . Pentru a identifica diferențele semnificative dintre cei doi diluanți, s-a folosit analiza "Independent t-test", luând în calcul prezumția de variații egale.

Ambii diluanți au oferit valori satisfăcătoare după șapte zile de conservare, în ceea ce privește parametrii cinetici. Mobilitatea progresivă s-a menținut peste 60%, valoare ce reprezintă pragul de acceptare înainte de înșămânțarea artificială recomandat de unii autori. Un aspect interesant observat a fost acela că nu s-au evidențiat diferențe semnificative între cei doi diluanți în ceea ce privește mobilitatea totală și progresivă ( $p < 0,05$ ). De fapt, doar doi dintre parametrii cinetici determinați au prezentat diferențe semnificative, mai exact viteza medie (VAP) și viteza în linie dreaptă (VSL).

În concluzie, diluantul pe termen lung folosit în cadrul cercetărilor pare să furnizeze rezultate puțin mai bune în cazul depozitării materialului seminal pentru o perioadă mai îndelungată, însă considerăm că ambii diluanți studiați pot fi folosiți pentru conservarea în stare lichidă până la șapte zile, la 17°C, fără diferențe majore în ceea ce privește parametrii cinetici. Cu excepția vitezei de deplasare a spermatozoizilor, niciunul dintre ceilalți parametri cinetici nu au prezentat diferențe semnificative, însă trebuie precizat că diluantul pe termen lung a oferit valori ușor mai mari aproape la fiecare examinare.

Al doilea subcapitol, intitulat „Studiu privind corelațiile între unii parametri ai materialului seminal brut și cei ai materialului seminal după prelucrare și conservare” și-a propus să identifice eventualele corelații între unii parametri ai spermei brute și cei ai spermei diluate și conservate timp de trei zile la 17°C, pentru o mai bună înțelegere a legăturii dintre parametrii seminali la ejaculare și potențialul spermei de a-și păstra calitatea în timpul depozitării, ceea ce ar putea ajuta la o selecție mai eficientă a ejaculatelor înaintea prelucrării. Studiul a cuprins analiza a peste 1000 de ejaculate recoltate pe o perioadă de doi ani într-o unitate comercială din Germania specializată în producția de doze de

însămânțare artificială a scroafelor. Doar ejaculatele cu peste 65% mobilitate totală au fost prelucrate, toate celelalte fiind eliminate înaintea diluției. Examinarea a fost efectuată în doi pași. Primul pas a constat în evaluarea spermei brute în primele 10 minute după ejaculare, utilizând (cu excepția volumului) dispozitivul SQA-Vp, cu determinarea următorilor parametri: volum, concentrație, mobilitate totală, numărul total de spermatozoizi/ejaculat, numărul total de spermatozoizi mobili/ejaculat, numărul total de spermatozoizi mobili/ml, procentajul spermatozoizilor morfologic normali, numărul total de spermatozoizi morfologic normali/ejaculat și numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali/ejaculat. Cel de-al doilea pas a fost executat pe materialul seminal după prelucrare și trei zile de conservare în stare lichidă, la 17°C. Pentru această examinare s-a utilizat programul SpermVision versiunea 3.7., cu determinarea parametrilor cinetici: mobilitate totală (TMot), mobilitate progresivă (PMot), VSL, VAP, VCL, LIN, STR, WOB, ALH, BCF. Datele înregistrate au fost procesate folosind programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21. Pentru a identifica eventualele corelații între parametrii spermei brute și cei ai spermei prelucrate și conservate, s-a efectuat Corelația Pearson (2-tailed).

Din păcate rezultatele au relevat doar o corelație moderată a mobilității totale din sperma brută cu mobilitatea totală și cea progresivă după prelucrare precum și o serie de corelații slabe între parametrii spermei înainte de prelucrare și cei după prelucrare și conservare timp de trei zile, care au însă o valoare prea mică pentru a sta la baza unei concluzii certe. Cele mai multe dintre corelațiile observate ar putea sugera că o densitate mai mare a materialului seminal brut și o rată mai intensă a producției de spermatozoizi vor determina spermatozoizii să se deplaseze mai repede dar și mai neregulat după conservare. Totuși, deoarece valorile corelațiilor au fost mici, se pare că parametrii seminali tind să se comporte diferit de la un ejaculat la altul.

Subcapitolul al treilea, cu titlul „Studiu comparativ privind eficiența recipientelor folosite la conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă” a avut drept scop evidențierea eventualului efect al tipului de recipient și metodei de umplere a dozelor de însămânțare asupra parametrilor seminali cinetici. Pentru aceasta, cinci ejaculate provenite de la cinci vieri clinic sănătoși și apti din punct de vedere sexual au fost împărțite în două alicote și ambalate folosind două tipuri diferite de recipiente utilizate în mod uzual pentru conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă, respectiv flacon de 100 de ml cu închidere manuală și tub de 100 ml cu închidere automată. Au fost utilizate recipiente fabricate din același material (material plastic) și de aceeași companie (Minitube, Germania). Sperma diluată și ambalată astfel fost

examinată zilnic timp de șase zile, începând cu ziua diluției. Examinarea a fost efectuată cu ajutorul sistemului CASA, programul SpermVision versiunea 3.7, calculând aceiași parametri ca în cadrul subcapitolului precedent: TMot, PMot, VSL, VAP, VCL, LIN, STR, WOB, ALH, BCF. Pentru a identifica diferențele semnificative, s-a folosit analiza "Independent t-test", luând în calcul prezumția de variații egale, iar diferențele între valorile obținute în cazul celor două tipuri de recipiente de conservare au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic atunci când  $p < 0,05$ .

După cele cinci zile de conservare la 17°C, materialul seminal a prezentat valori acceptabile (peste 60%) în ceea ce privește parametrii cinetici, indiferent de tipul de recipient utilizat. De remarcat este însă că toți parametrii luați în calcul au prezentat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) după cele cinci zile de conservare, în funcție de recipientul folosit. Astfel, parametrii TMot, PMot, VAP, VCL, VSL, ALH și BCF au prezentat valori mai mari în cazul folosirii recipientelor de tip tub umplut automat, în timp ce parametrii STR, LIN și WOB au prezentat valori superioare în cazul utilizării flacoanelor umplute manual, ceea ce poate conduce la concluzia că în cazul tuburilor umplute și închise automat, spermatozoizii se deplasează într-o proporție mai mare și cu o viteză superioară, însă deplasarea este mai neregulată. Atât mobilitatea totală cât și cea progresivă au prezentat valori superioare în cazul folosirii recipientelor de tip tub umplut automat, în toate cele cinci zile de conservare, ceea ce sugerează că acest tip de recipient protejează mai bine valoarea biologică a spermatozoizilor. Printre cauzele posibile pentru acest fenomen se numără forma recipientului, tipul de umplere și modul de închidere a recipientului. În condițiile în care procentul mobilității reprezintă în continuare principalul criteriu de evaluare a calității spermei înainte de înșămânțare, se poate afirma că tubul umplut și închis automat reprezintă nu doar o soluție economică, dar și o soluție pentru menținerea calității spermei pentru un timp mai îndelungat.

**Capitolul al VII-lea, CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA SEZONULUI ASUPRA VALORII BIOLOGICE A SPERMEI DE VIER** împărțit în două subcapitole, a avut drept scop monitorizarea variațiilor sezoniere ale principalilor parametri seminali la vier, în condițiile exploatarei industriale.

Primul subcapitol este la rândul său împărțit în două sub-subcapitole, și a vizat studierea variațiilor sezoniere ale parametrilor seminali la vierii întreținuți în condiții obișnuite, cu variații mari ale factorilor de microclimat pe parcursul anului, specifice fiecărui sezon.

În primul sub-subcapitol sunt prezentate metoda de lucru și rezultatele cercetărilor efectuate asupra materialului seminal brut. Studiul a cuprins analiza unui număr total de 11 476 ejaculate recoltate pe parcursul a 8 sezoane

consecutive. Recoltarea și examinarea materialului seminal a fost efectuată într-o unitate din Germania, specializată în producerea de material seminal de vier și taur. Doar ejaculatele cu cel puțin 65% mobilitate totală au fost înregistrate și procesate, celelalte fiind eliminate. Au fost determinați următorii parametri: volumul ejaculatului, concentrația în spermatozoizi, mobilitatea totală, numărul total de spermatozoizi/ejaculat, numărul total de spermatozoizi mobili/ejaculat, numărul total de spermatozoizi mobili/ml, procentajul spermatozoizilor morfologic normali, numărul total de spermatozoizi morfologic normali/ejaculat și numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali/ejaculat. Volumul a fost determinat prin cântărire, în timp ce pentru ceilalți parametri a fost utilizat dispozitivul SQA-Vp. Valorile obținute au fost procesate cu ajutorul programului IBM SPSS® Statistics versiunea 21. Pentru a semnaliza diferențele semnificative între sezoane a fost aplicat testul de analiză a variațiilor, One-Way ANOVA. Pragul de semnificație statistică a fost setat la  $p < 0,05$ .

Rezultatele au evidențiat faptul că sezonul de recoltare a avut o influență clară asupra cantității de material seminal ejaculat. Volumul a înregistrat valori superioare în timpul toamnei și valori inferioare în timpul primăverii cu diferențe semnificative între toate cele patru sezoane. Pentru sezonul de iarnă a fost obținută cea mai mică deviație standard, ceea ce reflectă un interval mai mic de variație. Pe de altă parte, concentrația în spermatozoizi a fost superioară în timpul iernii ( $p < 0,05$ ). Numărul total de spermatozoizi/ejaculat a prezentat valori superioare în timpul toamnei. De remarcat că numărul total de spermatozoizi/ejaculat a fost semnificativ mai mic pe perioada primăverii și verii comparativ cu sezoanele de toamnă și iarnă. Calitatea materialului seminal brut a fost de asemenea influențată de sezonul de recoltare. Mobilitatea totală a spermatozoizilor a prezentat valori semnificativ mai mari în timpul iernii și primăverii comparativ cu valorile din timpul verii și toamnei. Cea mai mare medie a acestui parametru a fost înregistrată în sezonul rece, însă fără diferențe semnificative față de sezonul de primăvară. De asemenea, media cea mai mică a fost înregistrată în timpul sezonului estival, însă fără o diferență semnificativă față de media din timpul toamnei. Procentul spermatozoizilor morfologic normali a fost de asemenea superior în perioada iarnă-primăvară, cu diferențe semnificative față de perioada vară-toamnă. Procentul cel mai mare s-a înregistrat primăvara, dar fără diferențe semnificative față de sezonul de iarnă ( $p > 0,05$ ). La polul opus s-a situat sezonul de vară, cu diferențe semnificative față de toate celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ). Numărul de spermatozoizi mobili/ml a prezentat cele mai mari valori în timp iernii, iar cele mai mici în timpul verii și toamnei. Pe de altă parte, numărul total de spermatozoizi mobili din ejaculat a

oferit valori superioare în timpul toamnei (fără diferențe semnificative față de iarnă) și valori inferioare în timpul primăverii (fără diferențe semnificative față de vară). Variația a fost asemănătoare cu cea observată în cazul numărului total de spermatozoizi morfologic normali/ejaculat și numărului total de spermatozoizi mobili și morfologic normali din ejaculat.

Rezultatele obținute le confirmă pe cele ale unor studii anterioare, conform cărora calitatea materialului seminal brut de vier este mai scăzută în timpul verii. Pe de altă parte, atrage atenția cantitatea de spermă mai mare produsă în timpul toamnei, atât prin prisma volumului cât și a numărului total de spermatozoizi ejaculați. Analiza concomitentă a valorilor din timpul toamnei și primăverii, anotimpuri cu temperaturi apropiate dar care prezintă caractere diferite ale fotoperioadei (descrescător în timpul toamnei, respectiv crescător în timpul primăverii), ar putea sugera că fotoperioada prezintă o influență asupra spermatogenezei.

Cel de-al doilea sub-subcapitol a urmărit studierea variațiilor sezoniere ale calității materialului seminal prelucrat și conservat trei zile la 17°C. Un număr total de 4814 ejaculate au fost obținute de la 700 de vieri maturi din punct de vedere sexual și clinic sănătoși cazați în condiții normale într-o unitate specializată în producerea dozelor de înșămânțare artificială din Germania, au fost examinate după trei zile de conservare utilizând sistemul CASA, programul SpermVision versiunea 3.7. Examinarea a fost realizată după trei zile de conservare la 17°C, cu determinarea parametrilor cinetici. Datele obținute au fost procesate statistic cu ajutorul programului IBM SPSS® Statistics versiunea 21. Pentru a semnala diferențele semnificative, a fost aplicat testul de analiză a variațiilor, One-Way ANOVA, iar pragul de semnificație statistică a fost setat la  $p < 0,01$ .

Conform rezultatelor obținute, mobilitatea totală a înregistrat cele mai mari valori în timpul iernii ( $80,12\% \pm 10,43$ ), iar cele mai mici în timpul verii ( $73,39\% \pm 13,28$ ). Valoarea medie înregistrată pentru sezonul de primăvară ( $80,08\% \pm 10,51$ ) a fost asemănătoare cu cea pentru sezonul de iarnă, în timp ce toamna a fost apropiată ca valoare medie ( $73,66 \pm 14,44$ ) de vară.

Mobilitatea progresivă a oferit de asemenea cele mai mari valori în timpul iernii ( $75,22\% \pm 12,36$ ), iar cea mai mică în timpul toamnei ( $64,55\% \pm 17,78$ ). Așadar, atât mobilitatea totală cât și cea progresivă au prezentat valori superioare în sezonul de iarnă, ceea ce ar putea sugera că temperaturile ambientale scăzute au o influență pozitivă sau cel puțin nu au o influență negativă asupra calității spermei. Analiza One-Way ANOVA a indicat diferențe statistic semnificativ între iarnă și primăvară pe de o parte și respectiv toamnă și iarnă de cealaltă parte, atât pentru mobilitatea totală cât și pentru cea

progresivă ( $p < 0,01$ ). Toți cei trei parametri ce indică viteza spermatozoizilor au variat între sezoane, cu cele mai mari valori fiind observate în timpul iernii și cele mai mici în timpul verii și toamnei. Pe de altă parte, parametrii ce indică uniformitatea deplasării spermatozoizilor au prezentat valori superioare în timpul verii. Ceilalți doi parametri cinetici determinați, amplitudinea de deplasare laterală a capului și frecvența de intersectare cu traiectoria medie au înregistrat valori superioare în timpul iernii.

Prin interpretarea rezultatelor obținute, studiul sugerează că sezonul de recoltare influențează parametrii materialului seminal de vier examinat după trei zile de conservare la 17°C. Această influență a fost evidentă pentru toți cei 10 parametri examinați. Se pare că în timpul iernii se înregistrează valori mai mari pentru mobilitatea totală și progresivă, pentru viteza de deplasare a spermatozoizilor (curbilitate, medie sau în linie dreaptă) dar și pentru amplitudinea de deplasare laterală a capului și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie. Pe de altă parte, sezonul de vară oferă valori superioare pentru coeficienții de rectilitate, liniaritate și wobble. Similitudini majore au fost observate între valorile din timpul iernii și primăverii și de asemenea între valorile din timpul verii și toamnei, sugerând o dependență a acestor parametri de caracterul fotoperioadei, respectiv crescătoare sau descrescătoare.

Al doilea subcapitol al capitolului VII a avut drept scop monitorizarea variațiilor sezoniere ale principalilor parametri spermatici la vierii cazați în condiții standardizate cu variații minime de temperatură și regim de lumină constant pe parcursul anului.

Materialul seminal a provenit de la 31 vieri din rasa Pietrain, clinic sănătoși și mature din punct de vedere sexual dintr-o unitate modernă, construită recent, specializată în reproducție suină. Temperatura a fost menținută pe perioada întregului an în jurul valorii de 18°C, utilizând sisteme de încălzire iarna și aspersiuni cu apă în timpul verii. Lumina a fost asigurată artificial, timp de 11 ore zilnic, indiferent de sezon. Hrana a fost preparată după aceeași rețetă pe tot parcursul studiului și administrată automat, prin instalații speciale. Apa a fost asigurată *ad libitum*.

După recoltarea spermei au fost determinați principalii parametri seminali, după cum urmează: volumul ejaculatului –folosind paharul gradat, concentrația în spermatozoizi, numărul total de spermatozoizi/ejaculat, mobilitate totală, număr total de spermatozoizi mobili/ejaculat, mobilitate progresivă, număr total de spermatozoizi progresivi/ejaculat –utilizând sistemul CASA, modelul CEROS II. Doar ejaculatele cu cel puțin 60% mobilitate totală au fost înregistrate și procesate, celelalte fiind eliminate. Durata studiului a fost de 12 luni, incluzând

astfel toate cele patru sezoane specifice climatului temperat. Datele obținute au fost procesate statistic utilizând programul IBM SPSS® Statistics, versiunea 21. Pentru a semnala diferențele statistic semnificative, a fost aplicat testul One-Way ANOVA, iar pragul de semnificație a fost setat la  $p < 0,05$ .

Rezultatele au evidențiat valori pentru volumul ejaculatului mai mari în timpul verii, cu diferențe semnificative față de celelalte sezoane și mai mici în timpul toamnei, contrazicându-le pe cele raportate de alți autori. Pentru concentrația materialului seminal nu au fost depistate diferențe semnificative, cu excepția toamnei, care a înregistrat valori semnificativ mai mari, fapt ce ar putea fi explicat prin volumul mai scăzut al ejaculatelor din aceeași perioadă.

Numărul total de spermatozoizi/ejaculat (TS/Ej.) a prezentat valori semnificativ mai ridicate în tipul sezonului de vară. La polul opus s-a aflat sezonul de iarnă, în timp ce între sezoanele de primăvară și toamnă nu au fost observate diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ). Din nou, rezultatele le-au contrazis pe cele obținute în alte studii, în care numărul total de spermatozoizi a fost semnificativ mai mic primăvara și vara comparativ cu toamna și iarna.

Mobilitatea totală (TMot) a înregistrat valori mai mici vara, dar fără diferențe semnificative statistic față de valorile din timpul primăverii și toamnei ceea ce sugerează că standardizarea condițiilor de cazare a ajutat la evitarea stresului caloric caracteristic verii. Singurul anotimp ce a prezentat diferențe semnificative comparativ cu restul a fost iarna, pe parcursul căreia au fost înregistrate cea mai mare valoare medie și cea mai mică variabilitate a valorilor. Un comportament identic a fost observat pentru mobilitatea progresivă (PMot). Numărul total de spermatozoizi mobili (TMS/Ej.) a prezentat valori mai ridicate în timpul verii, însă diferențele față de primăvară și toamnă nu au fost semnificative. Cât despre numărul total de spermatozoizi cu mișcări progresive (TPS/Ej.), au fost înregistrate valori semnificativ mai mari în timpul verii comparativ cu celelalte sezoane, fapt ce poate fi corelat cu valorile mai mari ale TS/Ej. din timpul acestei perioade. Toate celelalte sezoane au arătat între ele diferențe minore, nesemnificative în ceea ce privește valoarea TPS/Ej.

În concluzie, rezultatele le-au contrazis în cea mai mare parte pe cele obținute de alți autori în studii pe aceeași temă, precum și pe cele obținute în urma studiului prezentat în subcapitolul anterior. Deși au putut fi observate unele variații ale valorilor de la un sezon la altul, acestea au fost mai reduse, și ar fi putut fi cauzate de alți factori ce afectează spermatogeneza, cum ar fi vârsta vierilor sau infecțiile subclinice. De asemenea, în timp ce majoritatea autorilor afirmă că în timpul verii cantitatea spermei este redusă, în acest studiu au fost obținute valori mai mari pentru volum și numărul total de spermatozoizi/ejaculat, sugerând că standardizarea și optimizarea microclimatului în fermă poate

reduce stresul caloric asupra spermatogenezei din timpul verii, oferind astfel o soluție împotriva infertilității de sezon la suine. Studii suplimentare sunt necesare pentru a observa dacă acest sistem de cazare este eficient și în ceea ce privește parametri speciali ai materialului seminal.

**Capitolul VIII**, cu titlul CERCETĂRI PRIVIND SUBPOPULAȚIILE DE SPERMATOZOIZI DIN MATERIALUL SEMINAL DE VIER ȘI VARIAȚIA SEZONIERĂ A ACESTORA și-a propus studierea structurii heterogene a materialului seminal diluat de vier, cu identificarea subpopulațiilor de spermatozoizi mobili și monitorizarea variației sezoniere a distribuției acestora.

Studiul a cuprins analiza unui număr total de 4814 ejaculate obținute de la 700 de vieri maturi din punct de vedere sexual și clinic sănătoși, cazați în condiții normale într-o unitate specializată în producerea dozelor de însămânțare artificială din Germania. Durata recoltării și examinării a fost de 24 de luni. După ce au fost testate calitativ în cadrul examenului general, ejaculatele au fost diluate și supuse conservării la 17°C. Examinarea s-a realizat după trei zile de conservare, utilizând sistemul CASA, programul SpermVision 3.7. Următorii parametri seminali au fost determinați: viteza medie a spermatozozilor (VAP), viteza curbilinie (VCL), viteza în linie dreaptă (VSL), coeficientul de rectilitate (STR), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de oscilație (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF). Pentru fiecare probă analizată, au fost accesate datele individuale ale spermatozozilor aflați în câmpul salvat de computer, obținând astfel valorile calculate pentru un număr total de 433 145 de spermatozoizi analizați pe parcursul celor doi ani. Toate datele au fost ulterior incluse într-o bază de date comună. Pentru identificarea subpopulațiilor, valorile au trecut printr-o serie de analize statistice, utilizând programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21. Primul pas a fost reprezentat de efectuarea analizei componentelor principali (Principal Component Analysis, cunoscută și sub abrevierea PCA) asupra celor 8 parametri cinetici amintiți mai sus, urmat de selectarea celor două variabile cu cele mai mari valori în matricea componentelor (VAP și LIN), standardizarea valorilor pentru variabilele selectate și aplicarea procedurii „k-means cluster analysis”. După aplicarea acestei analize, apartenența fiecărui spermatozoid la unul dintre subgrupuri a fost salvată, pentru a putea calcula procentul fiecărei subpopulații identificate.

În urma analizei de clustering efectuate în cadrul acestui studiu, heterogenitatea materialului seminal a fost evidentă, cu existența unor subgrupuri distincte de spermatozoizi caracterizate prin valori diferite pentru viteza de deplasare și coeficientul de liniaritate. Pe scurt, caracteristicile principale ale acestora au fost după cum urmează:

- subpopulația 1 a cuprins spermatozoizi ce s-au deplasat cu o viteză ridicată însă cu un coeficient de liniaritate relativ scăzut. Acest grup a cuprins circa 28% din totalul spermatozoidelor analizați;

- subpopulația 2 a cuprins spermatozoizi caracterizați de viteză și liniaritate reduse. Aproximativ 26% din totalul spermatozoidelor au făcut parte din acest grup;

- subpopulația 3 a fost reprezentată de spermatozoizi cu viteză și coeficient de liniaritate relativ ridicate. În total, aproximativ 20% spermatozoizi au făcut parte din acest grup;

- subpopulația 4 a inclus spermatozoizi ce s-au deplasat cu viteză redusă însă cu un coeficient de liniaritate ridicat. Acești spermatozoizi au reprezentat circa 26% din numărul total.

Sezonul a arătat o influență clară asupra distribuției subpopulațiilor de spermatozoizi din materialul seminal de vier în cadrul acestui studiu.

Anotimpul de primăvară a fost caracterizat printr-o distribuție aproximativ uniformă, cu ponderea cam mai mare oferită de subgrupul 1 (28,3%) și cea mai mică de subgrupul 3 (22,2%). La limita superioară s-au remarcat subgrupurile 1 și 4, cu proporții aproximativ egale.

În timpul verii s-a observat o reducere în ponderea subgrupului 3, care a atins doar 16,5% și a subgrupului 1, care a ajuns la 23%, cu o diferență în minus de peste 5% față de iarnă. În același timp, ponderea subgrupurilor 2 și 4 a crescut considerabil. Cea mai mare pondere în sezonul estival a fost oferită de spermatozoidii lenți, dar liniari (31,4%).

Anotimpul de toamnă nu a prezentat diferențe majore referitoare la distribuția subpopulațiilor mobile de spermatozoizi în comparație cu anotimpul precedent. Spermatozoidii rapizi și liniari au fost din nou cei mai puțini, cu doar 14,7%. S-a remarcat o creștere a subgrupului 1, care s-a apropiat în dimensiuni de subgrupurile 2 și 4. Astfel, toamna s-a caracterizat printr-un procent redus de spermatozoizi rapizi și liniari și proporții aproximativ egale a tuturor celorlalte categorii.

Sezonul rece a oferit o creștere substanțială a procentului de spermatozoizi având viteză de deplasare și coeficient de liniaritate ridicate (subgrupul 3) precum și o scădere considerabilă a procentului de spermatozoizi lenți și neliniari (subgrupul 2). În același timp a crescut numărul de spermatozoizi încadrați în subgrupul 1 (rapizi, non-liniari), atingând ponderea maximă în cadrul anotimpului (32,7%). Nu trebuie omisă reducerea subgrupului 4, care a înregistrat cea mai mică proporție (19%).

Cercetările efectuate în cadrul acestui capitol au condus către concluzia că materialul seminal diluat de vier este caracterizat de prezența a patru

subpopulații distincte de spermatozoizi, definite prin viteze de deplasare și uniformitate a traiectoriei diferite iar anotimpul de recoltare are o influență clară asupra distribuției subpopulațiilor de spermatozoizi mobili.

Faptul că sezonul de recoltare modifică distribuția spermatozoidelor în cadrul subpopulațiilor mobile poate modifica percepția asupra variațiilor sezoniere ale parametrilor cinetici pentru sperma de vier. Într-un capitol anterior (capitolul 7) s-a arătat că anotimpul are un impact semnificativ asupra valorilor medii ale unor parametri precum viteza de deplasare sau liniaritatea/rectilinitatea traiectoriei spermatozoidelor. Astfel, modificările sezoniere ale parametrilor amintiți ar putea fi cauzate de modificarea numărului de spermatozoizi care se încadrează într-o subpopulație sau într-alta și nu de o scădere/creștere a valorilor pentru toți spermatozoidii ejaculați.

**Capitolul IX,** intitulat CERCETĂRI PRIVIND FERTILITATEA SCROAFELOR ÎN RAPORT CU VALOAREA BIOLOGICĂ A MATERIALULUI SEMINAL a avut scopul de a estima efectul unor parametri ai materialului seminal de vier asupra celor mai importanți indicatori ai fertilității la scroafe: rata fătărilor și prolificitatea.

Cercetările s-au efectuat într-o unitate comercială situată în nord-estul României, a cărei activitate o reprezintă creșterea și reproducția suinelor.

Activitățile au inclus recoltarea și examinarea materialului seminal de vier, însămânțarea artificială a scroafelor cu sperma ce a îndeplinit standardul de calitate și calcularea ratei parturițiilor, prolificității, numărului de purcei vii/parturiție și a numărului de purcei morți/parturiție. Evaluarea materialului seminal a constatat în determinarea volumului ejaculat, concentrației în spermatozoizi, numărului total de spermatozoizi/ejaculat, mobilității totale, mobilității progresive, numărului total de spermatozoizi mobili/ejaculat și a numărului total de spermatozoizi cu mobilitate progresivă/ejaculat. Cu excepția volumului, pentru care s-a folosit paharul gradat, toți parametrii au fost determinați cu ajutorul unui sistem CASA (CEROS II, IMV Technologies, Franța).

Cercetările au detectat corelații slab pozitive ale ratei parturițiilor cu numărul total de spermatozoizi cu mobilitate progresivă/ejaculat și concentrația materialului seminal, ale numărului de purcei vii/parturiție cu concentrația materialului seminal și ale numărului de purcei morți/parturiție cu volumul ejaculat. De asemenea, au fost identificate corelații slab negative între rata parturițiilor și volumul ejaculat, între numărul total de purcei/parturiție și mobilitatea progresivă, între numărul de purcei vii/parturiție și mobilitatea spermatozoidelor (totală și progresivă) și între numărul de purcei morți/parturiție și concentrație. Nu în ultimul rând, au fost depistate unele corelații printre

indicatorii de fertilitate ai scroafelor, dintre care cele mai importante au fost una puternic pozitivă între numărul total de purcei/parturiție și numărul de purcei vii/parturiție și una moderat negativă între numărul de purcei vii/parturiție și numărul de purcei morți/parturiție.

Analiza sezonieră a evidențiat, procentual, mai multe fătări după înșămânțările din timpul toamnei și primăverii, fără diferențe semnificative între cele două sezoane. De asemenea, ejaculatele recoltate toamna au oferit cea mai mare prolificitate, cu diferențe semnificative față de celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ). La polul opus se află ejaculatele recoltate iarna, cu diferențe semnificative față de ejaculatele din timpul verii și toamnei ( $p < 0,05$ ), nu însă și față de cele din timpul primăverii. Numărul de purcei vii/parturiție a fost oferit un comportament sezonier identic cu prolificitatea. Pe de altă parte, numărul de purcei morți/parturiție a prezentat cele mai mari valori după utilizarea ejaculatelor recoltate iarna și primăvara, fără diferențe semnificative între cele două sezoane ( $p > 0,05$ ), iar la polul opus s-au situat ejaculatele recoltate în timpul toamnei, cu diferențe semnificative față de celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ).

Deoarece nu au fost detectate corelații puternice între principalii parametri spermatici și fertilitatea la scroafe, concluzia studiului este că examenul general al spermei nu poate fi folosit pentru determinarea capacității fecundante a unui ejaculat. Poate fi util în eliminarea ejaculatelor cu o calitate scăzută certă, însă nu garantează selectarea doar a ejaculatelor de o calitate superioară. De asemenea, se pare că ejaculatele cu o capacitate fecundantă foarte bună, cu o probabilitate mare de a induce gestația nu asigură și obținerea unui număr mai mare de produși de concepție, aspect sugerat de lipsa corelațiilor între rata parturițiilor și prolificitate.

**Capitolul X, CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI** prezintă cele mai importante concluzii ce se evidențiază în urma cercetărilor efectuate precum și o serie de sugestii pentru specialiștii din domeniul producției de material seminal de vier.



## SUMMARY

**Keywords:** boar, semen, processing, seasonal variations, CASA

The PhD thesis entitled "**Seasonal variations of seminal parameters in boars and their fertility**" in the Doctoral School of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "Ion Ionescu de la Brad" University.

The thesis contains 219 pages and consists of two main parts, according to the currently regulations. A total number of 192 bibliographic titles from the national and international literature were used as a source of documentation. The data presented in the second part are supported by a total number of 66 figures and 45 tables.

The originality of the research resides in the comparison for the first time of three specific models of analyzing chambers designed for computerized analysis of boar semen. Also, for the first time in Romania, the seasonal variations of seminal parameters in boars held in standardized conditions were studied. Last but not least, the thesis contains the first study on the seasonal variation of motile sperm subpopulations in extended boar semen. All these will contribute to the improvement of boar semen evaluation techniques by choosing the adequate equipment, to the optimization of boar semen production by offering a solution against the "seasonal infertility" previously described in swine, and also to a better and more detailed understanding of the seasonal variations in boar semen.

The first part, having the title "CURRENT STATE OF KNOWLEDGE", is divided into three chapters (51 pages), presenting data from literature with respect to the morphology and physiology of the reproductive tract in boar, the seasonality of reproduction in swine and also the biotechnology of artificial insemination in swine, including data regarding the semen collection, examination using conventional and special methods, processing, storage and actual insemination.

The second part, with the title "PERSONAL CONTRIBUTIONS", contains a total of 104 pages and is divided into seven chapters, presenting the aims and importance of the research, the materials and methods used, the obtained results and their interpretation, related discussions as well as main conclusions of the research activities and practical recommendations.

The thesis contains original data published in scientific papers presented during scientific events organized by Faculty of Veterinary Medicine of Iași or

other similar national institutions, as well as international conferences or scientific journals internationally indexed (B+ or ISI).

Within the first chapter of the second part (**Chapter IV** of the thesis), entitled “THE AIM AND OBJECTIVES OF THE THESIS”, the main objectives of the research activities are presented, as follows:

- Optimizing the computer-assisted examination protocol for boar semen by evaluating the effect that the chamber type used for analysis can have on the obtained results;
- To strengthen the knowledge related to boar semen processing and storage by identifying possible differences in terms of sperm kinetic parameters between a short-term and a long-term extenders during a seven days period of storage, by observing the possible influence that automatic packing of boar semen can have on its quality, and also by detection of possible correlations between the seminal parameters of raw semen and its capacity of maintaining its quality during storage; all these could help in improving the boar semen processing protocols by choosing the right methods and ejaculates;
- To highlight the seasonal variations of the main seminal parameters in boars housed in usual conditions, both in raw and extended semen;
- To note the seasonal variations of the main seminal parameters in boars housed in standardized conditions;
- To identify the motile sperm subpopulations in boar semen and to note their seasonal variations;
- To study the relation of the variations in seminal parameters with the fertility of semen in boar;
- To suggest a solution against the “seasonal infertility in boars”.

The **chapter V**, with the title RESEARCH FOR OPTIMIZATION OF COMPUTERIZED EXAMINATION OF BOAR SEMEN aimed to determine if the results of semen analysis using computerized instruments can be greatly influenced by the analyzing chamber and if yes, which of the compared chamber types offers the best accuracy.

Samples of semen were obtained from five adult and healthy Pietrain boars from a commercial unit in Germany. The examination was performed after dilution and two days of storage in liquid state at 17°C were examined by means of SpermVision version 3.7 using the following chambers: Leja, MofA and Minitube, all of them having 20 µm in depth, at 0, 6 and 12 minutes after filling the chamber. The following parameters were determined: sperm concentration (Conc), total sperm motility (TMot), progressive sperm motility (PMOT), straight

line velocity (VSL), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), linearity (LIN), straightness (STR), wobble (WOB), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF). The sperm concentration was also determined by SQA-Vp, Nucleocounter NC-100 and hemocytometer. The results showed a significant difference between the MofA type and the other two chambers in terms of kinetic parameters, but also a significant difference between the concentration calculated by SpermVision, (regardless the chamber type), and the other methods ( $p < 0.05$ ). The main conclusion was that the output of CASA is influenced by the chamber type when examining liquid-stored boar semen. In this study the Leja and Minitube chamber types showed similar values, while the MofA chamber offered significantly lower results. Further studies on MofA chamber are needed, in order to confirm or to refute the negative effect exerted on the kinetic sperm parameters and to determine whether this effect (if confirmed) is due to chemical or mechanical factors. As regards the significant difference in calculated sperm concentration, we tend to think it was rather an underestimation by CASA system than an overestimation of the other devices, since all the other methods are widely recognized to be accurate and the differences among them were very small. Based on this, do not recommend the use of CASA for determining sperm concentration in liquid-stored boar semen, unless corrective measures are considered.

The **chapter VI**, “RESEARCH FOR THE IMPROVEMENT OF BOAR SEMEN PRESRVATION” is divided into three subchapters.

The first subchapter, with the title “Comparative study on the efficacy of two extenders from different classes (short-term and long-term)” aimed to identify the differences (if any) as regards the kinetic parameters within seven days of storage between a short-term and a long-term extender for boar semen.

Five ejaculates from five healthy and sexually mature Pietrain boars were collected by means of manual method and diluted with both BTS® (short-term) and DiluPorc™ (long-term). The extended semen was examined in the same day of dilution as well as after one, two, three, four, five and seven days of storage, by means of SpermVision 3.7. The following parameters were determined: total motility (TMot), progressive motility (PMot), straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), linearity (LIN), straightness (STR), wobble (WOB), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF).

Both extenders proved to be effective within the first seven days of preservation. However, significant differences ( $p < 0.05$ ), were revealed in terms of sperm velocity in the day of dilution, as well as in Days 2, 3, 4 and 7, with

superior values in case of DiluPorc™. No significant differences were found for the other kinetic parameters.

In conclusion, the long term extender DiluPorc™ seems to provide slightly better results in case of longer storage of semen, but we think that both the examined extenders are suitable for semen preservation up to seven days without major differences in terms of kinetic parameters. Although BTS® guarantees the quality of sperm only for three days, in our study it maintained all the ejaculates within good values for a much longer period.

The second subchapter, entitled “Correlations between some Parameters of Raw and Stored Semen in Boar” aimed to identify the correlations between some parameters of raw semen, and those of extended semen, stored in liquid form, for three days at 17°C. Over 1000 ejaculates were collected by means of manual method and artificial vagina over a period of two years from 400 mature boars housed in a specialized unit in Germany. The semen was examined immediately after collection (before dilution) as well as after three days of preservation. All the parameters (except the volume) were determined by means of computerized instruments. The examination of raw semen was performed using SQA-Vp, while the stored semen was analyzed using Spermvision version 3.7. All data were processed with IBM SPSS Statistics version 21. The Pearson correlation revealed no strong correlation between any of the raw semen parameters when analyzed together with stored semen parameters. However, some moderate or weak correlations were found, for example a positive correlation between motility of raw semen and motility of stored semen ( $p < 0.01$ ), a positive correlation between percentage of morphological normal sperm in raw semen and the motility of stored semen ( $p < 0.01$ ), a negative correlation between the concentration of raw semen and the linearity and wobble coefficient in stored semen ( $p < 0.01$ ) as well as a couple other weak correlations. We conclude that, despite the fact that some correlations were revealed, unfortunately the analyzed parameters of raw semen have low predictive value on the parameters of extended semen after preservation at 17°C, and that the parameters of semen will behave differently from one ejaculate to another.

The third subchapter has the title “The Type of Container and Filling Method Have Consequences on Semen Quality in Swine AI Doses” aimed to compare two types of containers for boar semen, namely the automatically-filled tube and the manually-filled bottle, in terms of preserving the quality of boar semen. Five ejaculates from five different boars were diluted with the same extender and then divided in two aliquots. First aliquot was loaded in tubes filled by an automatic machine while the second was loaded manually in special plastic

bottles. The semen was stored in liquid state at 17°C, regardless of the type of container and examined daily, for five days of storage by means of a computer-assisted sperm analyzer. Both types of containers maintained the semen within acceptable values, but after five days of storage significant differences ( $p < 0.05$ ) between the container types were observed in terms of all selected kinetic parameters. The tube showed better values for sperm motility and velocity, while the bottle showed superior values for straightness and linearity of sperm movement. The automatically-filled tubes offered better sperm motility in every day of the study. Given the fact that sperm motility is still the main criterion in assessing semen quality in semen production centers, the main conclusion of this study is that the automatic loading in tubes is superior and recommended over the old-style manual loading in bottles.

**Chapter VII, THE INFLUENCE OF THE SEASON ON THE MAIN SEMINAL PARAMETERS IN BOAR** had the main objective of monitoring the seasonal variations of the seminal parameters in boars exploited in intensive conditions. It is structured into two subchapters.

The first subchapter is also divided into two sub-subchapters and aimed the study of the seasonal variations of semen in boars held in usual conditions, with high variations of the microclimate during the year, specific to each season.

The first sub-subchapter presents the results on raw semen. 11 476 ejaculates were examined, collected during eight consecutive seasons from healthy and sexually mature boars exploited within a commercial unit in Germany, specialized in boar and bull semen production. Only the ejaculates showing at least 65% total motility were recorded and processed. Semen examination was performed during the first 10 minutes after ejaculation. The following parameters were determined: ejaculate volume, sperm concentration (Conc.), total motility (TMot), total number of sperm/ejaculate (TS/Ej.), total number of motile sperm/ejaculate (TMS/Ej.), total number of motile sperm/ml (TMS/ml), the percentage of sperm with normal morphology (%Morph), total number of sperm with normal morphology/ejaculate (TMorphNS/Ej.) and total number of sperm motile and with normal morphology/ejaculate (TMMorphNS/Ej.). The volume was determined by weight, while for the other parameters the SQA-Vp device was used. The values were statistically processed with IBM SPSS® Statistics. One-Way ANOVA analysis was applied in order to highlight the significant differences among seasons. The results showed a clear influence of the season on the semen quantity. The volume was higher during autumn and lower during spring, with significant differences among all the four seasons. Sperm concentration was higher during winter, but this could be correlated with the low volume recorded in the same period. Total

number of sperm/ejaculate showed higher values during autumn and lower during spring. Sperm motility was the best in the winter and spring. The percentage of morphologically normal sperm also recorded higher values in winter and spring, and the lowest in summer. The number of motile sperm/ml was higher during winter and lower during summer and autumn. On the other hand, the total number of sperm/ejaculate showed superior values in the course of autumn and winter and inferior during spring and summer; the same variation was observed for total number of sperm with normal morphology/ejaculate and total number of sperm motile and morphologically normal/ejaculate. The obtained results are consistent with the most of the previous studies, according to which the raw semen quality is lower during the summer and good quantity of semen is produced during autumn.

The second sub-subchapter presents the data obtained when studying the seasonal variations of the kinetic parameters in extended boar semen after three days of preservation in liquid state at 17°C. The analysis included the examination of a total number of 4854 boar ejaculates, during two years, between 1<sup>st</sup> of March 2013 and 20<sup>th</sup> February 2015. The following parameters were determined: total motility, progressive motility, straight line velocity (VSL), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), linearity (LIN), straightness (STR), wobble (WOB), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF). Semen was collected by manual method and by means of artificial vagina. The BTS® extender was used for dilution and the examination was performed using CASA system (SpermVision version 3.7). The results showed an evident influence of the season on the kinetic parameters, after preservation. During winter were recorded the highest values for progressive motility (75.27%), VAP (73.62 µm/s), VCL (141.86 µm/s), VSL (58.09 µm/s), ALH (3.32 µm) and BCF (37.29 Hz), during spring the highest values for total motility (80.18%), while the summer offered the best values for STR (0.80) and LIN (0.43). Interestingly, the differences were significant ( $p < 0.05$ ) only when comparing the winter-spring season with the summer-autumn season, while the differences between summer and autumn and respectively between winter and spring were insignificant. The best season for the kinetic parameters was the winter. At the opposite pole were the autumn and the summer. The results of this study suggest that the seasonality of the seminal parameters in boars housed in normal conditions is also reflected in the values determined after dilution and storage.

The second subchapter of the seventh chapter presents the data of a study that aimed to observe the seasonal variation of the seminal parameters in boars held in standardized conditions. The study was conducted on a number of 537

ejaculates, from 31 Pietrain boars housed in standardized conditions in terms of temperature, humidity and light regime. Semen was collected by manual method, and examined using the beaker for ejaculate volume, and the CASA system (CEROS II) for the other parameters. The results largely contradict those of previous studies, which analyzed the effect of the season on seminal parameters in boars held in usual conditions. Expressed as mean values, the results were as following: Volume showed higher values in the summer (218.7 ml) and lower in the autumn (155.7 ml); Total number of spermatozoa/ejaculate was higher in the summer ( $95.9 \times 10^9$ ) and lower in the winter ( $74.3 \times 10^9$ ); Semen concentration was higher in the autumn ( $571.6 \times 10^6/\text{ml}$ ) and lower in the summer ( $454.8 \times 10^6/\text{ml}$ ); Total number of motile spermatozoa/ejaculate showed higher values in summer ( $79.5 \times 10^9$ ) and lower in winter ( $65.4 \times 10^9$ ); % of Total motility was higher in the winter (87.9%) and lower in the summer (82.3%); Total number of progressive spermatozoa/ejaculate was higher in summer ( $52.7 \times 10^9$ ) and lower in autumn ( $44.2 \times 10^9$ ); % of Progressive motility was higher in winter (61.4%) and lower in autumn (52.3%). The results contradict those of other authors, who studied the semen from boars held in usual conditions. This fact suggests that the standardization of exploitation conditions of boars by maintaining a controlled climate in the farm can reduce the effects of heat stress on spermatogenesis during summer, offering a great opportunity against the “seasonal infertility” previously described and the high variations of semen parameters during a year.

**The chapter VIII**, with the title “MOTILE SPERM SUBPOPULATIONS IN BOAR SPERM AND THEIR SEASONAL VARIATION” aimed to study the heterogeneous structure of boar semen, identifying the motile sperm subpopulations and observing the seasonal changes of their distribution. The study included the analysis of 4814 ejaculates collected during eight consecutive seasons from 700 healthy boars exploited in a commercial unit in Germany, specialized in boar and bull semen production. The examination was performed after three days of storage, by means of a CASA system, software SpermVision 3.7. The following parameters were determined: average path velocity, curvilinear velocity, straight line velocity, straightness, linearity, wobble, amplitude of lateral head displacement and beat cross frequency. For each analyzed sample, individual data of the sperm were accessed thus obtaining the values for a total number of 433 145 analyzed sperm. All the retrieved data were included in a common database and processed with IBM SPSS® Statistics software in order to identify the sperm subpopulations. For that, a series of statistical analyzes were applied. First step was the Principal Component Analysis on the eight kinetic parameters based on Eigenvalues higher than 1.

The variables showing the highest values in the component matrix were selected for further analyzes: VAP (0.973) and LIN (0.924). The values for VAP and LIN were then standardized and included in the „k-means cluster analysis” procedure, using the Euclidean distances. The requested number of clusters was 4, based on previous studies that analyzed motile sperm subpopulations. The membership of each spermatozoon to a specific cluster was saved in order to calculate the percentage of each identified subpopulation. After the clustering analysis, the heterogeneity of examined semen was obvious, with the existence of distinct subgroups characterized by specific values for velocity and linearity. Briefly, the main characteristics of the sperm subpopulations were as follows:

- Subpopulation 1 contained sperm with high velocity but low linearity. This group included 28% of the total sperm;
- Subpopulation 2, included sperm with low velocity and linearity. Approximately 26% of total sperm were part of this group;
- Subpopulation 3, represented by sperm with relatively high velocity and linearity. Approximately 20% of sperm were included in this group;
- Subpopulation 4 contained sperm with low velocity but high linearity. These sperm were approximately 26% of the total number.

The season showed a clear effect on the distribution of motile sperm subpopulations in extended semen. The spring was characterized by an approximately uniform distribution. The highest proportion was offered by subpopulation 1 (28.3%) and the lowest by subpopulation 3 (22.2%). During summer, subgroups 3 and 1 showed a decrease, reaching 16.5% and 23% respectively. At the same time, subgroups 2 and 4 increased. The highest proportion was showed by the subgroup of slow but linear sperm (31.4%). The autumn did not record major differences on the distribution of motile sperm subpopulation, when compared to the previous season. The rapid and linear sperm were again the least numerous. The winter showed a substantial increase of the percentage of sperm with high velocity and high linearity and also a decrease of the percentage of slow and non-linear sperm.

The results led to the conclusion that extended boar semen is characterized by the existence of four distinct motile sperm subpopulation, defined by specific velocity and uniformity of movement and the collection season clearly affects the distribution of these subpopulations. The fact that the season modifies the distribution of sperm within motile subpopulations could change the perception on the seasonal variation of kinetic parameters in boar semen. In a previous chapter (chapter VII) it was shown that the season has a significant impact on the mean values of some parameters such as velocity and linearity/straightness. Thus, the seasonal variations of the mean values of these parameters could be

caused by changes in the number of sperm included within specific subpopulations and not by increases/decreases in values of all ejaculated sperm.

**The Chapter IX**, entitled “FERTILITY OF SOWS IN RELATION TO RAW SEMEN PARAMETERS” aimed to assess the effect of some raw semen parameters in boar on the main indicators of fertility: farrowing rate and litter size.

The activities included boar semen collection and examination, artificial insemination of sows with extended semen that fulfilled the quality standards and calculation of farrowing rate, litter size, born alive/parturition and stillborn/parturition.

The semen examination consisted in the determination of ejaculate volume, sperm concentration, total number of sperm/ejaculate, total motility, progressive motility, total number of motile sperm/ejaculate and total number of progressive sperm/ejaculate. With the exception of ejaculate volume, for which a beaker was used, all the other parameters were determined by means of a CASA system (CEROS II, IMV Technologies, France).

The study detected weak positive correlations of farrowing rate with sperm concentration and total number of progressive sperm/ejaculate, of born alive/parturition with sperm concentration, and of stillborn/parturition with ejaculate volume; weak negative correlations of farrowing rate with ejaculate volume, of litter size with progressive motility, of born alive/parturition with total and progressive motility, and of stillborn/parturition with sperm concentration. Also, some correlations were detected among fertility indicators in sows, of which the most important were a strong positive between litter size and born alive/parturition and a moderate negative between born alive/parturition and stillborn/parturition.

As no strong correlation was detected between the main seminal parameters and fertility in sows, we conclude that the general exam of semen can not be used as a tool to predict the fertilizing capacity of an ejaculate. It can be useful in eliminating the ejaculates with certain low quality, but can not guarantee the selection of only good quality ejaculates. Also, it seems that the ejaculates with good fertilizing capacity that have great chances to induce gestation do not always provide a great litter size too, a fact suggested by the lack of significant correlations between farrowing rate and litter size.

**The Chapter X**, GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS highlights the main conclusions that can be noted after the research activities as well as a few suggestions for the specialists working in the field of boar semen production.



## INDEX ABREVIERI

- %Morph – procentul de spermatozoizi cu morfologie normală din ejaculat  
ALH- amplitudinea deplasării laterale a capului spermatozoidului ( $\mu\text{m}$ )  
ANOVA – Analysis of Variances (analiza variabilelor)  
BCF – frecvența de intersectare a capului spermatozoidului cu traiectoria sa medie (Hz)  
CASA - Computer Assisted Sperm Analysis (sistem de analiză asistată de calculator a spermei)  
Conc. – concentrația în spermatozoizi a materialului seminal  
F – valoarea testului Levene pentru egalitatea variațiilor  
Fp.- fotoperioada  
FSH – Hormon foliculostimulant;  
Gn-RH – hormonul de eliberare a gonadotropinelor  
I.A. – Însămânțare artificială  
LH – hormon luteinizant;  
LIN – coeficient de liniaritate ( $=\text{VSL}/\text{VCL}$ );  
PMot – mobilitatea progresivă a spermatozozilor  
 $r$  – valoarea corelației  
SD – Deviația standard;  
Sig. – semnificația analizei statistice (valoarea  $p$ )  
STR – coeficient de rectilinitate ( $=\text{VSL}/\text{VAP}$ );  
TMMorphNS/Ej. – numărul total de spermatozoizi mobili și cu morfologie normală din ejaculat  
TMorphNS/Ej. – numărul total de spermatozoizi cu morfologie normală din ejaculat  
TMot – mobilitatea totală a spermatozozilor  
TMS/Ej. – numărul total de spermatozoizi mobili din ejaculat  
TMS/ml – numărul de spermatozoizi mobili/ml  
TPS/Ej. – numărul total de spermatozoizi cu mobilitate progresivă din ejaculat  
TS/Ej. – numărul total de spermatozoizi din ejaculat  
VAP – Viteza medie a spermatozoidului ( $\mu\text{m/s}$ );  
VCL – Viteza curbilinie a spermatozoidului ( $\mu\text{m/s}$ );  
VSL – Viteza în linie dreaptă a spermatozoidului ( $\mu\text{m/s}$ );  
WOB – coeficientul wobble (de oscilație) a spermatozoidului ( $=\text{VAP}/\text{VCL}$ )



# **PARTEA I**

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**



## CAPITOLUL I. MORFO-FIZIOLOGIA FUNCȚIEI GENITALE LA VIER CHAPTER I. MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF GENITAL TRACT IN BOAR

### 1.1. MORFOLOGIA SISTEMULUI GENITAL LA VIER

Aparatul genital la vier (ca de altfel la toate speciile de mamifere) este cuprins dintr-o serie de organe cu rolul comun de a produce materialul seminal și de a-l depune la nivelul căilor genitale femele (figura 1.1). Schematic, se compune din: gonade (testicule), căi spermactice, glande anexe și organ copulator (penis).

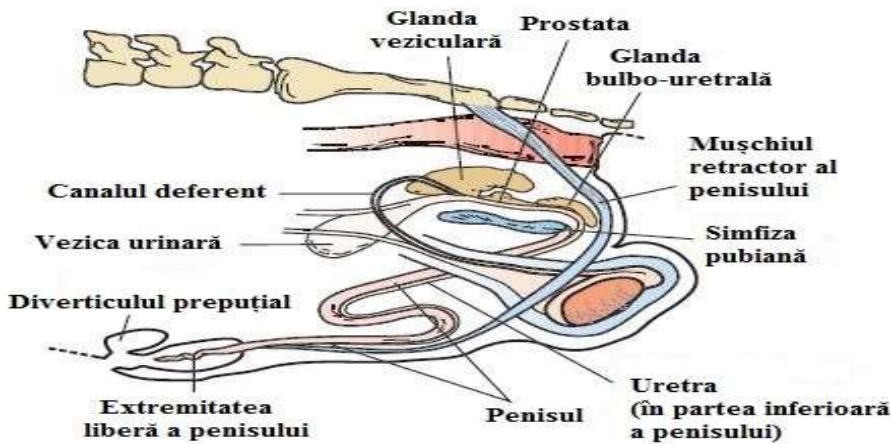


Figura. 1.1. Schema aparatului genital la vier în poziție fiziologică (după Cochran, 2010)

Figure 1.1. Genital tract in boar, physiological position (Cochran, 2010)

#### 1.1.1. Gonadele

La masculi (și implicit la vieri), gonadele sunt reprezentate de testicule, în număr de două la orice individ sănătos. Acestea sunt organe cu activitate dublă, având atât activitate endocrină (produc hormoni sexuali) cât și activitate citogenică (produc gameții masculi) (Cochran, 2010).

La vier, testiculele sunt de formă ovală și așezate în regiunea perineală, subanală, orientate oblic în jos și înainte. Pungile testiculare sunt, în general, reduse și lipsite de gât. Dimensiunile și greutatea testiculelor variază cu vârsta, rasa și starea de întreținere. La vierul adult, testiculul are o lungime de circa 7-8 cm, o greutate de circa 14-15 cm și o greutate de circa 500 g (Bogdan, 1999). Testiculele de vier prezintă o creștere accelerată la vârsta de 4-6 luni și ating

dimensiunea specifică vierului adult în apropierea vârstei de 8 luni (Kuster și Althouse, 2006).

La exterior testiculul de vier prezintă un „desen” vascular caracteristic care se aseamănă cu cel de la testiculul de armăsar, însă artera testiculară nu atinge coada epididimului, iar la nivelul marginii libere este mai puțin flexuoasă și colateralele emise sunt mai lungi, atingând marginea epididimului (Groza și Morar, 2004).

Testiculele sunt susținute și protejate de o serie de învelitori care după raporturile și proveniența lor pot fi sistematizate în **trei tunici**: externă, mijlocie și internă ce alcătuiesc pungile testiculare (Roșca, 2004; Ciornei, 2012).

Ca orice organ dezvoltat în cavitatea abdominală și testiculul este învelit la exterior de peritoneu (epiorchium), care aderă intim la o capsulă conjunctivă groasă de culoare albă numită albuginee. În albuginee se observă traectele și ramurile arterelor testiculare care descriu un desen specific (Runceanu, și colab. 2007). Din albuginee se desprind, concentric, septumuri care delimitează lobulii testiculari (200-300 lobuli), și care prin convergență dau naștere mediastinului testicular (corpul lui Highmore) care este situat pe marginea epididimară a testiculului. Lobulii testiculari au un aspect piramidal, cu baza spre albuginee, fiecare lobul conține 2- 4 tubi seminiferi. Fiecare tub începe înfundat sub forma unui deget de mânășă, prezintă o porțiune sinuoasă și o porțiune dreaptă (tubii drepți), care la nivelul mediastinului testicular se anastomozează cu tubii vecini, rezultând rețeaua testiculară sau rețeaua lui Haller. Aceasta se continuă cu conurile eferente ce se deschid în capul epididimului (Roșca, 2004). Lungimea medie a unui tub seminifer este de 8700 m la vier (Vaissaire 1977 citat de Runceanu și col. 2002).

### **1.1.2. Căile spermatice**

La vier, ca la toate speciile de mamifere, căile spermatice cuprind căi spermatice intratesticulare, reprezentate de: tubii drepți și rețeaua testiculară (rețeaua Haller) și căi spermatice extratesticulare reprezentate de: canalele eferente, epididim, canal deferent, canal ejaculator și uretra (Roșca, 2004).

**Tubii drepți** rezultă din unirea tubilor seminiferi din fiecare lobul, sunt scurți și au un traect drept.

**Rețeaua testiculară** sau rețeaua Haller este formată dintr-o rețea de canale neregulate intercomunicante ce rezultă din continuarea tubilor drepți ce se anastomozează în corpul lui Highmore.

**Conurile eferente** pornesc din rețeaua testiculară și fac legătura cu epididimul printr-o extremitate flexuoasă. La vier, numărul conurilor eferente este cuprins între 14-21 (Runceanu și col., 2002).

**Epididimul** este o formațiune alungită, de formă semilunară, strâns lipită de axul longitudinal al testiculului și este alcătuit din cap, corp și coadă (Roșca P., 2004). La vier, epididimul este bine dezvoltat, cu extremitățile sale acoperind extremitățile testiculului, și un corp dezvoltat ce aderă la marginea anterioară a testiculului (Bogdan, 1999).

**Canalul deferent** la vier este foarte subțire, iar porțiunea terminală a sa nu se apropie de congenera ei decât înainte de a se deschide în uretra (Bogdan, 1999). Ampula canalului deferent, prezintă și chiar bine dezvoltată la armăsar, taur și berbec, lipsește la vier (Frandsen și col., 2009; Cochran, 2010).

### **1.1.3. Organul copulator (penisul)**

Penisul la vier este de tip fibro-elastic, în structura sa predominând scheletul trabecular și albugineea. Prezintă o lungime apreciabilă și o consistență ridicată și în cazul în care nu este în erecție. Alungirea penisului necesară acuplării se realizează cu ajutorul unei “rezerve” de lungime (flexura sigmoidă sau „S”-ul penian) care se șterge în timpul erecției. Penisul de vier este asemănător, în general, cu cel de la rumegătoare, de care se deosebește prin corpul mai subțire, mai lung și cu flexura sigmoidă plasată cranial burselor testiculare. Extremitatea liberă este ascuțită și ușor spiralată, de aspectul unui tirbușon. Glandul este extrem de redus, reprezentat de țesutul spongios puțin dezvoltat și care nu acoperă extremitatea liberă a corpilor cavernoși. Șanțul uretral este marcat de un rafeu penian evident (Groza și Morar, 2004).

Prepuțul reprezintă o invaginare a pielii ce înconjoară extremitatea liberă a penisului. La suine, prepuțul prezintă un diverticul dorsal orificiului prepuțial. Acesta acumulează urină, secreții și celule moarte, care contribuie la producerea mirosului caracteristic de vier adult (Frandsen și col., 2009).

### **1.1.4. Glandele anexe**

La vier, glandele anexe sunt reprezentate de: glandele veziculare, glanda prostată, glandele bulbo-uretrale (figura 1.2).

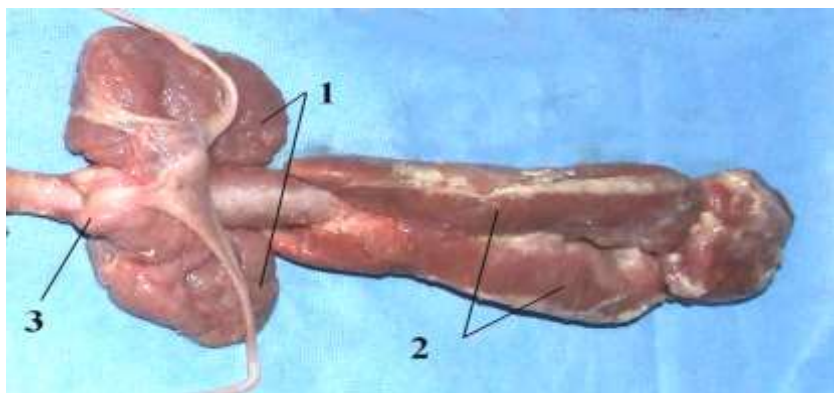


Figura 1.2. Glandele anexe la vier (după Ciornei, 2012)

1. Glandele veziculare (veziculele seminale); 2. Glandele bulbouretrale (glandele lui Cowper); 3. Prostata.

Figure 1.2. Accessory sex glands in boar (Ciornei, 2012)

1. Vesicular glands (seminal vesicles); 2. Bulbourethral glands (Cowper's glands); 3. Prostate.

Glandele veziculare (veziculele seminale) sunt glande foarte dezvoltate la vier. Datorită caracterului lor glandular, ele au fost considerate de multe ori ca inexistente și confundate cu niște lobi prostatici. Fiecare veziculă seminală are o lungime de 12-15 cm și un diametru de 6-8 cm, fiind ușor turtită. Este friabilă, cu aspect glandular și recurbată caudal, ajungând în contact cu cea din partea opusă, de care este legată printr-un sept conjunctiv. Cele două vezicule seminale formează o masă excesivă care acoperă prostata, originea canalului uro-genital și ajunge până la nivelul glandelor bulbo-uretrale (Bogdan, 1999). Spre deosebire de majoritatea speciilor domestice, la vier canalele de excreție ale glandelor veziculare se deschid în uretră separat de canalul deferent (Frandsen și col. 2009).

Prostata la vier este foarte redusă, având 3-4 cm lungime și 1-1,5 cm grosime. Are culoare galben-albicioasă și aspectul unui corp mic, aplatizat. Porțiunea diseminată este inclusă în peretele uretrei și înconjurată sub forma unui manșon de mușchiul uretral (Groza și Morar, 2004).

Glandele bulbo-uretrale (numite și glandele lui Cowper) sunt de dimensiuni foarte mari, având 15-16 cm lungime, 3-4 cm grosime și cântărind 150-200g. Ele sunt dispuse de la nivelul arcadei ischiatice și se continuă de o parte și de alta a uretrei până la arcada pubiană, unde vin în contact cu glandele seminale. Glandele bulbo-uretrale au aspectul literei „H”, datorită unei punți musculare dispuse transversal (Ardelean, 2002).

## 1.2. FIZIOLOGIA FUNCȚIEI GENITALE LA VIER

Materialul seminal este un lichid biologic rezultat din amestecul elaboratului provenit din testicul, epididim, canale (și ampule) diferențiale, glande veziculare, prostată și glande bulbo-uretrale. Ejaculatul este format din două părți: a) spermatozoizii și fluidul testicular; b) plasma seminală produsă de glandele anexe și căile de excreție ale testiculului (Groza și Morar, 2004).

Spermogeneza (formarea materialului seminal) are loc în timpul ejaculării, fiind periodică, deși părțile componente ale spermei (spermatozoizii și secrețiile glandelor anexe) se produc continuu. Amestecul dintre spermatozoizi și plasma seminală se face treptat, în timpul ejaculării (Bogdan, 1999).

### 1.2.1. Spermatogeneza

Cea mai importantă funcție a testiculelor este spermatogeneza, proces complex prin care spermatozoizii, celule extrem de specializate, iau naștere din celulele germinale primitive masculine (Kuster și Althouse, 2006). Aceasta include totalitatea diviziunilor mitotice ale spermatogoniilor, diviziunile meiotice ale spermatocitelor, cât și procesele caracteristice transformării spermatidelor în spermatozoizi (Figura 1.3). La suine, spermatogeneza durează de obicei 34-36 de zile (Bonet și col., 2013).

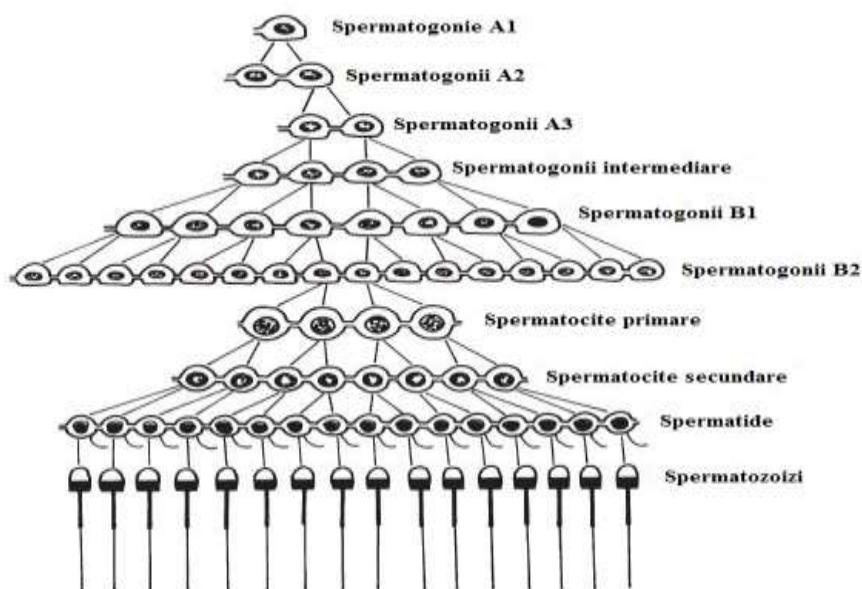


Figura 1.3. Spermatogeneza (după Noakes și col., 2001)

Figure 1.3. The spermatogenesis (Noakes et al., 2001)

În condiții normale, spermatogeneza la vier este un proces continuu, spermatozoizii formați părăsesc tubii testiculari în „valuri-valuri”, ajungând în

căile de excreție. Pentru formarea spermatozoidului dintr-un spermatocit primar la vier sunt necesare cca. 25 de zile, din care aproximativ 13 zile sunt necesare pentru profaza meiotică și diviziunea de reducere, iar 12 zile pentru transformarea spermatidei în spermatozoid (Bogdan, 1999).

Spermatogeneza este constituită din două mari faze: spermatocitogeneza și spermiogeneza.

#### *1.2.1.1. Spermatocitogeneza*

Spermatocitogeneza (spermocitogeneza) este etapa de la spermatogonie la spermatidă. Spermatogoniile derivă din gonocitele cordoanelor sexuale ale testiculului fetal și sunt localizate într-un singur rând pe vitroasa tubului seminifer. Spermatogoniile sunt de două tipuri: A („prăfoase”) și B („crustoase”). Spermatogoniile de tip A vor forma prin mitoză spermatogonii intermediare, care trec prin perioada de creștere devenind spermatociți de ordinul I. (primari). Aceștia se dispun pe 2-3 rânduri deasupra spermatogoniilor din care iau naștere prin mitoză. Spermatociții secundari (spermatociții de ordinul II) sunt celule haploide, derivă prin meioză și sunt dispuse deasupra spermatociților primari (Runceanu și Cotea, 2001).

Spermatocitogeneza cuprinde trei perioade:

a) Perioada germinativă (de multiplicare, de diviziune), etapa în care spermatogoniile de tip A se divid eucariot, rezultând spermatogonii intermediare cu un număr diploid de cromozomi ( $2n$ ).

b) Perioada de creștere în care spermatogoniile intermediare intră într-o lungă perioadă intermitotică; citoplasma lor acumulează substanțe nutritive și devin spermatociți primari (de ordinul I) a căror garnitură cromozomială este tot diploidă ( $2n$ ).

c) Perioada de maturare, caracterizată prin diviziunea reduțională a spermatocitului primar prin care rezultă două spermatocite de ordinul II (secundare). Ca urmare a acestei diviziuni, spermatocitul secundar este haploid ( $n$ ) (Cotea, 2004).

#### *1.2.2.2. Spermiogeneza*

Modificările morfologice pe care le suferă spermatida pentru a deveni spermatozoid, constituie procesul de spermiogeneză (Runceanu și col., 2002). La vier, procesul de diferențiere a unei spermatide în spermatozoid și eliberarea acestuia din celulele Sertoli în lumenul tubilor seminiferi durează 14 zile (Bonet și col., 2013).

Această etapă se mai numește și spermatelioză sau perioada de metamorfoză. În această perioadă au loc modificări citofiziologice care

transformă spermatida în spermatozoid, trecând prin mai multe faze, respectiv: faza Golgi, faza cap, faza acrozomică și faza finală (de maturare) (Bogdan, 1999; Bonet și col., 2013).

Faza Golgi se caracterizează prin deplasarea aparatului Golgi al spermatidei și a granulelor proacrozomice ale idiozomului, spre partea anterioară a nucleului (Bogdan, 1999). Microtubulii centrului celular migrează în citoplasma polului posterior al nucleului. În această zonă, cei doi centrioli se separă, unul se evidențiază în vecinătatea polului posterior al nucleului (centriolul proximal), iar celălalt în apropierea membranei celulare (centriolul distal) (Cotea, 2004).

Faza cap în care veziculele paraacrozomiale se unesc într-o singură veziculă (vezicula acrozomală) care se separă de aparatul Golgi și se dispune la polul anterior al nucleului. O mare parte din microtubuli se condensează între cei doi centrioli și structurează filamentul axial, care va constitui viitoarea axonemă a spermatozoizilor (Cotea, 2004).

Faza acrozomică se caracterizează prin schimbarea formei nucleului, care devine alungit și este acoperit în jumătatea anterioară de acrozom, iar cealaltă jumătate formează „capul postnuclear”. Filamentul axial al cozii se alungește; în această fază se formează centriolul inelar (Bogdan 1999).

Faza finală (de maturare) presupune transformări mai ales la nivelul cozii spermatozoidului. Filamentul dublu mitocondrial specific spermatozoidului se formează în această etapă prin dispunerea a 15-25 mitocondrii în jurul axonemei piesei intermediare. La nivelul gâtului sau al piesei intermediare se evidențiază prezența unei porțiuni de citoplasmă, numită „picătura citoplasmatică”, caracteristică spermatozoizilor imaturi. Aceasta va migra către vârful cozii în timpul procesului de maturare, lipsind la spermatozoidul matur.

La sfârșitul spermiogenezei spermatozoidul este matur din punct de vedere morfologic, dar încă imatur funcțional.

Integritatea funcțională este dobândită în timpul pasajului prin căile spermatice, în principal prin epididim. După ce sunt formate, celulele spermatice trec prin rețeaua testiculară și pătrund în capul și corpul epididimului, unde sunt modificate pentru a deveni fertile. Spermatozoizii care pătrund în coada epididimului sunt deja capabili să fertilizeze, în cazul în care sunt recoltați și incubați într-un mediu tampon adecvat (Akers și Denbow, 2013).

### **1.2.2. Reglarea neuro-endocrină a spermatogenezei la vier**

Reglarea funcției sexuale la masculi, inclusiv spermatogeneza, se realizează în trei trepte funcționale care se stimulează sau se inhibă reciproc: hipotalamus, adenohipofiza și gonadele. Pe lângă acestea, mai există și alte sisteme ce

interven în funcția de reproducție, fiind cunoscute de exemplu rolurile tiroidei, suprarenalei, timusului sau epifizei (Runceanu și col., 2007).

Nucleii din hipotamusul mijlociu și posterior compun aria hipofizotropă, de formă semilunară, care produce neurosecrețiile ce reglează activitatea antero-hipofizei. Aceste neurosecreții inhibă sau stimulează eliberarea hormonilor gonadotropi antehipofizari, iar din acest motiv se numesc „**releasing hormones**” (factori de eliberare) sau „**inhibiting hormones**” (hormoni de inhibiție) (Groza și Morar, 2004).

La nivelul zonei hipofizotrope din hipotamus există doi centri: **centrul tonic**, prezent atât la mascul cât și la femelă și care contribuie la eliberarea continuă a gonadotropinelor la un nivel scăzut, constant și pulsatil menținând astfel tonusul și troficizarea gonadelor și **centrul ciclic**, prezent doar la femele care eliberează la un nivel ridicat neurosecreții în faza foliculară preovulatorie (Groza și Morar, 2004).

Legătura între hipotamus și hipofiză se realizează prin mai multe căi: **o conexiune vasculară**, reprezentată de sistemul port hipotalamo-hipofizar Popa-Fielding, care cuprinde o primă rețea capilară la nivelul nucleilor și neuronilor hipotalamici, vase portale care șerpuiesc în tija hipofizară și o a doua rețea capilară la nivelul celulelor hipofizare; **o conexiune nervoasă cu adenohipofiza**, mai redusă, formată din fibrele unor fascicule ce se termină în punctul de contact al vaselor din rețeaua capilară; și **conexiunea nervoasă cu neurohipofiza** alcătuită din fibre nervoase ce provin din nucleii supraoptic și paraventricular (Runceanu și col., 2007).

Neurosecrețiile hipotalamice cu acțiune asupra hipofizei sunt transportate la aceasta prin conexiunea vasculară.

Principiile reproducției la masculi se desfășoară după un model asemănător celui de la femele (figura 1.4.). Hormonii responsabili pentru dezvoltare și menținerea fenotipului mascul sunt tot gonadotropinele, respectiv **hormonul luteinizant** (LH, care la masculi este adesea numit hormonul de stimulare a celulelor interstițiale-ICSH) și **hormonul de stimulare foliculară** (FSH, numit uneori la masculi hormonul de stimulare a spermatogenezei-SSH), produși de hipofiză; **hormonii steroizi**, inclusiv testosteronul produs de testicule și **inhibina**. Hormonii steroizi femeli, estradiolul și estrona, joacă de asemenea un rol important la mascul în anumite circumstanțe (Ptaszynska, 2009).

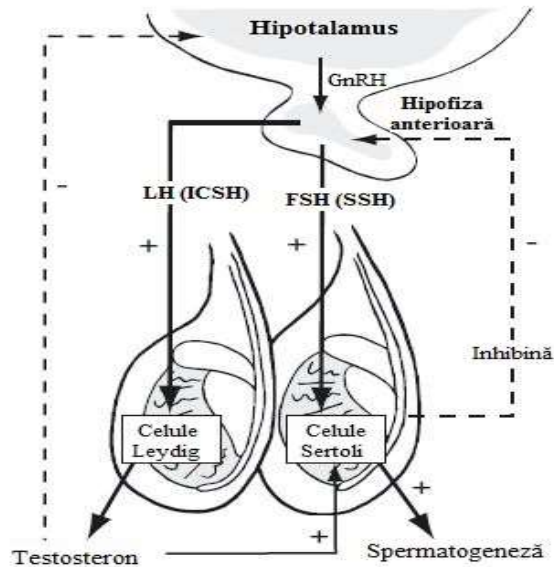


Figura 1.4. Schema reglării neuro-endocrine a funcției sexuale la masculi (după Ptaszynska, 2009)

Figure 1.4. Neurohormonal regulation of sexual function in males (Ptaszynska, 2009)

Gonadotropinele hipofizare (FSH și LH) sunt sintetizate și secretate ca răspuns la acțiunea factorului de eliberare a gonadotropinelor (Gn-RH). La nivel local, unele funcții ale testiculului sunt reglate de asemenea de factorii paracrinii și autocrini intratesticulari dar sunt influențate și de unii regulatori endocrini metabolici. Secreția de LH este pulsatilă, ca efect al stimulării episodice a hipofizei de către Gn-RH, având ca rezultat episoade neregulate de eliberare de LH la fiecare 2-4 ore. Principalul efect al LH este asupra celulelor Leydig, în care controlează sinteza testosteronului (Parkinson, 2009a). Titlul ciclic de LH va determina o secreție în valuri a testosteronului. Vârful concentrației de testosteron îl urmează pe cel al concentrației de LH la circa 40 de minute după care nivelul de testosteron scade până la valoarea de dinaintea stimulării după alte 40-80 minute (D'Occhio și col, 1982, citat de Parkinson, 2009a).

Valul de testosteron produs sub influența LH-ului acționează printr-un mecanism de feed-back negativ asupra hipotalamusului inhibând producția de Gn-RH și prevenind astfel acumularea excesivă de testosteron în sânge.

Cealaltă gonadotropină hipofizară, FSH-ul, acționează împreună cu testosteronul, asupra celulelor Sertoli din tubii seminiferi ai testiculelor la momentul pubertății pentru a iniția producția spermatică. După acest moment, de-a lungul vieții adulte, FSH-ul acționează direct asupra tubilor seminiferi

(celulelor germinale și celulelor Sertoli), stimulând spermatogeneza. Celulele Sertoli produc inhibină, care acționează printr-un mecanism de feed-back negativ inhibând secreția de FSH din hipofiză (Ptaszynska, 2009). Deși există unele dovezi privind existența unui model pulsatil și în cazul secreției de FSH, este totuși general acceptat că secreția acestuia nu este pulsatilă, ca în cazul LH-ului și că prezintă doar fluctuații pe termen lung (Parkinson, 2009a).

Hormonii steroizi masculi (androgenii) sunt produși atât la masculi cât și la femele, iar reprezentantul cel mai important al acestei grupe este testosteronul. Ceilalți androgeni sunt considerați metaboliți ai testosteronului și sunt următorii: androstendion, epistestosteron, androsteron și 5-alfa-dehidro-testosteron. (Drugociu, 2009).

Androgenii sunt secretați în principal de către testicul, dar și de către ovar, cortexul suprarenal și placentă, iar principalul hormon reglator al secreției lor este LH-ul (ICSH). Metaboliții androgenilor naturali se elimină prin urină, sub formă de 17- cetosteroizi (Cernescu, 2004).

Testosteronul este necesar pentru producția de spermatozoizi și pentru maturarea lor ulterioară în epididim, cât și pentru buna funcționare a glandelor sexuale anexe. Menținerea unei concentrații ridicate de testosteron în interiorul tubilor seminiferi și în epididim este indispensabilă formării și maturării spermatozoidelor la o rată normală, și este asigurată de proteina de legare a androgenilor (ABP – androgen binding protein), produsă de celulele Sertoli (Parkinson, 2009a). Totuși, deși spermatogeneza necesită testosteron iar scăderea concentrației acestui hormon ar duce la obținerea unui număr mai redus de spermatozoizi, se pare însă că există o valoare maximă după care creșterea titrului de testosteron nu duce la o producție mai mare de spermatozoizi (Pinart și Puigmulé, 2013).

În apropierea pubertății, testosteronul inițiază spermatogeneza la nivelul epiteliului germinativ al tubilor seminiferi din testicule, în sinergism funcțional cu hormonul anterohipofizar FSH (care la mascul este hormonul de stimulare al spermatogenezei=SSH) (Bogdan, 1999). De asemenea, testosteronul și ceilalți androgeni sunt responsabili pentru diferențierea și maturarea organelor sexuale, dezvoltarea și consolidarea caracterelor sexuale secundare (Ptaszynska, 2009) precum și pentru inducerea comportamentului sexual specific masculilor (Kuster și Althouse, 2006).

### **1.2.3. Reflexele sexuale**

Comportamentul sexual, respectiv modul de desfășurare a reflexelor sexuale, este caracteristic la vieri (Bogdan, 1999).

**Reflexul de apropiere** este prezent întotdeauna și constituie un adevărat „preludiu”. Vierul se plimbă în jurul scroafei, scoate un grohăit caracteristic, o miroase în regiunea vulvei, o împinge cu râtul, mai ales în regiunea flancului. Uneori vierul face mișcări rapide de masticație iar saliva este transformată în spumă (Groza și Morar, 2004). La suine, mirosul vierului și căutările scroafei, contactul nazo-nazal și cel nazo-vulvar, salivația și grohăiturile virului dar și loviturile executate cu capul de către vier în flancul femelei sporesc starea de excitație sexuală a celor doi parteneri și conduc la sincronizarea comportamentală (Roșca, 2004).

**Reflexul de erecție** la vier începe prin ieșirea treptată a penisului din furou și se completează prin ștergerea S-ului penian (Runceanu și col, 2007). Durata preludiului (a reflexelor de apropiere și de erecție) variază în limite largi, între 1-20 de minute, în funcție de vârsta, de solicitarea vierului, de condițiile de alimentație, de întreținere și de individ (Bogdan, 1999; Groza și Morar, 2004).

**Reflexul de îmbrățișare** se manifestă prin saltul masculului în regiunea crupei scroafei și prin încercări de introducere a penisului în vagin. Vierii mai tineri sau cei maturi epuizați coboară de pe scroafă și fac saltul din nou, de câteva ori la rând, fapt întâlnit și dacă scroafa este prea agitată sau nu acceptă vierul (Bogdan, 1999).

Reflexele de erecție și îmbrățișare apar înaintea maturizării sexuale, datorită secreției tot mai crescute de testosteron (Groza și Morar, 2004).

**Reflexul de intromisiune** se desfășoară, ca și la celelalte specii, cu mai multe sau mai puține mișcări de căutare a vaginului, în funcție de experiența sexuală a vierului și de existența căldurilor la scroafă (Bogdan, 1999). După introducerea penisului în vagin, vierul execută mișcări de lateralitate, schimbându-și greutatea de pe un membru, timp în care coada se mișcă ritmic (Groza și Morar, 2004).

**Reflexul de ejaculare** este marcat de oprirea mișcării, iar vierul se sprijină liniștit pe scroafă. Se deosebește de cel al masculilor celorlalte specii prin durata lungă, în medie 4-8 minute, cuprinzând trei faze distincte: *faza prespermatică*, cu o durată de 1-2 minute constând în eliminarea secreției glandelor bulbo-uretrale, 10-15 ml; *faza spermatică (sau principală)*, cu o durată de 1-3 minute, constând în eliminarea spermatozoizilor și a lichidului prostatic și în mare parte a conținutului glandelor veziculare și bulbo-uretrale, în cantitate totală de 12-250 ml; *faza postspermatică*, care durează 1-5 minute, constând în eliminarea spermatozoizilor rămași în uretră și a conținutului glandelor veziculare și bulbo-uretrale, în cantitate totală de 50-100 ml (Groza și Morar, 2004; Runceanu și col., 2007). Ejacularea se produce direct în uter, care este încărcat cu material seminal imediat după copulare, în timp ce cervixul este

de obicei etanșat cu ajutorul unui dop gelatinos, parte a fracțiunii postspermatice. Volumul mare de material seminal ejaculat de vier este necesar pentru a conduce spermatozoizii pe lungimea extinsă a uterului scroafei (Parkinson, 2009a).

Reflexele de intromisiune și de ejaculare apar numai după instalarea maturității sexuale, respectiv după câteva încercări nereușite (Groza și Morar, 2004).

La scurt timp după actul sexual, vierul adoptă frecvent poziția decubitală (Roșca, 2004).

## **CAPITOLUL II. SEZONALITATEA PROCESELOR DE REPRODUCȚIE LA SUINE**

### **CHAPTER II. SEASONALITY OF REPRODUCTION IN SWINE**

Deși nu se poate vorbi despre o reproducție sezonieră așa cum se întâlnește la alte animale domestice cum ar fi ovinele și caprinele, totuși un anumit grad de sezonalitate a funcției genitale poate fi observată și la suine, aspect descris în diverse arii geografice cât și în diferite sisteme de producție și condiții de întreținere (Auvigne și col. 2010).

Acest fenomen a fost denumit „Infertilitate de sezon” și este definit ca o stare de fertilitate redusă a scroafelor în timpul verii și toamnei timpurii. Semnele subfertilității includ rate reduse ale fătărilor, prolificitate mai mică, intervale mai ridicate între înțarcare și estru, întârzieri ale instalării pubertății la scrofițe (Peltoniemi și Kemp, 2009; Kraeling și Webel, 2015), sau chiar procente mai mari ale avorturilor (Peltoniemi și col., 2000).

Problemele de fecunditate în sezonul cald sunt cauzate atât de diminuarea funcției genitale la scroafe, cât și de scăderea calității materialului seminal. Mecanismele intime ale fluctuațiilor sezoniere ale performanțelor sexuale nu sunt pe deplin cunoscute, unii autori indicând existența unui mecanism ancestral, provenit de la mistreț, care este încă prezent la rasele moderne, de producție (Ciereszko și col, 2000). Porcul mistreț este strămoșul filogenetic al porcului domestic (Almeida și col., 2006) și are activitate sexuală sezonieră, cu sezonul de împerechere desfășurându-se la sfârșitul toamnei – începutul iernii, ceea ce va duce la parturiții în timpul primăverii. În timpul verii și începutului de toamnă scroafele sălbatice prezintă anestrul, iar masculii lor înregistrează o scădere a nivelului de testosteron și a dimensiunilor testiculare (Tast și col., 2001). În mod similar, la rasele domestice se observă o scădere a indicatorilor de reproducție în timpul verii, însă cu o amplitudine mai mică, neînregistrându-se starea de anestrul, această ameliorare fiind probabil rezultatul adaptării la condițiile mai bune și mai uniforme de întreținere comparativ cu viața în sălbăticie.

Cel mai important factor de mediu în reglarea sezonality funcției sexuale la suine îl reprezintă fotoperioada, cu un efect potențat de temperaturile ridicate din timpul verilor călduroase (Kraeling și Webel, 2015). În zonele temperate, animalele se confruntă cu schimbări recurente, sezoniere, de temperatură, climat și disponibilitate a hranei, care le influențează activitatea reproductivă. O proprietate obișnuită a celor mai multe animale sălbatice dar și a unor animale domestice este reproducția sezonieră, care favorizează parturiția într-un

moment optim al anului, de obicei primăvara, ceea ce permite puilor nou-născuți să crească în condiții optime de climat și disponibilitate a hranei până la iarna următoare (Ptaszynska, 2009). La porcii sălbatici, descreșterea fotoperioadei înregistrată spre sfârșitul verii reprezintă un semnal ce indică o perioadă nepotrivită pentru împerechere, deoarece purceii ar fi născuți în timpul iernii, ceea ce le-ar reduce șansele de supraviețuire (Peltoniemi și Kemp, 2009). Fotoperioda reglează ritmul circanual fiziologic prin modificarea ritmului circadian de secreție a melatoninei de către hipofiză (Peltoniemi și col., 2000; Tast și col., 2001), influențând astfel manifestarea funcției genitale, deoarece stimularea receptorilor de melatonină localizați în hipotalamus joacă un rol semnificativ în eliberarea GnRH-ului și a secreției ulterioare de gonadotropine de către hipofiză (Peltoniemi și Virolainen, 2006).

Pe lângă regimul de lumină, există și alți factori care afectează desfășurarea sezonului de împerechere, cum ar fi temperatura, interacțiunile sociale sau disponibilitatea hranei (Tast și col., 2001), iar în condițiile domestice de întreținere unii factori precum rația îmbelșugată și microclimatul confortabil au contribuit la abolirea anestrului de sezon observat la porcii sălbatici. Totuși, unele efecte variabile ale descreșterii fotoperioadei asupra activităților de reproducție ale scoafelor domestice sunt încă observate în lunile de vară târzie și toamnă (Peltoniemi și Kemp, 2009).

După cum s-a menționat mai sus, caracterul sezonier al funcției genitale la suine afectează și masculii. Mecanismele ancestrale afectează și parametrii seminali, mai ales în ceea ce privește volumul ejaculatului și numărul de spermatozoizi/ejaculat, valorile fiind mai mari pentru ambii parametri în timpul toamnei și iernii (Smital, 2010; Pinart și Puigmulé, 2013). Variabilitatea indicatorilor spermatici de la un sezon la altul a fost observată în urmă cu mulți ani. Începând cu a doua jumătate a secolului XX, au început să se realizeze diverse studii în care să se precizeze cu exactitate condițiile și limitele de variație ale parametrilor spermatici de-a lungul unui an, în vederea instituirii unor măsuri care să asigure menținerea calității spermei de vier la un nivel ridicat indiferent de perioadă. Aceste studii continuă chiar și în ziua de astăzi, obținându-se detalii din ce în ce mai intime legate de stress-ul provocat de variațiile sezoniere asupra producției și calității spermatice la vier.

Unul dintre primele studii în legătură cu aceste aspecte a fost realizat de Lawrence și col. în anii 1966-1967 și publicat în anul 1970. Recoltând material seminal de la 9 vieri, pe o perioadă de timp cuprinsă între lunile iulie-ianuarie, ei au obținut cele mai mari valori ale volumului și numărului total de spermatozoizi/ejaculat în lunile Octombrie, Noiembrie și Decembrie, când temperaturile maxime nu au depășit 24,7 °C (studiul a fost realizat în Oklahoma,

SUA). Totuși, pe durata acestui interval de timp, calitatea spermei (evaluată prin procentul de spermatozoizi anormali) a cunoscut un nivel mai scăzut. Incidența ridicată a spermatozoidilor anormali din timpul sezonului rece a fost explicată de autori prin durata procesului de spermatogeneza și perioada ridicată de timp pe care spermatozoidii o petrec în organele genitale de la formare până la ejaculare. Așadar, formele anormale apărute în Octombrie au fost considerate a fi produse în Iulie și August, în condițiile unor temperaturi ridicate, fiind cunoscut faptul că spermatozoidii sunt sensibili la căldura excesivă. Pe același principiu, spermatozoidii ejaculați în Iulie și August sunt produși în condițiile unor temperaturi mai scăzute, fiind astfel de o calitate superioară. Totuși, această teorie se află în contradicție cu procente mari de spermatozoizi anormali ce au continuat să apară în sezonul rece. Ca și concluzie generală, cercetătorii au conștientizat că temperaturile extreme, atât cele ridicate cât și cele scăzute, afectează funcția de spermatogeneză. (Lawrence și col., 1970).

Valori mai mici ale volumului ejaculat în timpul verii au fost observate și de către Cheon și col, (2002). Aceștia au raportat și o variabilitate a pH-ului spermatic (cu valori mai mari toamna și iarna), precum și a titrului de testosteron seric (cu valori superioare primăvara). Prin analiza materialului seminal după congelare, ei au observat valori mai bune pentru procentul mobilității și integritatea acrozomială în timpul primăverii, ceea ce i-a condus la concluzia că un titru mai ridicat de testosteron va ajuta la obținerea de material seminal cu o calitate superioară, reflectată printr-o rezistență mai mare la conservare (tabelul 2.1).

**Tabelul 2.1./Table 2.1.**

Valorile testosteronului seric și comparația între mobilitate și integritatea acrozomului la sperma brută și sperma decongelată, în funcție de sezon (după Cheon și col, 2002)

Serum testosterone values and comparison of sperm motility and acrosome integrity among seasons in raw and cryopreserved boar semen (Cheon et al., 2002)

| Sezon     | Concentrația testosteronului seric (ng/ml) | Sperma brută   |                                      | Sperma decongelată |                                      |
|-----------|--------------------------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
|           |                                            | Mobilitate (%) | Spermatozoizi cu acrozom integru (%) | Mobilitate (%)     | Spermatozoizi cu acrozom integru (%) |
| Primăvara | 3,06                                       | 88,8           | 93,3                                 | 40,9               | 48,0                                 |
| Vara      | 0,73                                       | 90,0           | 95,3                                 | 19,4               | 22,8                                 |
| Toamna    | 1,31                                       | 86,3           | 96,0                                 | 35,0               | 26,7                                 |
| Iarna     | 1,36                                       | 88,8           | 96,5                                 | 30,9               | 19,8                                 |

Un studiu de amploare mai mare a fost realizat de Janett și col., în anul 2005. Ei au realizat o serie de determinări timp de 3 ani, pe un număr de 1686 de ejaculate, provenite de la 491 de vieri. Ejaculatele au fost recoltate în Februarie (iarna), Mai (primăvara), August (vara) și Noiembrie (toamna). Pentru fiecare ejaculat în parte, s-a evaluat volumul, concentrația, numărul total de spermatozoizi, mobilitatea și procentul de spermatozoizi normali. În timpul întregului studiu, au putut fi observate variații sezoniere pentru toți parametrii spermatici. Rezultatele lor pot fi observate în tabelul 2.2.

**Tabelul 2.2./Table 2.2.**

Variațiile sezoniere ale parametrilor spermatici la vier  
(după Janett și col., 2005)

Seasonal variations of main seminal parameters in boar (Janett et al., 2005)

| Luna      | Volum (ml) | Concentrație ( $\times 10^6$ ./ml) | Nr. total de spermatozoizi /ejaculat( $\times 10^9$ ) | Mobilitate (%) | Spermatozoizi cu morfologie normală (%) |
|-----------|------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------|
| Mai       | 180,9      | 308,0                              | 54,2                                                  | 80,7           | 81,7                                    |
| August    | 188,5      | 288,6                              | 52,7                                                  | 79,7           | 78,7                                    |
| Noiembrie | 209,7      | 270,3                              | 55,5                                                  | 79,9           | 81,6                                    |
| Februarie | 185,6      | 308,9                              | 55,2                                                  | 79,9           | 82,9                                    |

Din datele oferite de Janett și col. (2005), reiese că cea mai mare cantitate de material seminal (atât ca volum cât și ca număr total de spermatozoizi) este oferită în luna Noiembrie (toamna). Pe de altă parte, calitatea materialului seminal (exprimată prin procentul de spermatozoizi cu morfologie normală) este superioară în luna Februarie (iarna). Mobilitatea s-a păstrat în limite apropiate, dar a prezentat valori ușor mai mari în luna Mai (primăvara) (Janett și col., 2005). Valorile parametrilor spermatici nu au variat în limite foarte largi, însă, ca și concluzie generală, s-a putut afirma că producția cea mai slabă de material seminal (atât cantitativ cât și calitativ) s-a înregistrat în timpul verii.

Pentru un studiu mai amănunțit al modificărilor caracteristicilor materialului seminal în funcție de sezon, Murase și col. (2007) au studiat caracteristicile compoziției plasmei seminale și sensibilitatea acrozomului la acțiunea ionilor de calciu și a ionoforului de calciu A23187, în vederea realizării reacției acrozomiale. Pentru aceasta, ei au recoltat material seminal lunar, pe parcursul unui an întreg, de la 3 vieri din rasa Marele Alb.

După cum se știe, spermatozoizii de mamifere trebuie să sufere un proces de exocitoză la nivelul acrozomului (așa-numita reacție acrozomială), la locul de fecundare, ca răspuns la stimulii transmiși de ovocit, prin care eliberează enzime ce îi ajută la penetrarea învelișului extern al ovulului (Runceanu și col.,

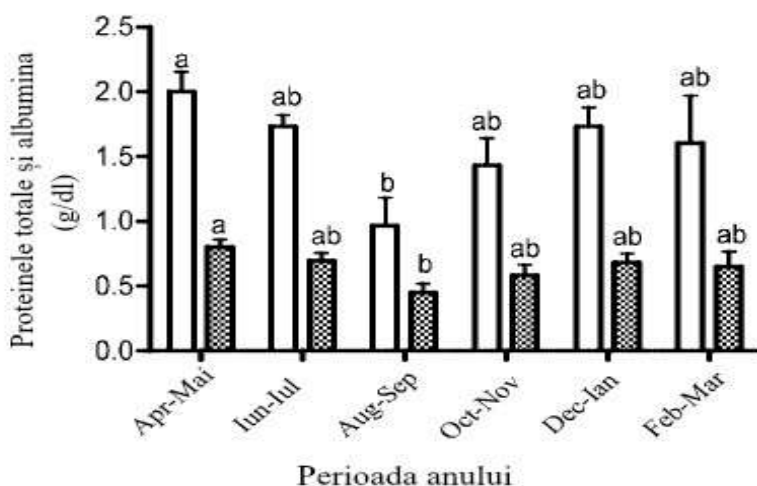
2007; Sun și col., 2011). Reacția acrozomială reprezintă așadar o etapă a fecundării, iar abilitatea unui spermatozoid de a manifesta reacția acrozomială este una dintre proprietățile esențiale necesare pentru fertilizarea ovocitului (Althouse, 2006). Este de menționat însă faptul că dacă se realizează prea devreme, cu mult timp înainte ca spermatozoidul să întâlnească ovulul, succesul fecundării este afectat (Yeste, 2013), iar o declanșare a sa prea rapidă este un semn al unor tulburări de integritate a acrozomului. Prin inducerea sa experimentală, s-a demonstrat că reactivitatea exagerată a acrozomului este corelată negativ cu prolificitatea la scoafe (Holt și col., 1997). Cea mai utilizată metodă de inducere artificială a reacției acrozomiale este cu ajutorul ionoforului  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 (Holt și col, 1997; Murase și col., 2007; Birck și col., 2009; Li și col., 2010), dar poate fi obținută și prin folosirea unor agoniști naturali, cum ar fi progesteronul și proteine specifice ale zonei pellucida.

Studiul condus de Murase (2007) a încercat examinarea variațiilor sezoniere ale unor parametri spermatici, ale compoziției plasmei seminale și ale sensibilității acrozomului la acțiunea ionoforului  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 și realizarea unor corelații cu rata fătărilor la scoafele însămnănate. Rezultatele obținute au fost concludente.

În ceea ce privește **parametrii generali ai spermei**, volumul materialului seminal a fost mai mare în timpul toamnei. Volumul fracțiunii bogate în spermatozoizi nu a variat semnificativ, în schimb cel al fracțiunii sărace în spermatozoizi a prezentat variații însemnate. Așadar, cantitatea mai mare de spermă obținută în această perioadă a anului se datorează creșterii volumului fracțiunii sărace în spermatozoizi. Valorile concentrației nu au prezentat oscilații majore, deși s-a putut observa o ușoară scădere a concentrației în timpul toamnei, fapt explicat probabil prin creșterea cantității fracțiunii sărace în spermatozoizi. Relativ constant a fost și numărul total de spermatozoizi din întregul ejaculat. În schimb, mobilitatea a variat semnificativ prezentând valori minime în lunile August-Septembrie și maxime în lunile Aprilie-Mai. Diferențe semnificative s-au înregistrat și în cazul nivelului de aglutinare cu un vârf în August-Septembrie și un nivel minim în Decembrie-Ianuarie. Procentul spermatozoidilor cu acrozom intact a prezentat variații notabile, în funcție de sezonul de recoltare. Astfel, cea mai mare valoare a fost observată în Aprilie-Mai, iar cea mai mică în August-Septembrie. Oscilații semnificative au fost înregistrate și în cazul procentului de spermatozoizi cu morfologie anormală și imaturi, cele mai mari valori fiind înregistrate în August-Septembrie, iar cele mai mici în Aprilie-Mai. Ca și concluzie parțială, cele mai mici valori pentru mobilitate, procent de spermatozoizi cu acrozom intact și cu morfologie normală, precum și nivelul cel mai ridicat al aglutinării au fost înregistrate în

timpul lunilor August-Septembrie, ceea ce coincide cu valorile cele mai mari ale temperaturii ambientale și umidității. (Murase și col., 2007)

În ceea ce privește **compoziția plasmei seminale**, concentrațiile calciului au fost surprinzător de stabile pe parcursul anului, pe când concentrațiile ionilor de sodiu și clor au tins să fie mai ridicate iar cele ale potasiului și magneziului mai scăzute în timpul verii. Totuși, diferențele între sezoane nu au fost majore pentru niciunul dintre ioni. Variații remarcabile au fost observate însă în concentrațiile proteinelor totale și albuminei, cu cele mai mici valori în August-Septembrie și cele mai mari în Aprilie-Mai. (figura 2.1)



**Figura 2.1.** Variația sezonieră a valorilor proteinelor totale (spațiu necolorat) și albuminei (spațiu hașurat) în plasma seminală la vier (după Murase și col., 2007)

**Figure 2.1.** Seasonal variations of total proteins (white) and albumins (grey) in boar seminal plasma (Murase et al., 2007)

De asemenea, nivelul testosteronului din plasma seminală a oscilat destul de mult de-a lungul anului. Acesta a început să crească în jurul solstițiului de vară (Iunie), a crescut treptat către solstițiul de iarnă (Decembrie) cu un vârf în Octombrie-Noiembrie și o cădere bruscă în Decembrie-Ianuarie. Nivelul cel mai scăzut s-a înregistrat în Februarie-Martie. Așadar, nivelul testosteronului a început să crească în perioada în care durata zilei a început să scadă, și a scăzut atunci când durata zilei a început să crească. Aceste rezultate întăresc concepția că variațiile în durata fotoperioadei reprezintă mecanismul major care stă la baza fluctuației hormonilor steroizi atât în plasma sanguină cât și în cea seminală (Murase și col., 2007).

Referitor la **inducerea reacției acrozomiale de către ionoforul  $\text{Ca}^{2+}$  A23187**, se pare că aceasta se manifestă mai rapid dar și într-o proporție mai ridicată în lunile August-Septembrie (procentul de spermatozoizi ce suferă acest proces la 0, 5 și 10 minute după stimulare este cel mai ridicat în această perioadă a anului). La polul opus se află lunile Aprilie-Mai, când un procent mult mai mic de spermatozoizi suferă reacția acrozomială la 0, 5 și 10 minute după stimularea cu  $\text{Ca}^{2+}$ /A23187. Așadar, se pare că stabilitatea membranei acrozomiale este mai scăzută în timpul verii. Deoarece membrana acrozomului trebuie să fie stabilă atunci când momentul ovulației este încă departe, iar destabilizarea trebuie să intervină doar în apropierea ovulului, e posibil ca sperma colectată în timpul verii să aibă un grad redus de fertilitate. Probabil că o reacție acrozomială prematură are ca rezultat reducerea numărului de spermatozoizi disponibili de a interacționa cu ovocitul la locul de fecundare. Așadar, frecvența mai ridicată a acrozomilor anormali, corelată cu răspunsul mai rapid la stimulii ce declanșează reacția acrozomială poate reprezenta unul dintre principalele mecanisme responsabile de infertilitatea sezonieră (Murase și col., 2007).

Răspunsul acrozomului la acțiunea ionoforului  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 se află în legătură cu nivelul proteinelor plasmatică din materialul seminal. O parte din aceste proteine cum ar fi unele adevine, superoxid-dismutaza și glutatoniul au rol în protejarea membranei spermatozoidului și prin urmare un nivel scăzut al acestora va conduce la creșterea sensibilității membranei acrozomiale.

În studiul echipei japoneze, sensibilitatea cea mai mare a acrozomului la acțiunea A23187 a coincis, ca perioadă a anului, cu cel mai mic nivel al mobilității, cea mai mare rată a aglutinării, cea mai mică proporție de spermatozoizi cu acrozom intact, cel mai mare procent de spermatozoizi cu anomalii, cele mai mici concentrații de proteine totale și albumine în plasma seminală și mai ales, **cele mai mari valori ale temperaturii ambientale și umidității relative** înregistrate pe perioada cercetărilor (Murase și col., 2007).

În ceea ce privește **fertilitatea materialului seminal**, practic elementul hotărâtor în aprecierea calității spermei, au fost observate de asemenea variații sezoniere. Cea mai mică valoare pentru rata fătărilor a fost observată în perioada August-Septembrie iar cea mai mare în Aprilie-Mai (tabelul 2.3.). Aceste rezultate au fost privite în paralel cu variațiile parametrilor spermatici (mobilitate, gradul de aglutinare, integritatea acrozomului, proporția anomaliilor și a spermatozoidilor imaturi), reconfirmându-se astfel legătura dintre calitatea mai scăzută a materialului seminal cu așa-numita “infertilitate de vară”. Scăderea concentrației proteinelor totale și a albuminei precum și răspunsul mai rapid al acrozomului celulei seminale la  $\text{Ca}^{2+}$ /A23187 concomitent cu

înregistrarea unei rate a fătărilor redusă, demonstrează că acești factori pot fi de asemenea responsabili pentru fertilitatea redusă a materialului seminal (Murase și col., 2007).

**Tabelul 2.3./Table 2.3.**

Rata fătărilor după însămânțarea artificială cu material seminal obținut în diverse perioade ale anului (după Murase și col., 2007)

Farrowing rate after artificial insemination with semen collected in various moments of the year (Murase et al., 2007)

| Perioada                                 | Apr-Mai | Iun-Iul | Aug-Sep | Oct-Nov | Dec-Ian | Feb-Mar |
|------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Nr. de scroafe<br>însămânțate            | 23      | 34      | 43      | 66      | 43      | 35      |
| Nr. parturițiilor<br>după<br>însămânțare | 21      | 19      | 15      | 30      | 26      | 30      |
| Rata fătărilor                           | 91,3%   | 55,9%   | 34,9%   | 45,5%   | 60,5%   | 85,7%   |

Nivelul testosteronului, hormon ce intervine în reglarea parametrilor spermatici nu este singurul care crește după solstițiul de vară și scade după solstițiul de iarnă. Lungimea zilei-lumină este recunoscut ca fiind un modulator al producției de spermă la mamifere, prin reglarea secreției de melatonină. Acest hormon este sintetizat și secretat în timpul nopții, pe când lumina îi inhibă producția sau îi reduce concentrația. (Tast și col., 2001) Așadar, fotoperioada joacă un rol important în desfășurarea procesului de spermatogeneză (Kunavongkrit și col., 2005).

Pentru a evalua efectele creșterii și descreșterii fotoperioadei asupra unor parametri spermatici din sperma de vier o echipă de experți din Polonia condusă de Knecht (2013) a realizat un studiu pe 17 vieri (6 vieri din rasa Marele Alb Poloneză, 5 vieri din rasa Landrace Poloneză și 6 vieri hibrizi Duroc-Pietrain). Materialul seminal a fost recoltat pe durata a două perioade: una cu o fotoperioadă în creștere (Ianuarie-Iunie) și una cu o fotoperioadă în scădere (Iulie-Decembrie). Efectul fotoperioadei asupra numărului total de spermatozoizi și a ratei mobilității a fost evident, aspect vizibil mai ales prin analiza în paralel a lunilor cu numărul 4 din cele două perioade (Aprilie, respectiv Octombrie). De asemenea, a putut fi observată influența raportului zi/noapte asupra volumului și concentrației materialului seminal, cu diferențe majore între lunile cu numărul 3 din cele două perioade (Martie, respectiv Septembrie). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2.4.

**Tabelul 2.4./Table 2.4.**

Variația parametrilor spermatici la vier în funcție de caracterul fotoperioadei  
(după Knecht și col., 2013)

The variation of seminal parameters in boar according to the type of  
photoperiod  
(Knecht et al., 2013)

| Luna         | Volum (ml) |            | Concentrație ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) |            | Nr. total sperm. ( $\times 10^9$ ) |            | Nr. total de sperm. mobili ( $\times 10^9$ ) |            |
|--------------|------------|------------|------------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|----------------------------------------------|------------|
|              | Fp. cr.    | Fp. descr. | Fp. cr.                                  | Fp. descr. | Fp. cr.                            | Fp. descr. | Fp. cr.                                      | Fp. descr. |
| L1 (Ian/Iul) | 244,67     | 256,10     | 379,16                                   | 362,65     | 88,39                              | 87,54      | 72,12                                        | 72,84      |
| L2 (Feb/Aug) | 253,00     | 252,96     | 393,98                                   | 373,73     | 96,21                              | 92,67      | 79,49                                        | 77,77      |
| L3 (Mar/Sep) | 214,45     | 262,31     | 412,65                                   | 373,94     | 84,97                              | 91,74      | 70,37                                        | 76,93      |
| L4 (Apr/Oct) | 246,53     | 271,51     | 356,88                                   | 359,90     | 84,26                              | 93,50      | 70,82                                        | 78,02      |
| L5 (Mai/Nov) | 254,10     | 260,33     | 367,33                                   | 373,88     | 88,72                              | 95,19      | 73,78                                        | 80,17      |
| L6 (Iun/Dec) | 252,75     | 263,73     | 377,63                                   | 374,12     | 91,17                              | 93,07      | 76,26                                        | 76,66      |
| Medie totală | 244,25     | 261,16     | 381,27                                   | 369,70     | 88,95                              | 92,29      | 73,81                                        | 77,07      |

Fp. cr.= Fotoperioadă crescătoare; Fp. descr. = Fotoperioadă descrescătoare;

Volumul mai mare de spermă obținut în lunile de toamnă ar putea fi explicat printr-o activitate secretorie sporită a glandelor anexe (influențată de fotoperioadă), care vor produce mai multă plasmă seminală. Mai departe, cantitatea mai mare de plasmă seminală poate avea ca efect prezența în ejaculat a unui număr mai mare de spermatozoizi mobili. Durata zilei reglează și concentrația de testosteron, care intervine în reglarea spermatogenezei, precum și în maturarea spermatozoidilor. Astfel, variațiile regimului de lumină pot afecta procesul de maturare, cu scăderea mobilității. Se pare însă că această influență depinde și de rasă, parametrii spermatici variind în limite mai largi la vieri hibrizi Duroc-Pietrain, în comparație cu vieri Marele Alb (Knecht și col., 2013).

Temperatura ridicată pare să acționeze sinergic cu umiditatea relativă crescută, împreună având un efect negativ asupra spermatogenezei. Expunerea vierilor la temperaturi de 33-38°C și umiditate cuprinsă între 40-80%

va determina o scădere a mobilității și o creștere a procentului de spermatozoizi cu anomalii și imaturi. Pe de altă parte, controlul artificial al regimului de lumină influențează numărul total de spermatozoizi/ejaculat, concentrațiile de fructoză și testosteron din plasma seminală, libidoul și producția glandelor anexe. Se poate afirma astfel că mobilitatea și morfologia spermatozoidelor sunt afectate mai mult de stress-ul provocat de temperatura și umiditatea ridicate, pe când volumul de spermă și numărul total de spermatozoizi/ejaculat sunt influențate mai ales de fotoperioadă. (Murasu și col., 2007).

Se pare că procentul spermatozoidelor morfologic normali poate fi îmbunătățit în timpul verii prin suplimentarea rației alimentare cu 625 mg/zi L-carnitină (Yeste și col., 2010).

După cum s-a menționat mai sus, mai mulți autori susțin că atât fotoperioada cât și temperatura afectează funcția genitală la vier. Totuși, deși efectele negative ale temperaturilor ridicate sunt recunoscute pe scară largă, efectele regimului de lumină sunt încă discutate. De exemplu, unii autori raportează un număr mai mic de spermatozoizi în timpul perioadelor cu ziua mai lungă, în timp ce alții susțin că extinderea regimului de lumină în timpul perioadelor cu zi scurtă a dus la creșterea numărului de spermatozoizi (Sancho și col., 2006).

#### *Efectul temperaturii*

Calitatea mai slabă a materialului seminal de vier observată în timpul verii a fost asociată în mod normal cu temperaturile mai ridicate înregistrate în acest anotimp. Studiile întreprinse pentru a verifica această ipoteză nu au rămas fără rezultat, iar în ziua de astăzi temperatura este considerată unul dintre principalii factori de mediu care interferează cu spermatogeneza. Majoritatea studiilor întreprinse au concluzionat că o temperatură ambientală scăzută nu afectează cantitatea și calitatea spermei, în schimb cea prea ridicată tulbură atât rata spermatogenezei cât și calitatea spermatozoidelor, ceea ce conduce la obținerea de ejaculate cu un număr mai mic de spermatozoizi, cu mobilitate scăzută și procent mai mare de anomalii. De asemenea, s-a observat și reducerea libidoului la vier, probabil din cauza alterării steroidogenezei. Pentru performanțe sexuale superioare, unii autori (Huang și col., 2010) recomandă menținerea vierilor la temperaturi sub 22°C.

Efectele variațiilor sezoniere de temperatură asupra materialului seminal de vier a fost observat de numeroși autori și asupra unei multitudini de parametri cantitativi și calitativi, cum ar fi volumul (Ciereszko și col., 2000; Suriyasomboon și col., 2004; Smital, 2010; Yeste și col., 2010), numărul total de spermatozoizi din ejaculat (Suriyasomboon și col., 2004; Smital, 2010; Huang și col., 2010), concentrația în spermatozoizi (Ciereszko și col., 2000; Syring, 2008; Yeste și col., 2010), procentul mobilității (Yeste și col., 2010), procentul anomaliilor

(Syring, 2008), integritatea membranară (Park și Yi, 2002; Yeste și col., 2010), conținutul de proteine plasmatice (Murase și col., 2007), etc. De asemenea, au fost înregistrate variații ale concentrației serice de testosteron (Park și Yi, 2002), ale rezistenței spermatozoizilor la congelare (Cheon și col., 2002; Park și Yi., 2002), reactivitatea acrozomului (Murase și col., 2007).

Sensibilitatea vierilor la temperaturile prea ridicate pare să fie diferită în funcție de alți factori, cum ar fi rasa (Sonderman și Luebbe, 2008; Yeste și col., 2010), linia genetică (Flowers, 2008) sau vârsta (Huang și col., 2010), ceea ce conduce la ideea că într-o fermă de reproducție, condițiile de întreținere a masculilor trebuie ajustate după evaluarea comună a factorilor intrinseci.

Unul dintre studiile care evidențiază foarte bine răspunsul diferit în funcție de rasă la temperaturile prea ridicate din timpul verii a fost realizat de Yeste și col. (2010). În studiul respectiv au fost monitorizate variațiile sezoniere ale parametrilor spermatici la trei dintre cele mai utilizate rase de suine în centrele de producție europene, respectiv Pietrain, Marele Alb și Duroc. Rezultatele au arătat o variație a volumului ejaculat invers proporțională cu temperatura medie, la toate rasele analizate. Pe de altă parte, concentrația în spermatozoizi a suferit o scădere a valorilor din cauza creșterii temperaturii ambiante doar vierii Pietrain, dar nu și la cei Duroc sau Marele Alb. Temperatura medie a afectat de asemenea viabilitatea măsurată prin procentul de spermatozoizi cu membrană plasmatică intactă și acrozom intact la rasele Pietrain și Marele Alb, dar nu și la Duroc. Procentul mobilității a fost de asemenea mai redus din cauza temperaturii ridicate la vierii Pietrain și Marele Alb, pe când la vierii Duroc nu au fost înregistrate diferențe notabile. În ceea ce privește viteza de deplasare a spermatozoizilor, procentul de spermatozoizi rapizi a fost corelat negativ cu temperatura la rasele Pietrain și Duroc. La vierii Marele Alb procentul spermatozoizilor rapizi nu a fost influențat de temperatura ambientală, deși a putut fi observată o scădere a procentului mobilității progresive în timpul sezonului cald. Temperaturile mai ridicate a dus de asemenea la o reducere a proporției de spermatozoizi morfologic normali din ejaculat la vierii Marele Alb și Pietrain, dar nu și la cei din rasa Duroc. La vierii Pietrain, procentul redus al spermatozoizilor morfologic normali a fost asociat cu un procent mai mare al spermatozoizilor imaturi, pe când la vierii Marele Alb cu o proporție mai ridicată a anomaliilor (Yeste și col., 2010). Absența diferențelor semnificative între sezoane la rasa Duroc în ceea ce privește concentrația în spermatozoizi, mobilitatea totală și integritatea acrozomială în sperma brută a fost observată și de Cheon și col., (2002). În schimb, aceștia au observat o rezistență mai bună la conservare în timpul primăverii, manifestată printr-un procent al mobilității și o integritate acrozomială după decongelare mai bune comparativ cu celelalte

sezoane. De asemenea, autorii au corelat capacitatea mai bună de conservare din timpul primăverii cu titrul mai ridicat al testosteronului înregistrat în același sezon (Cheon și col., 2002), aspect observat și de Park și Yi (2002) la rasa Duroc, dar și la rasa Yorkshire.

Referitor la sensibilitatea diferită a vierilor la temperaturile mai mari în funcție de vârsta acestora, se pare că îmbătrânirea organismului afectează capacitatea de termoreglare, făcându-l mai sensibil la stress-ul caloric. Huang și col. (2010) au observat că abilitatea termoreglatoare este mai bună la vierii tineri (în vârstă de 10 luni) decât la cei ajunși la maturitate deplină (în vârstă de 3 ani). În studiul realizat de echipa menționată mai sus, scăderea cantității și calității materialului seminal în timpul sezonului cald a fost mai puțin semnificativă la vierii cu vârsta cuprinsă între 10 și 30 de luni, comparativ cu vierii în vârstă de peste 35 de luni (Huang și col., 2010).

Faptul că unele rase și linii genetice sunt mai rezistente la stressul caloric specific verii ar putea ajuta la îmbunătățirea rezultatelor reproductive la suinele domestice prin selecție genetică.

Temperatura ridicată din timpul verii pare să acționeze sinergic cu umiditatea relativă, iar pentru contracararea efectelor negative ale acestora asupra spermatogenezei, Suriyasomboon și col. (2004) recomandă cazarea vierilor într-un mediu prevăzut cu sistem de răcire, care să mențină condițiile de microclimat între limitele confortabile. Prin probarea acestui sistem controlat, autorii au observat că, deși volumul și numărul total de spermatozoizi au continuat să scadă în timpul sezonului cald, totuși reducerea a fost mai blândă și întinsă pe o perioadă mai scurtă comparativ cu utilizarea sistemului convențional de întreținere (Suriyasomboon și col., 2004).

### *Efectul fotoperioadei*

După ce oamenii de știință au asociat perioada de scădere a parametrilor reproductivi la suinele domestice cu perioada de anestrul la mistreț, specie la care împerecherea se realizează doar când ziua este mai mică decât noaptea, a urmat o serie lungă de studii în legătură cu efectul fotoperioadei asupra cantității și calității spermei la vierul domestic. De multe ori însă acest efect este dificil de studiat, deoarece sezonul în care ziua este mai mare decât noaptea coincide cu cel în care temperaturile sunt ridicate (vara) și de aceea nu se poate preciza cu exactitate care dintre cei doi factori afectează mai mult spermatogeneza.

Unii autori afirmă că anumiți parametri seminali la vier se află sub influența duratei fotoperioadei, dar și caracterului său, respectiv crescător sau descrescător (Knecht și col., 2013), fiind superiori în perioadele cu fotoperioadă

descrescătoare comparativ cu cele în care fotoperioda este crescătoare. În schimb, alți autori contrazic această ipoteză. De exemplu, Sancho și col. (2004) au studiat parametrii seminali de la 20 de vieri Landrace menținuți în condiții constante de temperatură și umiditate, dar în două perioade cu regimuri de lumină diferite și anume în februarie-aprilie, când fotoperioda este crescătoare și respectiv în august-noiembrie, când fotoperioda este descrescătoare. Rezultatele au fost diferite în funcție de parametrul luat în calcul. Astfel, nu au fost observate diferențe între cele două perioade în ceea ce privește volumul ejaculatului, mobilitatea, viabilitatea și rezistența osmotică a spermatozoizilor, în schimb au fost prezente diferențe majore în cazul concentrației și numărului total de spermatozoizi, care au fost cu circa 50% mai mari în perioada cu fotoperioadă crescătoare. Analiza morfologică a arătat că deși procentul total de spermatozoizi imaturi a fost oarecum asemănător, totuși s-a înregistrat o frecvență mai mare a spermatozoizilor imaturi cu picătura citoplasmatică situată proximal în timpul expunerii la o fotoperioadă descrescătoare, și o frecvență mai mare a spermatozoizilor imaturi cu picătura citoplasmatică situată distal în timpul expunerii la o fotoperioadă crescătoare. Prin urmare, autorii au concluzionat că performanțele reproductive ale vierilor respectivi scad în timpul fotoperioadei descrescătoare, în principal din cauza tulburării funcției testiculare (Sancho și col., 2004).

În ceea ce privește durata efectivă a fotoperioadei și influența sa asupra parametrilor seminali, o echipă condusă tot de Sancho (Sancho și col., 2006) a expus vierii timp de trei luni la trei regimuri diferite, respectiv 0, 12 și 24 ore de lumină artificială, în timp ce temperatura ambientală și umiditatea relativă au fost aceleași pe toata durata studiului și pentru toate cele trei grupuri. Rezultatele au arătat că volumul ejaculatului, integritatea acrozomială și concentrația în spermatozoizi au fost afectate de fotoperioadele extreme (0 și 24 ore de lumină), în timp ce capacitatea fecundantă a fost redusă doar în condițiile de întuneric absolut (0 ore de lumină). Efectul regimurilor diferite asupra activității glandelor anexe s-a manifestat printr-o scădere a cantității plasmei seminale în cazul fotoperioadelor extreme, dar fără diferențe semnificative în compoziția acesteia. Rezultatele au indicat că durata fotoperioadei influențează parametrii seminali, însă deopotrivă lumina permanentă cât și lumina absentă duc la scăderea unor indicatori cantitativi și calitativi. Tulburările observate au fost mai severe în cazul menținerii masculilor în întuneric absolut comparativ cu expunerea la lumină permanentă, însă recuperarea și adaptarea vierilor a survenit mai rapid (Sancho și col., 2006).

Există indicii că răspunsul funcției genitale la durata și caracterul crescător sau descrescător al regimului de lumină diferă în funcție de rasa vierului,

asemănător cu răspunsul la variațiile temperaturii. De exemplu, Yeste și col. (2010) raportează că procenteile mobilității, viabilității și al spermatozoizilor morfologic normali sunt semnificativ mai mici în timpul perioadelor în care ziua-lumină este mai lungă, în timp ce la rasa Duroc acestea nu diferă semnificativ pe durata anului. De asemenea, Rivera și col. (2005) nu au sesizat diferențe notabile privind calitatea materialului seminal (procenteile mobilității totale, viabilității și al anomaliilor morfologice, precum și rezistența osmotică) între sezoanele cu fotoperioadă crescătoare și respectiv descrescătoare, la vierii hibrizi Marele Alb × Pietrain și Duroc × Landrace × Marele Alb.

În concluzie, variațiile sezoniere ale parametrilor spermatici la vier par să fie în general rezultatul combinației a doi factori: temperatura și fotoperioada. Dacă temperatura acționează asupra testiculului, modificând temperatura locală cu urmări asupra spermatogenezei și steroidogenezei, fotoperioada acționează asupra axului hipotalamus-hipofiză-gonade, afectând nivelul hormonal ce reglează producerea și maturarea spermatozoizilor. Nu trebuie neglijăți totuși ceilalți factori care pot afecta calitatea materialului seminal la vier și care se pot suprapune și amplifica efectul sezonului sau dimpotrivă pot să-l mascheze, cum ar fi frecvența recoltării, vârsta, starea fiziologică, interacțiunile sociale și alimentația.

## CAPITOLUL III. BIOTEHNOLOGIA ÎNSĂMÂNȚĂRILOR ARTIFICIALE LA SUINE

### CHAPTER III. ARTIFICIAL INSEMINATION IN SWINE

#### 3.1. RECOLTAREA MATERIALULUI SEMINAL DE VIER

Recoltarea spermei de la vier trebuie efectuată într-un țarc special amenajat pentru acest proces. Deoarece personalul operează foarte aproape sau în contact cu vierul, țarcul trebuie să fie prevăzut cu mai multe zone de evacuare pentru cazurile în care vierul devine agresiv. Două sau trei dintre laturile țarcului trebuie construite din țevi galvanizate cu diametrul de 5 cm, înălțimea de circa un metru și așezate la circa 0,25 metri între ele. Înălțimea și spațiul dintre țevi trebuie să permită personalului să iasă din zona de recoltare fără să fie nevoie să deschidă și să închidă o poartă, dar să restricționeze mișcarea vierului. Se recomandă ca țarcul de recoltare să aibă circa 2,4-2,75 metri lungime și 1,8-2,4 metri lățime, iar în centrul său să se plaseze manechinul pentru recoltare (Althouse, 2006).

Următoarele metode sunt utilizate pentru recoltarea materialului seminal de la vier: recoltarea manuală directă, recoltarea cu vaginul artificial și recoltarea cu ajutorul electro-ejaculatorului (Șonea, 2003; Groza și Morar, 2004).

##### *Recoltarea manuală directă a spermei de vier*

Metoda manuală, prin aplicarea de presiuni digitale asupra penisului este cea mai utilizată metodă de recoltare a materialului seminal de vier (Althouse, 2006). Mâna cu care operatorul presează penisul trebuie protejată de mănușă. De obicei se practică aplicarea a două mănuși (mănușa dublă), cea exterioară fiind îndepărtată după masajul furoului pentru exteriorizarea penisului. Este necesară utilizarea mănușilor fabricate din material non-spermicid (de exemplu vinil).

Pentru recoltare, operatorul se poziționează lateral vierului (de obicei pe partea stângă) și efectuează toaleta regiunii prepuțiale. Când vierul execută saltul și exteriorizează penisul, operatorul prinde cu mâna porțiunea spiralată a penisului și execută mișcări ritmice de ușoare presiuni digitale asupra glandului, manevră care provoacă ejacularea (figurile 3.1 și 3.2). Cu mâna liberă operatorul apropie paharul colector cu pereți dubli (temperatura interioară trebuie să fie de aproximativ 38°C), care este prevăzut cu o pâlnie acoperită cu un filtru steril. Prima fracțiune a ejaculării- fracțiunea prespermatică - nu se recoltează, deoarece are un conținut ridicat de microorganisme și scăzut în spermatozoizi. După fracțiunea prespermatică urmează fracțiunea spermatică, cu aspect lăptos, care este bogată în spermatozoizi. Recoltarea se consideră

finalizată când are loc eliminarea fracțiunii gelatinoase, care se gelifică pe suprafața tifonului, după care vierul coboară de pe manechin (Bogdan, 1999).

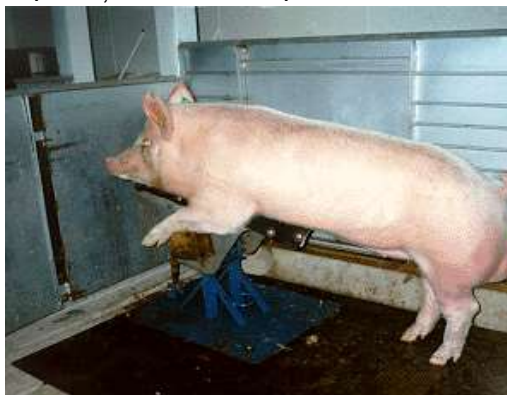


Figura 3.1 Vier efectuând saltul pe manechin (după Ciornei, 2012)  
Figure 3.1. Boar jumping on a dummy during semen collection (Ciornei, 2012)



Figura 3.2 Aplicarea de presiuni digitale asupra penisului de vier pentru recoltarea spermei (după Ciornei, 2012)

Figure 3.2. Applying manual pressure on the boar penis for semen collection (Ciornei, 2012)

### *Metoda recoltării cu vaginul artificial*

Vaginul artificial utilizat pentru recoltarea spermei la vier se compune din tub rigid reprezentat printr-o structură tubulară cu lungimea de circa 30 cm și cu diametrul de 6-8 cm, cămașa vaginală și prelungitoarele vaginale prevăzute cu o spirală interioară sau exterioară cu rol de stimulare, recipiente de colectare și inele de cauciuc.

Temperatura în interiorul vaginului artificial se asigură prin introducerea în spațiul dintre tubul vaginal și cămașa vaginală a 200-300 ml apă caldă la temperatura de 50-55°C, astfel că în momentul recoltării temperatura din interiorul vaginului să ajungă la 40-41°C. Cămașa vaginală se lubrifică cu vaselină neutră pe o porțiune de circa 10 cm. Pentru realizarea presiunii interioare, se introduce aer în spațiul dintre tubul vaginal și cămașa vaginală. Se fixează apoi conul prelungitor cu paharul colector, avându-se grijă ca orificiul de insuflare/evacuare a aerului să fie pe partea superioară a tubului vaginal. Pentru filtrarea spermei de fracțiunea gelatinoasă, la deschiderea paharului colector se poate adapta un filtru de sticlă, material plastic sau chiar o bucată de tifon, fixată cu un inel de cauciuc. După pregătire vaginul artificial se introduce în interiorul manechinului (Ciornei, 2012).

După ce vierul execută saltul pe manechin, operatorul dirijează penisul vierului în interiorul vaginului artificial. La scurt timp, după câteva mișcări intravaginale, concomitent cu accentuarea reflexului de erecție, începe ejacularea, care durează circa 5-10 minute. Când ejacularea este finalizată, vaginul artificial cu paharul colector se detașează de la dispozitivul de fixare menținându-se în poziție verticală cu paharul colector orientat în jos și se deschide robinetul pentru evacuarea aerului. Paharul colector se detașează cu atenție și se dirijează spre laborator (Ciornei, 2012).

#### *Tehnologia recoltării prin electroejaculare la vier*

Declanșarea ejaculării cu ajutorul electroejaculatorului nu prezintă importanță practică, dar poate constitui o posibilitate de examinare a spermei la un vier care refuză ejacularea pe manechin sau în caz de impotență „coeundi”. În cadrul lucrărilor de cercetare, această metodă permite recoltarea spermei de la vierii neajunși la maturitate sexuală sau pentru examinarea secrețiilor glandelor anexe la vierii castrați. Electrozii utilizați în acest scop, în general, au o lungime de aproximativ 50 cm și un diametru de 3,5 cm. Pentru declanșarea ejaculării, vierul trebuie conțenționat; regiunea prepuțului se spală cu o soluție izotonică de citrat de sodiu, iar restul cu o soluție de clorură de sodiu, la temperatura corpului. Un electrod se introduce în rect, iar celălalt se aplică în regiunea lombară la nivelul vertebrelor L2-L4. Curentul electric trebuie întrerupt ritmic, la o perioadă de 5 secunde. Tensiunea primului șoc va fi de 5 V, apoi va crește treptat după fiecare întrerupere; ejacularea începe după 15-20 V, când intensitatea curentului crește de la 500 la 1000 mA (Bogdan, 1999).

#### *Metodă alternativă de recoltare a materialului seminal de vier*

Dintre metodele menționate, cea mai folosită este metoda manuală (metoda masturbației), oferind rezultate foarte bune și necesitând investiții minime. Totuși aceasta este laborioasă și presupune ca operatorul să fie reținut pe toată perioada ejaculării ceea ce limitează către valori reduse numărul de recoltări pe care le poate efectua un operator în decurs de o zi. Pentru a contracara acest inconvenient, firma franceză Genes Diffusion a dezvoltat în anul 2000 un sistem automat de recoltare a spermei de vier (Collectis®) (figura 3.3.). Acesta nu alterează cantitatea și calitatea materialului seminal, dar are un efect semnificativ asupra volumului de muncă, crescând numărul de recoltări/oră pentru un operator cu circa 90%. Collectis® a fost proiectat astfel încât să permită unui tehnician să „gestioneze” mai multe țarcuri de recoltare simultan. Sistemul acționează prin vacuum (foarte asemănător cu cel de la aparatele de muls) pentru a regla volumul și presiunea aerului furnizat unui vagin artificial care susține penisul vierului în timpul recoltării. În cadrul pregătirii pentru colectare, în vaginul artificial Collectis este introdusă o cămașă vaginală de

unică folosință, care previne contactul direct dintre penisul vierului și vaginul artificial. Precum și contaminarea ejaculatului. După pregătire, vaginul artificial este conectat la dispozitivul portabil de control, care permite operatorului să controleze funcțiile vaginului artificial în timpul conectării acestuia la penisul vierului. Pașii de pregătire a vierului pentru recoltare utilizând Collectis® sunt aceiași ca în cazul metodei manuale (Barrabes Aneas, 2008).

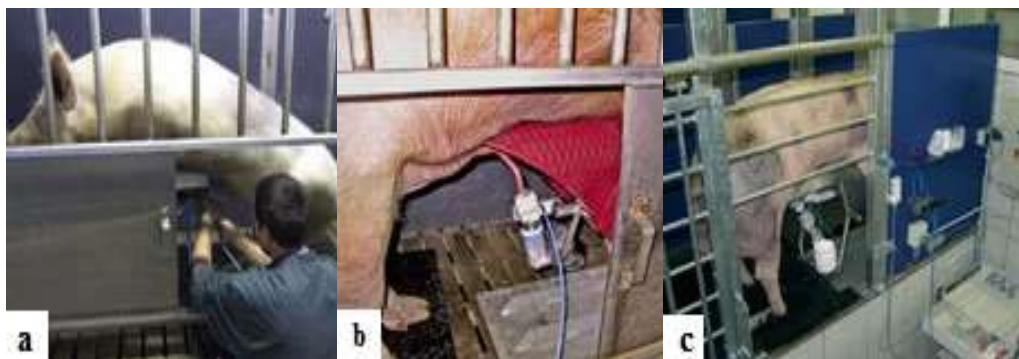


Figura 3.3. Recoltarea materialului seminal de vier cu ajutorul dispozitivului Collectis®: aplicarea dispozitivului (a) și ejacularea fără asistență (b și c)

Figure 3.3. Boar semen collection using Collectis®: applying the device (a) and ejaculation without assistance (b and c)

(<http://www.genesdiffusion.com/porcin/collectis-mode-emploi.aspx>)

### 3.2. EVALUAREA VALORII BIOLOGICE A MATERIALULUI SEMINAL DE VIER

Examinarea materialului seminal se execută înainte de diluare, dar poate fi efectuat și după diferite etape ale prelucrării pentru a putea depista eventual greșeli de prelucrare, precum și la una sau mai multe zile de conservare, pentru a putea observa potențialul ejaculatului de a-și menține capacitatea de fecundare în timpul conservării.

Pentru a evalua calitatea unui ejaculat înainte de utilizare se execută obligatoriu un examen general și opțional un examen special.

#### 3.2.1. Examenul general al materialului seminal de vier

Examenul general se execută pentru fiecare ejaculat obținut, înainte de efectuarea diluției, pentru a verifica conformitatea materialului seminal. Cuprinde metode macroscopice și metode microscopice de evaluare (Șonea, 2003).

### 3.1.1. Examenul macroscopic

Prima evaluare a materialului seminal, imediat după recoltare, corespunde unui control macroscopic pentru a confirma sau infirma caracterul normal al volumului, culorii, mirosului și vâscozității (Sancho și Vilagran, 2013).

Determinarea **volumului ejaculatului** la vier reprezintă principala caracteristică cantitativă a producției de material seminal. Aceasta se efectuează direct în paharul colector sau într-un cilindru gradat, în momentul filtrării spermei. La vier, volumul producției spermatice este în medie 200 ml (cu variații între 50-400 ml) și reprezintă cel mai mare volum mediu al ejaculatului, comparativ cu ceilalți masculi ai animalelor domestice. Acest volum ridicat se datorează secreției abundente a glandelor sexuale anexe (Bogdan, 1999).

**Mirosul** materialului seminal este asemănător cu al osului fiert sau al albușului de ou. Mirosurile respingătoare, fetide, se datorează proceselor patologice ale organelor genitale. Ejaculatele cu miros fetid se îndepărtează, urmând să se stabilească cauzele care au dus la acesta (Bogdan, 1999).

**Vâscozitatea** materialului seminal la vier se apreciază după momentul filtrării de fracțiunea gelatinoasă. Vâscozitatea depinde de concentrația în spermatozoizi și poate varia de la consistența laptelui „apos” până la consistența laptelui gros. Poate fi modificată în cazul unor inflamații ale epididimului, dar este influențată și de greutatea specifică, încărcătura electrică a spermatozoizilor și alți factori (Bogdan, 1999).

**Culoarea** materialului seminal la vier este în mod normal alb-gri, cu aspect lăptos. Opacitatea este influențată de concentrația în spermatozoizi. Un ejaculat cu aspect „apos” este mai puțin concentrat. O culoare anormală a unui ejaculat (de exemplu brună, galbenă, roșiatică), denotă de obicei contaminarea cu alți compuși, cum ar fi urină, sânge, puroi, etc. Deoarece mulți dintre acești contaminanți prezintă activitatea spermicidă, ejaculatele cu defecte de culoare trebuie eliminate (Althouse, 2006).

### 3.1.2. Examenul microscopic

Pentru rezultate cât mai corecte, o atenție deosebită în timpul examenului microscopic trebuie acordată manipulării probei de material seminal. Spermatozoizii sunt foarte sensibili la șocul hipotermic și de aceea temperatura probei în timpul evaluării sale este critică. Aceasta trebuie menținută în intervalul 30-37 °C pe durata evaluării mobilității și a preparării frotiurilor pentru examenul morfologic. Răcirea frotiurilor este permisă numai după ce s-au uscat. Pentru asigurarea temperaturii optime se recomandă utilizarea unui microscop prevăzut cu platformă încălzită sau a unei plăcuțe încălzite care să se atașeze la un microscop normal (Parkinson, 2009b).

**Mobilitatea spermatozoizilor** reprezintă caracteristica esențială a celulei spermatice, proprietate care o diferențiază de restul celulelor din organism. Procentul mobilității reprezintă principalul criteriu de evaluare a calității materialului seminal în centrele de producție.

Determinarea mobilității se face întotdeauna în condiții de metabolism activ al spermatozoizilor (temperatura de aproximativ 35 °C) la diferite categorii de material seminal: brut, diluat, conservat (Bogdan, 1999).

Metodele prin care se determină mobilitatea spermatozoizilor la vieri sunt:

- determinarea la microscop (între lama și lamelă), observându-se procentul de spermatozoizi cu mișcări vivoale de înaintare; se utilizează diferite sisteme de notare: de la 0,1 la 1 (sistemul zecimal în care nota 0,9 corespunde cu 90% spermatozoizi cu mișcări de înaintare) fie de la 1 la 5 (în care de exemplu nota 4 corespunde cu 70-80% spermatozoizi cu mișcări de înaintare (Bogdan, 1999). Precizia acestei metode subiective depinde într-o mare măsură de pregătirea probei, calitatea microscopului, experiența și abilitățile examinatorului. Pentru a minimiza efectele erorii umane, se recomandă standardizarea protocolului de examinare (Althouse, 2006);

- determinarea computerizată, prin utilizarea unui software special, care calculează automat atât mobilitatea spermatozoizilor dintr-o probă de material seminal cât și alți parametri spermatici (sistemul CASA) (Broekhuijse și col., 2011; Contri și col, 2010; Davis și Katz, 1993; Didion, 2008; Ehlers, 2011). Această metodă este descrisă pe larg în cadrul subcapitolului 3.2.3.

- determinarea în camera de numărare (hemocitometrică) a timpului în care un spermatozoid străbate în linie dreaptă distanța de 1/20 mm; se apreciază ca mișcare normală (normokinezie) între 1-1,9 secunde; rapidă (hiperkinezie) între 0,7-0,9 secunde și lentă (hipokinezie sau astenospermie) peste 2 secunde (Bogdan, 1999).

- determinarea fotogrammetrică (spermatokinezigrafia): fotografierea la microscop a unor câmpuri (2-3) alese randomizat, urmată de evaluarea fotografiilor și stabilirea pe baze obiective, atât a proporției de spermatozoizi mobili, cât și a vitezei lor de înaintare (Bogdan, 1999).

**Concentrația în spermatozoizi** la vieri constituie un parametru important în cadrul controlului producției de material seminal. Pe baza concentrației, prin corelație cu volumul ejaculatului, se calculează numărul total de spermatozoizi din ejaculat și numărul de doze de înșămânțare ce rezultă.

Valorile normale ale concentrației în spermatozoizi a materialului seminal sunt de aproximativ  $100 \times 10^6/\text{ml}$ , însă pot varia între  $25-1000 \times 10^6/\text{ml}$  (Parkinson, 2009b).

Nu există o metodă unanim acceptată ca metodă standard pentru determinarea concentrației în spermatozoizi (Sancho și Vilagram, 2013), însă diverse tehnici sunt disponibile și utilizate la scară mai mică sau mai mare în laboratoarele de examinare, după cum urmează:

- metoda hemocitometrică – constă în numărarea la microscop a spermatozoidelor aflați în interiorul și pe laturile a cinci pătrățele de ordinul 2 ale camerei de numărare (hemocitometru) și stabilirea concentrației pe baza unei formule de calcul. Hemocitometrele folosite la numărarea spermatozoidelor sunt asemănătoare celor utilizate la numărarea elementelor figurate sanguine, (Bürker-Türk, Thoma, Neubauer, etc.). Este cea mai utilizată metodă pentru determinarea concentrației materialului seminal deoarece este ieftină și precisă. Totuși, deoarece este laborioasă și necesită timp relativ mare de lucru, tinde să fie înlocuită în centrele de producție a materialului seminal cu metode mai rapide.

- metoda fotocolorimetrică se bazează în principiu pe reținerea diferită a fasciculelor de lumină de către spermatozoizi și măsurarea ajutorul unei celule fotoelectrice situată într-un aparat a opacității (care este proporțională cu concentrația în spermatozoizi). Metoda este facilă și eficientă (Camus, 2011), însă precizia ei depinde de o serie de factori, cum ar fi calibrarea în funcție de specia analizată și diluția probei examinate. Respectarea specificațiilor producătorului pentru fiecare model de fotometru este deosebit de importantă (Althouse, 2014).

- metoda computerizată, cu ajutorul sistemului CASA, care calculează concomitent și automat concentrația, procentul mobilității, precum și alți parametri seminali – descrisă în subcapitolul 3.2.3.

- metoda cu ajutorul dispozitivului Nucleocounter®. Acesta este un dispozitiv prevăzut cu microscop integrat cu fluorescență ce detectează nucleii spermatozoidelor din sperma analizată după o prealabilă colorare a acestora cu iodură de propidium. Pentru analiză, proba de material seminal trebuie aspirată într-o casetă specială care apoi este plasată în dispozitiv. Metoda prezintă un grad ridicat de precizie pentru sperma de vier (Hansen și col., 2006; Camus și col., 2011) dar și pentru sperma altor specii (Anzar și col., 2009) și este din ce în ce mai utilizată în centrele de producție a materialului seminal de vier, oferind câteva avantaje în comparație cu alte metode precise, cum ar fi analiza rapidă, manipularea facilă, lipsa necesității calibrării sau efectuarea unui examen suplimentar (evaluarea viabilității);

- metoda cu ajutorul citometriei în flux. Această metodă măsoară numărul de spermatozoizi dintr-o probă utilizând o varietate de metode de colorare cu fluorocrom și poate fi folosită ca o metodă de referință datorită vitezei de analiză,

sensibilității și obiectivității măsurătorilor (Sancho și Vilagran, 2013). De-a lungul ultimelor două decenii, citometria în flux a devenit un instrument util de investigare a materialului seminal. În prezent, această tehnică oferă posibilitatea de a analiza rapid, corect și obiectiv mai mulți parametri seminali, cum ar fi concentrația în spermatozoizi, viabilitatea celulei spermatice, integritatea acrozomială, funcția mitocondrială, precum și statutul de capacitare a spermatozoizilor (Neculai-Văleanu, 2015).

- metoda nefelometrică de determinare a concentrației în spermatozoizi se bazează pe determinarea opacității spermei, prin comparare cu o soluție standard; este o metodă foarte rapidă și cu suficientă precizie, care se poate folosi la vier dar și la armăsar (Bogdan, 1999).

- metoda electronică ce are ca principiu modificarea de către spermatozoizi a câmpului electric creat de cei doi electrozi din platină, plasați într-un capilar de pasaj al spermei. Câmpul electric este modificat mai mult sau mai puțin, în funcție de concentrația spermei (Bogdan, 1999).

Determinarea **viabilității spermatozoizilor** (stabilirea proporției de spermatozoizi vii/morți) este efectuată prin utilizarea unei colorații speciale. Se bazează pe principiul că spermatozoizii vii au membrana plasmatică integră din punct de vedere morfologic și funcțional, ceea ce va împiedica pătrunderea colorantului în interiorul celulei. Cea mai utilizată colorație este eozină-negrozină, care poate fi utilizată și pentru analiza morfologică. Pentru ca acea colorație folosită la determinarea viabilității să fie eficientă, este necesar controlul cu grijă al temperaturii, iar protocolul de lucru trebuie standardizat. Nu se recomandă examinarea spermei congelate cu eozină, deoarece substanțele crioprotectante stimulează pătrunderea colorantului în celula seminală crescând astfel în mod artificial procentul de spermatozoizi morți (Parkinson, 2009b). Pentru a fi considerat ca fiind de bună calitate, un ejaculat de vier trebuie să conțină aproximativ 85% spermatozoizi cu membrana intactă (Sancho și Vilagran, 2013).

**Examenul morfologic** al spermatozoizilor reprezintă un instrument eficient de evaluare a funcției epiteliului seminifer și a maturării epididimale la vier dar și la alte specii de animale, și servește drept o măsură adițională de a evalua calitatea și fertilitatea unui ejaculat. În mod uzual, examenul morfologic a ejaculatului de vier cuprind o clasificare calitativă și cantitativă a spermatozoizilor normali și anormali din punct de vedere morfologic (Sancho și Vilagran, 2013). Integritatea morfologică a unui spermatozoid este o condiție esențială pentru implicarea sa în procesul fecundării (Runceanu și col., 2007). În industria suină, atât frotiurile uscate cât și cele umede sunt utilizate pentru cuantificarea obiectivă a anomaliilor morfologice. În cazul preparatelor umede,

spermatozoizii trebuie imobilizați cu o soluție cu formalină sau glutaraldehidă, iar examinarea este efectuată la un microscop ce dispune de contrast intern propriu (Althouse, 2006). Pentru preparatele uscate, există o varietate de colorații utilizate pentru examinarea morfologică, de exemplu eozină-negrozină, Typan-blue, Giemsa, Papanicolaou, Diff-Quick (Sancho și Vilagran, 2013). Un anumit procent de anomalii (5-10%) este normal în ejaculatul de vier (Drugociu, 2009), însă dacă acesta depășește 25%, atunci ejaculatul trebuie eliminat (Gadea, 2002).

Anomaliile spermatozoizilor sunt evaluate în funcție de trei mari criterii: localizarea lor pe spermatozoid (anomalii ale capului, piesei intermediare sau cozii), originea lor (primare – testiculare, care exprimă defecte ale spermatogenezei; secundare – epididimale; terțiare – post-ejaculatorii, de exemplu din cauza manipulării necorespunzătoare a ejaculatului sau probei analizate) și efectele lor asupra fertilității (defecte majore și defecte minore). În general, defectele capului și ale piesei intermediare sunt anomalii primare, prezența picăturii protoplasmatică (spermatozoid imatur) este o anomalie secundară iar prezența cozilor „în buclă” reprezintă o anomalie terțiară. Anomaliile majore cuprind majoritatea defectelor capului, picăturile protoplasmatică proximale și defectele acrozomiale congenitale, în timp ce celelalte defecte sunt în majoritatea lor clasificate drept anomalii minore (Parkinson, 2009b).

În funcție de impactul or asupra fertilității, anomaliile mai pot fi clasificate în defecte compensabile și necompensabile, o clasificare dezvoltată recent după aplicarea unor metode de evaluare precum studii de fertilitate în teren sau fertilizări *in-vitro* cu material seminal cu un procentaj mare de spermatozoizi cu anomalii individuale. Defectele compensabile sunt acelea în care spermatozoizii anormali nu sunt capabili să se deplaseze în oviduct sau sunt incapabili să penetreze ovocitul. Prezența unor astfel de anomalii poate fi compensată prin creșterea numărului de spermatozoizi din doza de însămânțare. Defectele necompensabile sunt acele anomalii în care spermatozoizii sunt capabili să penetreze zona pellucida, dar nu pot induce clivajul ori produc embrioni neviabili. Aceste defecte nu pot fi compensate prin creșterea numărului de spermatozoizi din doză. Relația exactă dintre aceste categorii și clasificarea în defecte majore/minore încă nu a fost stabilită (Parkinson, 2009b).

Alți autori împart anomaliile spermatozoizilor în primare și secundare. Cele primare apar în timpul spermatogenezei și cuprind tulburările morfologice ale capului și piesei intermediare. (macrocefalie, microcefalie, cap turtit, cap în formă de pară, lipsa acrozomului etc.). Anomaliile secundare constau în

tulburări morfologice ale cozii spermatozoizilor (prinderea cozii lateral, coadă dublă, coadă nedevelopată etc.). Prezența spermatozoizilor imaturi în concentrații mari în materialul seminal denotă că reproducătorii respectivi sunt folosiți în mod excesiv la montă sau la recoltare, sau indică faptul că la nivelul epididimului există un proces de regenerare activă în urma unei infecții sau leziuni (Ardelean, 2002).

### **3.2.2. Examen special al materialului seminal de vier**

Parametrii determinați în cadrul examenului general reprezintă instrumente utile pentru aprecierea calității materialului seminal, oferind informații prețioase despre capacitatea de fecundare a ejaculatului (Gadea, 2005; Didion, 2008 ). Totuși, unii autori afirmă că aceștia nu corelează de fiecare dată cu indicii de fertilitate la scroafe (Schulze și col., 2013). De aceea, se recomandă evaluarea unor caracteristici mai intime ale spermatozoizilor, pentru a putea prezice mai bine rezultatele înșămânțării (Turba și col., 2007). Astfel, uneori se efectuează determinarea unor parametri speciali, ce măsoară statusul structural, fiziologic și metabolic al celulelor seminale, al unor organite celulare sau al plasmii seminale și care pot oferi informații aprofundate despre capacitatea de fecundare a unui ejaculat. Printre acești parametri se numără: rezistența spermatozoizilor, toleranța osmotică, gradul de aglutinare, statusul capacitar, integritatea nucleară, statusul mitocondrial, procentul spermatozoizilor apoptotici, nivelul speciilor reactive de oxigen, microflora bacteriană, etc.

Acestea sunt teste utile pentru evaluarea calității materialului seminal, însă utilizarea lor în centrele de producție este redusă deoarece sunt laborioase, necesită un timp mai lung de lucru sau presupun cheltuieli prea mari (Althouse, 2006).

**Determinarea rezistenței spermatozoizilor** - se bazează pe proprietatea spermatozoizilor de a rezista la acțiunea nocivă a unei soluții de clorură de sodiu (NaCl) 1%. Unii autori menționează că longevitatea și capacitatea fecundantă a spermatozoizilor este cu atât mai ridicată cu cât spermatozoizii își mențin mobilitatea într-un volum mai mare de soluție de NaCl 1%. Rezistența se exprimă prin numărul de ml de soluție NaCl 1% necesari pentru a opri mișcările de înaintare ale spermatozoizilor ce se găsesc într-un ml de material seminal. Se consideră că materialul seminal poate fi folosit la înșămânțări artificiale dacă prezintă cel puțin valoarea 1000 pentru rezistența spermatozoizilor (Ciornei, 2012).

**Toleranța osmotică.** Spermatozoizii de vier sunt sensibili la modificările osmotice ale mediului în care se află, atât cele hipertotonice cât și cele hipotonice. Pentru spermatozoizii de vier, o soluție izotonică are între 300-400 mOsm/kg.

Răspunsul celulei seminale la stress-ul osmotic se află în legătură cu integritatea sa funcțională și poate fi un bun indicator al statusului său funcțional. Mai multe teste au fost dezvoltate pentru a măsura răspunsul spermatozoizilor de vier la modificările osmotice, ca un indicator al calității spermei. Aceste metode sunt: testul de umflare hipo-osmotic (HOST), testul de rezistență/umflare hiper-osmotică (HRT) și testul de rezistență osmotică (ORT). Toate aceste sunt concentrate pe răspunsul membranei spermatice la modificări bruște de osmolaritate (Sancho și Vilagran, 2013).

**Statusul capacitar.** Capacitarea implică unele modificări fiziologice pe care spermatozoidul le suferă în oviduct și care sunt esențiale pentru fertilizare. Aceste modificări modifică membrana și includ reorganizarea proteinelor, metabolismului fosfolipidelor și reducerea nivelului colesterolului. De asemenea, provoacă hiperactivarea în ce privește mobilitatea. Există diferite tehnici de evaluare a statusului capacitar al spermatozoizilor, care analizează unele dintre modificările amintite: colorația CTC, determinarea gradului de fluidizare a membranei spermatice folosind colorantul fluorescent M540, determinarea nivelului de calciu intracelular sau evaluarea sistemului proacrozină-acrozină (Sancho și Vilagran, 2013).

**Integritatea nucleară a spermatozoidului: fragmentarea ADN-ului.** Unele studii au arătat că existența unor parametri seminali anormali este asociată cu prezența unor rupturi în lanțul de ADN. Heterogenitatea structurii cromatinei, care este asociată cu tulburări ale spermatogenezei poate fi corelată cu o susceptibilitate mai mare a ADN-ului la denaturare, conducând la fertilitate redusă. Statusul ADN-ului spermatic este în general analizat folosind tehnici pe bază de fluorocromi, care au interacțiuni complexe și specifice cu cromatina sau AND-ul: testul COMET bazat pe electroforeză în gel, testul TUNEL bazat pe marcarea capătului terminal al acizilor nucleici, testul ISNT, testul ISL (Sancho și Vilagran, 2013). Deteriorarea ADN-ului poate fi, de asemenea, evaluată în mod indirect prin intermediul unor teste care evaluează integritatea cromatinei spermatice și a proteinelor nucleare. Testele pentru evaluarea integrității cromatinei spermatice sunt bazate pe colorații care au afinitate pentru proteinele nucleare (de exemplu, albastru anilină sau albastru de toluidin) (Neculai-Văleanu, 2015).

Utilizarea acestor tehnici sunt foarte utile în analiza materialului seminal de vier, însă din cauza complexității lor aceste nu sunt incluse în monitorizarea de rutină. Pentru a contracara acest inconvenient, în ultimii ani a fost dezvoltată o tehnică bazată pe detectarea nucleilor ce prezintă ADN fragmentat, ce poate fi efectuată în laboratoarele convenționale de analiză. Această tehnică se numește testul de dispersie a cromatinei spermatice (SCDt) și a fost inițial

dezvoltată pentru spermatozoizii umani dar apoi adaptată și pentru spermatozoizii de vier. Se bazează pe imersia spermatozoizilor într-o matrice de agaroză, tratarea lor cu o soluție acidă și examinarea lor la microscop optic sau cu fluorescență. Spermatozoizii cu ADN fragmentat apar în câmpul microscopic cu un halou periferic specific (Sancho și Vilagran, 2013).

Unii autori afirmă că fragmentarea ADN-ului este prezentă mai mare la spermatozoizii crioconservați (Fraser și Strzezek, 2005) în timp ce alții declară că diferențele între sperma brută și cea crioconservată în ceea ce privește fragmentarea ADN-ului sunt ne semnificative și că fenomenul de crioconservare induce o alterare nucleară specifică în spermatozoidul de vier, dar care este legată mai degrabă de complexul protamine-1-ADN decât de fragmentarea directă a ADN-ului (Flores și col., 2008).

**Detectarea spermatozoizilor apoptotici** poate fi efectuată în principal prin două teste, și anume testul legării anexinei-V și tehnica ce utilizează concomitent colorantul YO-PRO-1 și iodurii de propidium, reprezentând un indicator sensibil al apoptozei (Sancho și Vilagran, 2013).

**Evaluarea nivelului speciilor reactive de oxigen (ROS).** Când se acumulează în spermatozoizi, speciile reactive de oxigen induc modificări pro-apoptotice (Rath și col., 2009; Peña și col., 2009) și contribuie la scăderea fertilității materialului seminal (Koziorowska-Gilun și col., 2011). Una dintre cauzele cunoscute pentru acumularea de ROS în spermatozoizii de vier este crioconservarea (Yang și col., 2016) iar printre cele mai utilizate metode de a estima nivelul ROS este folosirea colorantului fluorescent 2',7'-dichlorodihidrofluorescein diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) care pătrunde și difuzează în celule, unde grupările acetat sunt hidrolizate iar compusul rezultat este apoi oxidat de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O altă tehnică de evaluare a nivelului ROS în spermatozoizi este metoda ce măsoară chemiluminiscența dependentă de luminol și lucigenin utilizând un luminometru, și de metoda de colorare dublă (Sancho și Vilagran, 2013).

**Microflora din spermă.** Pe lângă flora banală, în unele situații sperma poate să conțină și germeni patogeni. Prezența în materialul seminal a unor germeni patogeni poate duce la transmiterea pe verticală a unor boli infecțioase într-un efectiv, determină creșterea infecundității sau avorturi timpurii și chiar sterilitate (Ciornei, 2012). Contaminarea se poate produce din surse externe (din interiorul sălilor de recoltare, de pe tegumentul masculilor, de pe echipamentul de recoltare și procesare nesterilizat) sau din surse interne (processe patologice testiculare sau ale căilor genitale). Unele modificări metabolice ale materialului seminal se pot datora supra-contaminării acestuia, sub aspect calitativ (prezența germenilor patogeni) sau cantitativ (floră bacteriană banală foarte

numeroasă). Numărul total de germeni pe care materialul seminal proaspăt recoltat îl conține în mod normal diferă de la un autor la altul, dar sunt indicate în general valori între 100 000 și 400 000 UFC/mm<sup>3</sup>. Între cele mai izolate genuri bacteriene izolate din ejaculatul se numără *Actinobacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Bacillus*, *Actinomyces*.

**Gradul de aglutinare a spermatozoizilor.** Aglutinarea spermatozoizilor este observată atunci când un spermatozoid se atașează de altul prin contact cap-cap sau coadă-coadă. Uneori, mai mulți spermatozoizi aglutinează, formând conglomerate. Aglutinarea spermatozoizilor determină scăderi ale procentului mobilității și poate fi provocată de mai mulți factori, printre care depozitarea pe termen prelungit (Yeste și col., 2008) sau contaminarea bacteriană excesivă (Ubeda și col, 2013). Unii autori raportează însă că aceasta nu are impact asupra fertilității (Bollwein și col., 2004)

**Statusul mitocondrial.** Pe lângă asigurarea mobilității spermatozoizilor, proprietate necesară deplasării către situsul fecundării, mitocondriile mai sunt implicate în reglarea morții celulare prin eliberarea unor cantități mari de ROS. Nivelul ROS este mult mai ridicat în mitocondrii decât în citosol sau nucleu, ceea ce le-ar putea transforma practic într-o primă țintă a acțiunii nocive a acestor compuși. Evaluarea membranei mitocondriale a spermatozoizilor se realizează în general cu ajutorul fluorocromilor, cum ar fi rodamina-123, JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbicianina) sau Mitotracker®.

**Examinarea plasmei seminale.** Plasma seminală reprezintă un compus complex, alcătuită în special din produsul glandelor anexe, dar într-o mică măsură și din fluidul de origine testiculară și epididimală. Aceasta prezintă mai multe roluri, de exemplu este mediul de transport al spermatozoizilor, reprezintă sursă energetică pentru spermatozoizi, intervine în protejarea spermatozoizilor, și este implicată chiar și în interacțiunea dintre spermatozoizi și secrețiile tractusului genital femel. Plasma seminală este compusă deopotrivă din substanțe organice (glucide, lipide, proteine, aminoacizi) și anorganice. Diverse tehnici au fost dezvoltate pentru evaluarea nivelului și funcției compușilor din plasma seminală: analize biochimice, cristalografia cu raze X, electroforeza în gel poliacrilamid, testul imunoenzimatic (ELISA), teste colorimetrice, spectroscopia cu rezonanță magnetică multinucleară etc.

### 3.2.3. Evaluarea materialului seminal prin metode computerizate

În mod tradițional, parametrii calitativi ai spermei se evaluează folosind microscopul optic, însă unii autori au demonstrat că această metodă oferă o interpretare subiectivă, în funcție de specialistul ce o realizează (Broekhuijse și col., 2011). Această interpretare subiectivă duce la o variație a rezultatelor care

face dificilă de exemplu estimarea efectelor mobilității asupra fertilității și care poate avea consecințe economice nedorite.

Prin urmare, s-au depus eforturi numeroase pentru găsirea unei metode ușoare, obiective și eficiente de determinare a parametrilor spermatici. În acest sens, Dott și Foster au propus pentru prima dată o analiză computerizată a materialului seminal (Sistemul C.A.S.A. – Computer Assisted Sperm Analysis), în anul 1979 (Broekhuijse, 2011). Aceasta a fost disponibilă pentru centrele de examinare a materialului seminal în anul 1985, iar la momentul actual metoda a ajuns să fie preferată pe scara largă, în foarte multe centre andrologice, atât veterinare cât și umane, datorită capacității de analiză rapidă și exactă a numeroși indici spermatici (de exemplu mobilitate, concentrație, morfologie, viabilitate, pH), pentru un număr mare de probe.

Un sistem CASA (figurile 3.4. și 3.5.) înregistrează prin intermediul unei camere video, traseele urmate de spermatozoizii depuși pe o lamă specială de analiză. Semnalul receptat de cameră este transformat în semnal digital și trimis către un computer care reconstruiește, pe baza unui anumit număr de cadre, traiectoria fiecărui spermatozoid. Sistemul localizează un anumit punct la nivelul spermatozoidului (de obicei capul) pentru semnal și de asemenea verifică prezența cozii, astfel încât spermatozoizii sunt diferențiați de impuritățile din vecinătate pe baza mărimii și prezenței cozii (figura 3.6.). Apoi, computerul este capabil să utilizeze o serie de variabile considerate parametri cinetici absoluți, cum ar fi viteza și amplitudinea de deplasare laterală a capului (figura 3.7.). Folosindu-se de acestea, computerul recalculează alți parametri derivați, cum ar fi proporția de spermatozoizi cu modele variate de mișcare (de ex. lineară, non-lineară, circulară sau chiar locală, mișcări fără deplasare), gradul de linearitate și altele (Tejerina și col., 2008).



**Figura 3.4.** Sistemul CASA IVOS II

**Figure 3.4.** CASA system IVOS II

(<http://www.hamiltonthorne.com/index.php/products/clinical-casa-products/ivos-ii-clinical>)



**Figura 3.5.** Sistemul CASA cu software AndroVision®

**Figure 3.5.** CASA system with AndroVision® software

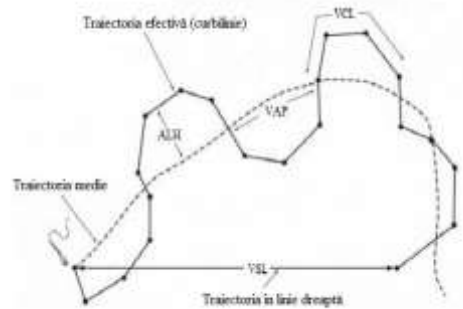
([http://www.minitube.de/DE\\_eng/Products-Services/Porcine/CASA-System](http://www.minitube.de/DE_eng/Products-Services/Porcine/CASA-System))



**Figura 3.6.** Vizualizarea probei de material seminal prin intermediul CASA

**Figure 3.6.** Semen sample visualization by CASA

(<http://www.indoreinfertilityclinic.com/our-services/services/evaluation-male-partner/casa-computerized-sperm-analysis>)



**Figura 3.7.** Unii dintre principalii parametri cinetici evaluați prin CASA

**Figure 3.7.** Some seminal parameters calculated by CASA

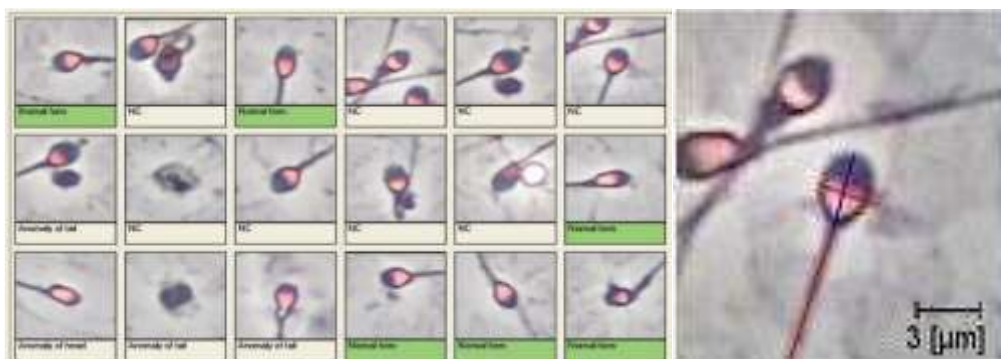
(<http://www.mibio.org/en/metrics-used>)

Această metodă tehnologică a fost propusă pentru a spori nivelul producției spermatice la nivel industrial și a fost acceptată doar după ce și-a demonstrat potențialul și aplicabilitatea. În prezent, sistemul CASA este folosit la nivel industrial, în marile centre de reproducere suină, dar este un instrument deosebit de util și pentru cercetători, în domenii precum: toxicologia materialului seminal, studii morfologice, influențele mediului asupra spermatozoizilor, analiza retrospectivă a spermei, crioconservare, relații între morfologia spermatozoizilor și tipurile de mișcare, aspecte legate de structura cromatinei, funcțiile mitocondriale, transferul de gene, factorii care influențează spermatogeneza, funcțiile epididimului (Didion, 2008).

Metoda CASA a dovedit că este mai precisă și corectă, așadar mai obiectivă (Davis și Katz 1993; Krause, 1995; Broekhuijse și col., 2011). Într-un studiu realizat de Broekhuijse și col. (2011), se arată diferența în ceea ce privește valorile pentru procentul mobilității între examinarea folosind microscopul optic și examinarea folosind sistemul CASA. Pentru aceasta, echipa respectivă a examinat prin ambele metode un număr de 1499 de ejaculate de vier. Diferențele de rezultate au fost semnificative. Dacă prin examinarea clasică valoarea medie a mobilității totale a fost de 80,2% și doar 0,3% dintre ejaculate au prezentat mobilitate <60%, prin folosirea metodei CASA s-a obținut o valoare medie a mobilității totale de 74,5% și 12,7% dintre ejaculate au prezentat mobilitate totală <60% (Broekhuijse și col., 2011). Acest aspect prezintă o

importanță economică deosebită, deoarece în multe dintre centrele de producție a materialului seminal de vier, o valoare a mobilității mai mică de 60% reprezintă o cauză a îndepărtării ejaculatului.

Sistemul CASA are capacitatea de a identifica aspecte legate de mișcarea spermatozoizilor dar și morfologia lor, putând chiar executa calcule privind morfometria spermatozoizilor. (Fig. 3.8. )



**Figura 3.8.** Analiza morfologică și morfometrică ale spermatozoizilor folosind sistemul CASA

**Figure 3.8.** Analysis of sperm morphology and morphometry using CASA (<http://www.mtg-de.com/products/andrology/medealab-casa.html>)

De asemenea, poate realiza un profil precis al materialului seminal, furnizând o clasificare obiectivă a populațiilor de spermatozoizi ținând cont de mișcările lor. Folosind imagini digitale ale traseelor spermatozoizilor, echipamentul CASA poate analiza caracteristicile mobilității și încadra fiecare spermatozoid analizat într-o sub-populație specifică, realizând astfel un profil al ejaculatului (Amann și Waberski, 2014). Cele mai frecvente variabile cinetice analizate de CASA sunt: viteza curbilinie (VCL), viteza medie (VAP), viteza liniară (VSL), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH), frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF), și coeficienții liniaritate (LIN), rectilitate (STR) și wobble (WOB) (García Herreros și col., 2005) (figura 3.7).

Nu în ultimul rând, sistemul CASA calculează concentrația în spermatozoizi a probei, în cadrul aceleași analize. Totuși, trebuie precizat că unii autori raportează o imprecizie a sistemului CASA în ceea ce privește determinarea acestui parametru (Vyt și col., 2004b; Hansen și col., 2006).

Folosind sistemul CASA, unii autori au putut depista unele corelații între anumiți parametri ai mobilității și fertilitate la oameni (Hirano și col., 2001) sau diferite specii de animale, cum ar fi bovine (Budworth și col., 1988), leporide (Lavara și col., 2005) sau suine (Hirai și col., 2001; Sutkeviciene și col., 2005;

McPherson și col., 2014). Cu ajutorul aceleași metode, alți autori (Hoflack și col., 2007) au putut identifica diferențe de rasă în cadrul caracteristicilor mobilității lansând astfel ipoteza că mobilitatea spermatozoizilor este influențată ereditar.

Modelele actuale ale sistemelor CASA prezintă o serie de avantaje, fiind capabile să execute procese suplimentare sau perfecționate, de exemplu: - generează o spermogramă completă în doar câteva secunde; - pot efectua inclusiv examene complexe, cum ar fi determinarea gradului de fragmentare al ADN-ului; - analiza poate fi realizată pentru o gamă foarte largă de specii; - înregistrează în format video și stochează informațiile obținute pentru o reanaliză ulterioară; - realizează o diferențiere precisă între celulele spermatice și cele non-spermatice cu ajutorul unor filtre multi-parametrice (de ex. detectarea cozii spermatozoidului); - realizează o analiză morfologică precisă; - pot analiza inclusiv înregistrări video externe, provenite de la alte laboratoare; - datele privind mobilitatea și concentrația sunt redată în format MS Excel dar și în format tipărit.

Principalele dezavantaje pentru utilizarea CASA sunt reprezentate de costurile mari de achiziție și ale lamelor speciale de analiză, precum și de necesitatea de standardizare și validare a sistemului înainte de a fi utilizat (Verstegen și col., 2002). De asemenea, pentru obținerea unor rezultate precise, este necesară stabilirea unui protocol standard de operare precum și antrenarea operatorului (Mortimer și col., 1986). Deoarece nivelul de pregătire al operatorului este foarte important, unii autori (Ehlers și col., 2011) au creat chiar programe de e-learning pentru cei care urmează să utilizeze CASA.

Principalii factori de risc de care trebuie să se țină seama la examinarea materialului seminal prin metoda computerizată sunt: temperatura probei, (temperatura ideală este 38-39°C, la temperaturi mai mici rata mobilității scade), factorul de diluție (dacă diluția este prea mică, spermatozoizii se pot suprapune iar aparatul nu-i mai poate citi), tipul omogenizării (omogenizarea automată dă rezultate mai bune decât cea manuală) și înălțimea camerei de numărat (care poate afecta capacitatea aparatului de a detecta celulele influențând rezultatele mobilității), precum și nivelul de instruire al operatorului (Broekhuijse și col., 2011). De asemenea, Contri și col., (2010) susțin că timpul scurs între prepararea probei și examinarea propriu-zisă este un factor foarte important. Dacă acest timp depășește 5-10 minute, valorile mobilității sunt afectate negativ.

În concluzie, majoritatea autorilor susțin că, în cazul în care este aplicat corect, sistemul CASA este cea mai eficientă metodă de examinare a materialului seminal, realizând un examen obiectiv, precis, rapid și ușor de obținut.

### 3.3. PRELUCRAREA ȘI CONSERVAREA MATERIALULUI SEMINAL DE VIER

#### 3.3.1. Prelucrarea materialului seminal

Prelucrarea materialului seminal reprezintă o serie de acțiuni efectuate asupra ejaculatului după examinare, menite să prelungească durata de viață a spermatozoizilor *in-vitro*, dar și mărirea volumului său pentru a putea obține mai multe doze de înșămânțare. Prelucrarea materialului seminal presupune diluarea acestuia prin adăugarea unei soluții speciale.

La momentul actual diluanții pentru sperma de vier se găsesc în stare gata-preparată, puși la dispoziție de o multitudine de comercianți. De obicei sunt sub formă de pulbere și trebuie reconstituiți utilizând apă purificată. Diluantul reconstituit trebuie incubat la 37°C pentru 45-60 de minute pentru echilibrarea pH-ului înaintea utilizării la diluția materialului seminal (Althouse, 2006).

Pentru protejarea viabilității spermatozoizilor, diluția trebuie să se realizeze cât mai repede după recoltare (Bogdan, 1999):

După diluție, concentrația materialului seminal se situează între  $25 \times 10^6$ - $80 \times 10^6$  spermatozoizi/ml. Valoarea concentrației finale este de obicei determinată pe baza duratei preconizate de depozitare înainte de utilizare. De exemplu, ca regulă generală, pentru depozitarea în stare lichidă la 17°C (principala tehnică de conservare a spermei de vier), dacă ejaculatul îndeplinește criteriile minime de acceptare pentru folosire la înșămânțare artificială, atunci un miliard de spermatozoizi per doză este inclus pentru fiecare zi de depozitare. Astfel dacă doza de înșămânțare va fi depozitată două zile, atunci va conține două miliarde de spermatozoizi; dacă va fi depozitată trei zile, atunci va conține trei miliarde de spermatozoizi, etc. (Althouse, 2006). Atenție trebuie însă acordată și volumului spermei diluate, nu doar concentrației. Înșămânțarea cu un volum prea mic de material seminal duce la obținerea unei rate de concepție redusă. De aceea, volumul unei doze de înșămânțare se situează în general între 70-100 ml. Necesitatea utilizării unui volum atât de mare, derivă probabil din nevoia de a stimula contracțiile anti-peristaltice uterine ce ajută la deplasarea spermatozoizilor către locul fecundării (Parkinson, 2009c).

Circa 99% dintre stațiile de înșămânțare artificială la suine utilizează spermă lichidă. Deoarece spermatozoizii de vier sunt sensibili la șocul hipo-termic, aproape toate centrele de prelucrare folosesc diluanți în vederea depozitării la temperaturi ambientale, care conțin substanțe ce scad metabolismul spermatozoizilor pe perioada depozitării, pentru a le prelungi durata de viață

(Parkinson, 2009c). Majoritatea diluanților aflați pe piață au fost dezvoltati în acest sens.

Diluanții utilizați la prelucrarea materialului seminal de vier trebuie să îndeplinească o serie de condiții pentru a-și putea îndeplini scopul.

În principiu, diluanții furnizează nutrienți pentru menținerea metabolismului spermatozoizilor, și substanțe pentru a controla presiunea osmotică. Din cauza conținutului caracteristic în lipide a membranei lor plasmatică, spermatozoizii de vier sunt foarte sensibili la variațiile de temperatură și de aceea diluanții trebuie să conțină și substanțe care să-i protejeze în fața șocului hipo-termic. De asemenea, deoarece membrana spermatozoizilor de vier prezintă un conținut ridicat de fosfo-lipide nesaturate, sensibile la oxidarea lipidică, se recomandă ca diluanții să aibă în compoziția lor și antioxidanți. Cele mai utilizate componente ale diluanților folosiți pentru diluarea materialului seminal de vier sunt: glucoza pentru susținerea activității metabolice, albumina bovină serică (BSA) pentru protejarea împotriva șocului hipo-termic și pentru compensarea pierderilor proteice, bicarbonat, TRIS (tris(hidroximetil)aminometan) și HEPES (acid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetsulfonic) pentru controlul pH-ului (în general în intervalul 6,8-7,2), substanțe ca NaCl și KCl pentru controlul presiunii osmotice (reglată de obicei în intervalul 240-380 mOsm/kg) și antibiotice pentru prevenirea dezvoltării florei microbiene. Trebuie menționat însă că majoritatea companiilor țin secretă compoziția diluanților pe care îi produc din motive comerciale (Bussalleu și Torner, 2013).

În Europa, adăugarea antibioticelor în diluanții de material seminal și normele de ordin sanitar pentru comerțul intra-comunitar și importuri sunt reglementate de Directiva Consiliului 90/429/EEC. Această directivă afirmă că "o combinație de antibiotice eficientă mai ales împotriva leptospirelor și mycoplasmele trebuie adăugată materialului seminal după diluția finală. Această combinație trebuie să producă un efect cel puțin egal următoarelor diluții: nu mai puțin de 500 UI/ml streptomycină, 500 UI/ml penicilină, 150 mg/ml lincomycină și 300 mg/ml spectinomycină. Imediat după adăugarea antibioticelor, materialul seminal diluat trebuie păstrat la o temperatură de cel puțin 15°C pentru o perioadă de cel puțin 45 de minute" (Bussalleu și Torner, 2013).

### **3.3.2. Conservarea materialului seminal de vier**

Metodele ce pot fi folosite la momentul actual pentru a menține viabilitatea spermatozoizilor pe perioada depozitării sunt: refrigerarea; congelarea; păstrarea la temperatura ambientală dar cu reducerea metabolismului (Parkinson, 2009c).

**Refrigerarea** este o metodă folosită cu succes la bovine, și pe alocuri la ovine, ecvidee și canide (Parkinson, 2009c). La suine însă, această metodă **nu**

oferă rezultate satisfăcătoare. Expunerea spermatozoizilor de vier la temperaturi de sau sub 10°C poate produce tulburări ale integrității acrozomiale și ale procentului mobilității (Althouse, 2006). Spermatozoizii de vier sunt mai sensibili în fața șocului hipotermic decât cei de taur sau de berbec, suferind tulburări biochimice și funcționale mai pronunțate (Silva și col., 2015).

Din păcate, nici **congelarea** (metodă cu avantaje economice deosebite) nu oferă rezultate suficiente pentru a fi utilizată pe scară largă în centrele de înșămânțare suină. Viabilitatea spermatozoizilor după decongelare este redusă, iar rezultatele după înșămânțare sunt invariabil mai slabe decât în cazul utilizării spermei lichide. De exemplu, fecunditatea după o înșămânțare dublă cu spermă congelată este de cel mult 70%, în timp ce în cazul spermei lichide aceasta este de circa 80-90%. Există două limitări majore în cazul congelării spermei de vier. În primul rând, este foarte sensibilă la șocul hipo-termic, sensibilitate ce nu poate fi combătută la o rată acceptabilă prin folosirea gălbenușului de ou sau a laptelui, ca în cazul altor specii. În al doilea rând, glicerolul, care este probabil cel mai bun crioprotectant pentru spermatozoizii de vier, are efecte toxice mai pronunțate asupra spermatozoizilor comparativ cu alte specii. În consecință, numărul de spermatozoizi necesari pentru a obține o rată a fecundării mediocră este foarte mare, de circa  $6 \times 10^9$ /doză (Parkinson, 2009c). Toate acestea constrâng sperma congelată să fie folosită în general doar în caz de transfer internațional de gene de înaltă valoare și pentru crearea băncilor de gene (Parkinson, 2009c; Roca și col., 2011).

În ciuda rezultatelor descurajatoare, au fost și sunt în continuare depuse eforturi pentru optimizarea protocolului de congelare a spermei de vier. Printre altele, acestea vizează:

- îmbunătățirea diluanților, prin adăugarea unor substanțe crioprotectoare cum ar fi dimetil-acetamida (Bianchi și col., 2008), N-acetil-D-glucozamina (Yi și col., 2002), trehaloza (Gutiérrez-Pérez și col., 2009); fracțiuni lipoproteice liofilizate (LPFo) izolate din gălbenușul de ou de struț (Fraser și col., 2007a).

- controlul strict al temperaturii; după Flores și col. (2010), faza de răcire din cadrul protocolului de crioconservare induce modificări severe asupra majorității parametrilor calitativi ai materialului seminal la vier. Unul dintre cele mai bune protocoale de crioconservare a materialului seminal de vier folosește un diluant pe bază de lactoză-gălbenuș de ou (sau LDL) și glicerol (în concentrație finală de 2-3%) și presupune răcirea la o rată de 30-50°C/minut și o decongelare rapidă (1000-1800°C/minut) (Rath și col., 2009).

- selectarea masculilor care dau rezultate mai bune; după cum au demonstrat unii autori, vierii oferă rezultate diferite de la individ la individ, în ceea ce privește rezistența la congelare a spermatozoizilor (Thurston și col,

2002; Roca și col., 2006). În mod curent se practică încadrarea masculilor în trei categorii, în funcție de rezultatele obținute în urma congelării/decongelării, după cum urmează: vieri “rezistenți la congelare”, vieri “moderat rezistenți la congelare” și vieri “sensibili la congelare” (Rath și col., 2009).

- adăugarea în mediul de diluție a antioxidanților (Großfeld și col. 2008);
- selectarea pentru congelare doar a unei porțiuni din ejaculat; după Saravia și col. (2007) rata supraviețuirii spermatozoizilor după decongelare poate fi îmbunătățită prin crioconservarea doar a primilor 10 ml a fracțiunii bogate în spermatozoizi,
- îndepărtarea înainte de congelare a unor compuși ai plasmei seminale care ar putea avea un efect negativ asupra spermatozoizilor în timpul crioconservării (Fraser și col., 2007b);
- depunerea materialului seminal cât mai aproape de locul fertilizării în cadrul înșămânțării artificiale (Parkinson, 2009c).

În aceste condiții, principala metodă de conservare a materialului seminal de vier este **depozitarea în stare lichidă, la aproximativ 17 °C**, timp de câteva zile după prelucrare. Această metodă s-a dovedit a fi mai eficientă decât congelarea, protejând mai bine capacitatea fecundantă a spermatozoizilor (Hu și col, 2015). Spre exemplu, comparativ cu sperma congelată, sperma proaspătă oferă o rată a concepției cu 10-25% mai bună și o prolificitate mai ridicată (Zeng și col., 2014). Astfel, majoritatea diluanților pentru materialul seminal de vier aflați pe piață sunt concepuți în acest sens.

Diluanții pentru conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă se împart în general în două grupe: diluanți pe termen scurt (care permit conservarea timp de până la 3 zile) și diluanți pe termen lung (care permit conservarea peste 4 zile), deși unii autori (Pinart și col, 2015) propun o clasificare în patru grupe, respectiv diluanți pentru termen scurt (3-4 zile), mediu (5-6 zile), lung (7-8 zile) și extra-lung (peste 8 zile). Totuși, indiferent de tipul de diluant folosit, cele mai multe înșămânțări sunt efectuate în primele 3 zile după recoltare, deoarece se pare că prolificitatea scade dacă sperma folosită e mai veche de 4 zile (Johnson și col, 2000). Ținând cont de acest aspect, utilizarea diluanților pe termen lung ar fi inutilă, însă în realitate aceștia sunt utilizați pe scară largă, după ce s-a arătat că sunt mai eficienți în menținerea calității materialului seminal (Waterhouse și col, 2004; Dubé și col, 2004).

Diluanții pe termen scurt sunt folosiți în general atunci când materialul seminal este distribuit într-o rețea locală, pe când cei pe termen lung sunt utilizați când centrul de înșămânțare se află la o distanță mare de centrul de recoltare (Bussalleu și Torner, 2013).

După ce ejaculatul a fost prelucrat cu diluantul corespunzător, acesta este ambalat în doze individuale de înșămânțare. În mod curent, pentru depozitarea în stare lichidă, se utilizează trei tipuri diferite de recipiente: flacoane, tuburi și pungi/ambalaje plate (figura 3.9.). Aceste recipiente sunt produse din material plastic ne-toxic pentru spermatozoizi și sunt mai degrabă flexibile decât rigide, pentru a se putea deforma atunci când conținutul lor este expulzat (Althouse, 2006).



**Figura 3.9.** Tipuri de recipiente utilizate în mod curent la ambalarea materialului seminal în vederea conservării în stare lichidă: tub, pungă/ambalaj plat și flacon (după Althouse, 2006)

**Figure 3.9.** Container types currently used for boar semen packing before storage in liquid state: tube, bag/flat pack and bottle (Althouse, 2006)

### 3.4. INOCULAREA MATERIALULUI SEMINAL DE VIER

Există mai multe metode ce se pot utiliza pentru inocularea materialului seminal la scroafe:

#### ***Înșămânțarea artificială endocervicală (clasică)***

Presupune depunerea materialului seminal la nivelul cervixului.

Pentru această metodă se folosește aparatura de inseminare compusă din cateter (seminetă) și recipientul cu material seminal. Cateterele sunt confecționate din materiale elastice și nespermicide. Inițial, se foloseau catetere reutilizabile, din materiale rezistente la sterilizări. La momentul actual, se preferă cateterele de unică folosință, din material plastic.

#### ***Înșămânțarea artificială intrauterină (post-cervicală)***

Tehnica înșămânțării artificiale post-cervicale utilizează un cateter special, compus din două piese (figura 3.10.). Prima piesă este un cateter normal, asemănător celui utilizat în tehnica clasică, dar care este folosit practic doar pentru a ghida cateterul propriu-zis de înșămânțare, care este mai subțire, mai

lung, flexibil și dispus în interiorul primului. Pentru însămânțare, inițial se fixează cateterul clasic în cervix, după care se introduce prin lumenul său cateterul subțire, până într-o zonă distală a corpului uterin, moment urmat de injectarea dozei de material seminal prin lumenul cateterului subțire (Rodríguez-Gil și Estrada, 2013).



**Figura 3.10.** Sistemul de catetere utilizat pentru însămânțarea artificială intra-uterină la scroafe: cateterul extern (A), cateterul intern (B), sistemul asamblat (C) (după Rodríguez-Gil și Estrada, 2013)

**Figure 3.10.** Catheter used for intra-uterine artificial insemination in sow: external catheter (A), internal catheter (B), the assembly (C) (Rodríguez-Gil and Estrada, 2013)

Această tehnică permite utilizarea unui număr mai mic de spermatozoizi/doza de însămânțare fără a compromite numărul de spermatozoizi ce ajunge în oviduct (Sumransap și col., 2007).

Însămânțarea artificială intrauterină (numită și post-cervicală) este din ce în ce mai utilizată în fermele de suine datorită avantajelor pe care le prezintă, printre care: sperma este depusă mai cranial, crescând șansele ca spermatozoizii să ajungă în oviduct; inocularea materialului seminal se efectuează mai rapid; tehnica este ușoară și accesibilă (Rodríguez-Gil și Estrada, 2013).

#### ***Însămânțarea intrauterină în profunzime (metoda nechirurgicală)***

Presupune depunerea materialului seminal în treimea superioară a unuiu din coarnele uterine. Introducerea cateterului este ușurată de utilizarea unui endoscop cu fibră optică. Metoda evită tranzitarea de către spermatozoizi a uterului, unde ar fi expuși pierderilor cauzate de fagocitoză și refulări. În acest mod, numărul de spermatozoizi/doză poate fi redus până la  $20 \times 10^7$  sau chiar  $5 \times 10^7$  (Martinez și col., 2001).

Însămânțarea artificială profund intra-uterină poate reprezenta o metodă de îmbunătățire a indicilor de fertilitate în cazul utilizării spermei congelate (Roca și col., 2003; Chanapiwat și col., 2014).

#### ***Însămânțarea pe cale chirurgicală***

Presupune plasarea spermatozoizilor direct în apropierea joncțiunii utero-tubare. Metoda oferă fertilizarea optimă la suine, fiind nevoie de doar  $1 \times 10^7$  spermatozoizi/doza de însămânțare. Necesită efectuarea însămânțării cu puțin timp înainte de producerea ovulației.

Posibilitatea acestei reduceri majore a numărului de spermatozoizi se obține prin evitarea celor două procese în urma cărora se pierde o parte din spermatozoizii introduși în uter: refularea spermei și fagocitarea spermatozoizilor de către leucocitele polimorfonucleare (Ciornei, 2012).

### **Însămânțarea prin conceptul Gedis®**

Sistemul Gedis (Figura 3.11.) folosește o aparatură specială ce este denumită sondă-conținut. Sonda are dublu rol: de cateter și de recipient pentru materialul seminal. O porțiune din cateter poartă rol și de prelungitor, dând o formă aerodinamică sondei. În jurul cateterului este atașat un săculeț de silicon ce se deschide la nivelul vârfului sondei printr-un orificiu închis cu un dop de parafină.



**Figura 3.11.** Sonda-cateter Gedis (prezentare, aplicare, autoînsămânțare)

**Figure 3.11.** Gedis catheter (presentation, applying, autoinsemination)

([www.genesdiffusion.com](http://www.genesdiffusion.com))

Metoda se bazează pe principiul „autoînsămânțării”. Congestia estrogenică a căilor genitale determină creșterea temperaturii locale, ceea ce va duce la topirea dopului de parafină, lăsând permeabil orificiul sondei pe unde sperma este eliberată. Musculatura căilor genitale ale scroafei va presa pe sonda-conținut, determinând astfel depunerea materialului seminal la nivel cervical. De asemenea, datorită mișcărilor antiperistaltice uterine, sperma este absorbită de către aparatul genital femel.

Principalele avantaje ale acestei metode sunt reprezentate de scăderea cu până la 75% a timpului alocat unei inseminări artificiale și reducerea cantității de material seminal care refulază în timpul inseminărilor (Ciornei, 2012).

### **Însămânțarea scroafelor prin conceptul Gemix®**

Reprezintă o metodă revoluționară, ce folosește cateterul Gedis, dar care conține un material seminal special, compus dintr-un amestec de spermă diluată liberă, cu o capacitate fecundantă imediată și spermă proaspătă încapsulată, care este eliberată progresiv în decurs de peste 36 de ore.

Capsulele conțin mai multe milioane de spermatozoizi, având o concentrație mai mare decât a dozelor standard. Spermatozoizii respectivi sunt puși în libertate treptat, ducând la o concentrație constantă în căile femele timp de 36 de ore (Ciornei, 2012).

Metoda prezintă o serie de avantaje, cum ar fi: reducerea timpului alocat unei inseminări (care va dura aproximativ un minut), reducerea numărului de însămânțări pe scroafă, creșterea valorilor fertilității, creșterea prolificității, reducerea stresului provocat scroafelor de însămânțările repetate.



## **PARTEA A II-A**

### **CERCETĂRI PROPRII**



## **CAPITOLUL IV. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR**

### **CHAPTER IV. THE AIM AND OBJECTIVES OF THE PHD THESIS**

Biotehnologiile de însămânțare artificială la suine nu se desfășoară încă în parametri optimi. În ultimii ani s-au făcut progrese evidente, însă în condițiile creșterii continue pentru hrana populației, eficiența centrelor de producție și reproducție a suinelor trebuie optimizată. Un accent important cade asupra reproducției, pentru îmbunătățirea procentului de gestații obținut după însămânțări și a numărului de purcei rezultat după o gestație. Pentru a obține acest deziderat, trebuie acordată o atenție sporită fiecărui segment al biotehnologiilor de reproducție asistată, inclusiv examinării și prelucrării materialului seminal.

Doar prin utilizarea materialului seminal de calitate superioară pot fi obținute o rată a fătărilor și o prolificitate mulțumitoare. Calitatea materialului seminal la însămânțare poate fi asigurată printre altele printr-o examinare corectă a ejaculatelor și selectarea doar a ejaculatelor cu potențial ridicat de fertilizare, prin aplicarea unui protocol adecvat de prelucrare și conservare. Pe lângă acestea, trebuie acordată o atenție sporită factorilor de natură intrinsecă și extrinsecă ce pot influența calitatea materialului seminal la ejaculare.

Deși cercetările asupra materialului seminal de vier au fost realizate la un nivel continuu și susținut, încă sunt necesare studii care să demonstreze particularitățile acestuia, cu prezentarea variațiilor ce intervin în cursul unui an. După cum s-a evidențiat în studii anterioare, fertilitatea este direct influențată de valorile parametrilor spermatici, însă parametrii seminali pot suferi variații însemnate sub influența sezonului. Prin studierea în amănunt a acestor variații, vor putea fi înțelese mecanismele lor de apariție și condițiile exacte în care survin. De asemenea, vor putea fi gândite metode de contracarare a inconvenientelor provocate de așa-zisa „infertilitate de sezon”, cu posibilitatea asigurării unui indice de fertilitate ridicat indiferent de sezon.

Teza de doctorat „Cercetări privind variațiile sezoniere ale indicatorilor spermatici la vier și fertilitatea acestora” și-a propus următoarele obiective:

- Optimizarea protocolului de examinare computerizată a materialului seminal de vier prin aprecierea efectului pe care tipul de cameră utilizat în cadrul analizei computerizate a materialului seminal de vier diluat îl poate avea asupra rezultatelor obținute;
- Aprofundarea cunoștințelor legate de prelucrarea și conservarea materialului seminal de vier prin identificarea unor eventuale diferențe în ceea ce privește parametrii cinetici între un diluant pe termen scurt și

unul pe termen lung în timpul unei perioade de conservare de șapte zile, prin depistarea eventualei influențe pe care ambalarea automată a materialului seminal o poate avea asupra calității acestuia precum și prin detectarea unor posibile corelații între parametrii seminali calculați după ejaculare și potențialul ejaculatului de a-și păstra calitatea în timpul conservării; toate acestea ar putea ajuta la îmbunătățirea protocolului de prelucrare a materialului seminal prin alegerea metodei și ejaculatelor potrivite;

- Consemnarea variațiilor sezoniere ale principalilor parametri spermatici la vierii întreținuți în condiții obișnuite, atât pentru materialul seminal brut cât și pentru materialul seminal prelucrat;
- Consemnarea variațiilor sezoniere ale principalilor parametri spermatici la vierii întreținuți în condiții standardizate;
- Depistarea subpopulațiilor de spermatozoizi mobili în materialul seminal de vier și observarea variației sezoniere a acestora;
- Studiarea relațiilor dintre variațiile parametrilor spermatici și fertilitatea materialului seminal de vier;
- Propunerea unei soluții de combatere a „infertilității de sezon” descrisă la vier.

**CAPITOLUL V. OPTIMIZAREA EXAMINĂRII COMPUTERIZATE A  
MATERIALULUI SEMINAL DE VIER  
CHAPTER V. THE OPTIMIZATION OF COMPUTERIZED EXAMINATION OF  
BOAR SEMEN**

Însămânțările artificiale la suine au atins un nivel foarte ridicat pe mapamond, în momentul de față reproducția în marile centre de creștere a porcilor realizându-se aproape exclusiv prin acest procedeu.

Succesul procedurilor de însămânțare artificială la animale și inclusiv la scroafe depinde de o serie de factori, printre care și calitatea materialului seminal. Atunci când aceasta este necorespunzătoare cu referire la volum, număr de spermatozoizi, mobilitate și/sau morfologie a spermatozoizilor, rata concepției poate fi afectată (Glossop, 2001).

Numeroși autori au demonstrat corelația între parametrii spermatici și capacitatea fecundantă a materialului seminal. De exemplu, Flowers (1997) indică faptul că utilizarea materialului seminal cu mobilitate sub 60% conduce la obținerea unor valori mai scăzute ale fecundității și prolificității, în timp ce alți autori au demonstrat corelațiile unora dintre parametrii spermatici determinați prin analiza computerizată și indicii de fertilitate (Budworth și col., 1988; Hirano și col., 2001; Hirai și col 2001; Sutkeviciene și col 2005; Mcpherson și col, 2014)

Dezvoltarea mijloacelor tehnologice de evaluare a materialului seminal (sistemul CASA) a ajutat la creșterea preciziei și încrederii în evaluarea parametrilor seminali, furnizând mai multe informații decât evaluarea clasică prin efectuarea unor examene suplimentare, cum ar fi disocierea procentului mobilității totale de cel al mobilității progresive, precum și calcularea unor parametri speciali ai spermatozoizilor: viteza medie, viteza curbilinie, viteza în linie dreaptă, amplitudinea de deplasare laterală a capului etc. (Didion, 2008; Broekhuijse și col. 2011). De asemenea, disponibilitatea informațiilor înregistrate de computer facilitează compararea rezultatelor și face posibilă depistarea unor eventuale diferențe de mobilitate, în funcție de diferite situații (Palacín și col., 2013).

Sistemele CASA sunt utilizate din ce în ce mai mult în centrele de producere și examinare a materialului seminal de vier după ce numeroși autori au dovedit că sunt mai obiective decât metodele clasice (Davis și Katz, 1993; Krause, 1995; Didion, 2008; Broekhuijse și col. 2011; Amann și Waberski, 2014), mai ales în ceea ce privește mobilitatea spermatozoizilor. În aceste condiții, este esențial să se cunoască toate elementele care concură la obținerea rezultatelor. Rezultatele obținute pot fi influențate de calitatea materialului seminal în sine, dar și de alți factori, extrinseci, printre care se numără și greșelile examinatorului

sau deficiențe ale echipamentului folosit (Ibănescu și col., 2014). Conștientizarea tuturor factorilor extrinseci care pot cauza obținerea unor rezultate false este esențială în încercarea de a oferi mereu valori cât mai precise și obiective.

Rezultatele CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) pot fi influențate de setările programului, setările de captare a imaginilor, numărul de câmpuri analizate, concentrația și diluția probei de material seminal, ajustarea camerei de analiză, temperatura frotiului, timpul scurs de la recoltarea spermei până la examinare (Broekhuijse și col., 2011), standardizarea echipamentului folosit și a protocolului de examinare (Verstegen și col., 2002), tipul de software folosit (Tejerina și col, 2008), nivelul de pregătire al operatorului (Ehlers și col., 2011) precum și tipul de cameră de analiză folosit (Kraemer și col., 1998; Tomlinson și col., 2001; Gloria și col., 2013).

La momentul actual, pe piață există variate tipuri de camere de analiză pentru sistemul CASA, cu forme și dimensiuni diferite, produse de companii diverse. Pentru a obține rezultate cât mai precise și corecte în cadrul examinării materialului seminal, e important să se aleagă tipul de cameră care oferă o acuratețe superioară.

Obiectivul acestui studiu a fost de a determina dacă rezultatele analizei computerizate a materialului seminal de vier diluat pot fi influențate semnificativ de către tipul de cameră de analiză folosit.

## **5.1. Material și metodă**

### **5.1.1. Materialul seminal**

Materialul seminal examinat a provenit de la o unitate comercială din Germania ce produce doze pentru însămânțarea artificială a scroafelor.

Materialul seminal de vier a fost recoltat prin metoda manuală, (Morrow, 1986) de la 5 vieri sănătoși din rasa Pietrain utilizați în mod uzual pentru reproducție. Diluția a fost realizată cu diluantul BTS® (Minitube, Tiefenbach, Germania), iar examinarea a fost realizată după conservarea timp de două zile în stare lichidă, la 17°C, în flacoane cu volumul de 100 de ml (90 ml spermă diluată + 10 ml aer).

### **5.1.2. Sistemul CASA**

Pentru evaluarea parametrilor seminali a fost utilizat software-ul SpermVision versiunea 3.7 (Minitube of America – MOFA®, Verona, WI, SUA) conectat la un microscop optic Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania) prevăzut cu placă încălzită la 38°C. Setările programului au fost ajustate astfel: pentru parametrul mobilitate totală au fost luați în considerare spermatozoizii prezentând orice tip de mișcare, însă pentru

parametrul mobilitate progresivă au fost luați în considerare doar spermatozoizii cu o viteză medie (VAP) de minim 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectiliniaritate (STR) de minim 0.3.

### 5.1.3. Camerele de analiză

În cadrul examinărilor au fost utilizate trei tipuri comerciale de camere de unică folosință:

- Camera Leja, de formă alungită, cu înălțimea de 20  $\mu\text{m}$  (LOT 391415, Leja Products, Nieuw-Vennep, Olanda) (figura 5.1. a);
- Camera MofA, de formă circulară, cu înălțimea de 20  $\mu\text{m}$  (LOT 10114240, MOFA Global, Verona, WI, USA) (figura 5.1. b);
- Camera Minitube, de formă longitudinală, cu înălțimea de 20  $\mu\text{m}$  (LOT MT14259-D, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germania) (figura 5.3. c)



**Figura 5.1.** Tipurile de camere de analiză utilizate în cadrul studiului pentru examinarea materialului seminal de vier: Leja – 20  $\mu\text{m}$  (a), MofA – 20  $\mu\text{m}$  (b), și Minitube – 20  $\mu\text{m}$  (c)

**Figure 5.1.** The types of disposable sperm analytical chambers used in this study for boar sperm examination: Leja – 20  $\mu\text{m}$  (a), MofA – 20  $\mu\text{m}$  (b), and Minitube – 20  $\mu\text{m}$  (c)

### 5.1.4. Designul experimental

Probele de material seminal au fost încălzite la 38°C iar aproximativ 2 ml din fiecare probă au fost depuși în tuburi Eppendorf, menținute de asemenea la temperatura de 38°C, în dispozitive speciale (bloc termostat model HBT 132-2, Haep Labor Consult, Bovenden, Germania). Probele au fost păstrate la aceasta temperatură circa 10 minute, pentru a se obține certitudinea că au atins temperatura optimă în întregime.

Camerele de numărare, încălzite în prealabil la 38°C au fost montate în dispozitivul de examinare al microscopului și umplute conform specificațiilor producătorului (3 $\mu\text{l}$  pentru camerele Leja și Minitube, 2,5  $\mu\text{l}$  pentru camerele MofA).

Fiecare probă de material seminal a fost analizată cu câte 3 lame (12 camere) din fiecare tip, atât imediat cât și la 6 și 12 minute după umplerea

camerei, însumând astfel un număr total de 540 de examinări (5 probe  $\times$  12 camere  $\times$  3 tipuri  $\times$  3 intervale de timp). Experimentul s-a desfășurat prin alternarea celor 3 tipuri de camere utilizate, astfel: examinarea camerei A a lamei 1 pentru fiecare tip imediat după umplere, urmată de examinarea camerei A a lamei 1 pentru fiecare tip la 6 minute după umplere, urmată de examinarea camerei A a lamei 1 pentru fiecare tip după 12 minute de la umplere, urmată de examinarea camerei B a lamei 1 imediat după umplere, ș.a.m.d.

Următorii parametri seminali au fost determinați: concentrația în spermatozoizi (Conc.), mobilitatea totală (TMot), mobilitatea progresivă (PMot), viteza medie a spermatozoidelor (VAP), viteza curbilinie (VCL), viteza în linie dreaptă (VSL), coeficientul de rectilitate (STR), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de oscilație (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF).

#### **5.1.5. Metode suplimentare de examinare a concentrației**

Pentru a verifica precizia rezultatelor oferite de sistemul CASA în ceea ce privește concentrația în spermatozoizi a probelor, s-au folosit unele metode suplimentare, utilizate pe scară largă și considerate ca fiind precise: dispozitivul SQA-Vp (A-tech, Medical Electronic Systems Ltd, Los Angeles, CA, SUA), aparatul Nucleocounter® NC-100™ (Chemometec A/S, Allerød, Danemarca) precum și cu ajutorul camerei de numărare Thoma cu înălțime de 0.1 mm și suprafață de 0.0025 mm<sup>2</sup> (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Germania) prin metoda hemocitometrică.

#### **5.1.6. Analiza rezultatelor**

Datele stocate în calculator au fost introduse într-un document Excel și prelucrate statistic cu ajutorul programului IBM SPSS® Statistics, versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii și deviația standard (SD). Valorile au fost considerate statistic semnificative atunci când  $P < 0.05$ . Pentru a evidenția cazurile în care diferențele între cele 3 tipuri de lame au fost semnificative a fost aplicată analiza One-Way ANOVA, iar pentru a semnaliza prezența unor eventuale corelații între tipurile Leja, MofA și Minitube s-a folosit analiza Pearson (2-tailed).

### **5.2. REZULTATE SI DISCUȚII**

De-a lungul timpului mai mulți autori au comparat rezultatele obținute cu diferite metode pentru determinarea concentrației (Hansen și col., 2006; Camus și col., 2011; López Rodríguez și col., 2011) sau mobilității (Vyt și col., 2004b) materialului seminal de vier. Totuși, în literatura de specialitate lipsesc la momentul actual date cu privire la eventuale comparații ale acestor trei tipuri de camere de analiză: Leja (20μm), MofA (20 μm) și Minitube (20 μm) între ele,

precum și precizia acestor lame în determinarea concentrației, în comparație cu alte metode consacrate de determinare.

### 5.2.1. Efectul camerei de analiză asupra parametrilor cinetici

Valoarea medie, deviația standard, precum și semnificația statistică dintre diferențele înregistrate între diferitele tipuri de camere folosite pentru determinarea unor parametri spermatici la vier (concentrație, mobilitate totală, mobilitate progresivă, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF) sunt redată în tabelul 5.1, tabelul 5.2 și tabelul 5.3.

**Tabelul 5.1./Table 5.1.**

Valorile medii și deviația standard obținute în cadrul evaluării materialului seminal de vier, imediat după umplerea camerei de numărat – comparație între tipurile de cameră de analiză

Mean values and standard deviation obtained within the computer-assisted analysis of boar sperm, immediately after filling the chamber - comparison among the three types of disposable chambers

| Tipul camerei            | Leja<br>(medie ± SD)     | MofA<br>(medie ± SD)     | Minitube<br>(medie ± SD) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Conc (×10 <sup>6</sup> ) | 13,00±2,17 <sup>a</sup>  | 15,71±3,18 <sup>a</sup>  | 11,42±2,02 <sup>a</sup>  |
| TMot (%)                 | 76,47±5,30 <sup>a</sup>  | 72,98±6,51 <sup>b</sup>  | 75,69±5,33 <sup>a</sup>  |
| PMot (%)                 | 69,86±7,86 <sup>a</sup>  | 55,20±9,71 <sup>b</sup>  | 68,53±8,64 <sup>a</sup>  |
| VAP (μm/sec)             | 58,31±7,60 <sup>a</sup>  | 46,39±4,16 <sup>b</sup>  | 58,19±7,79 <sup>a</sup>  |
| VCL (μm/sec)             | 95,55±18,54 <sup>a</sup> | 81,71±13,29 <sup>b</sup> | 93,12±18,29 <sup>a</sup> |
| VSL (μm/sec)             | 51,17±6,86 <sup>a</sup>  | 40,04±4,84 <sup>b</sup>  | 51,82±7,15 <sup>a</sup>  |
| STR (VSL/VAP)            | 0,87±0,04 <sup>ab</sup>  | 0,86±0,05 <sup>b</sup>   | 0,89±0,04 <sup>ac</sup>  |
| LIN (VSL/VCL)            | 0,54±0,09 <sup>ab</sup>  | 0,50±0,11 <sup>b</sup>   | 0,57±0,10 <sup>ac</sup>  |
| WOB (VAP/VCL)            | 0,62±0,08 <sup>a</sup>   | 0,58±0,09 <sup>b</sup>   | 0,63±0,09 <sup>a</sup>   |
| ALH (μm)                 | 2,51±0,42 <sup>a</sup>   | 2,30±0,44 <sup>b</sup>   | 2,36±0,40 <sup>ab</sup>  |
| BCF (Hz)                 | 36,15±1,99 <sup>a</sup>  | 34,26±2,24 <sup>b</sup>  | 37,67±2,49 <sup>c</sup>  |

În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Dacă în cazul concentrației diferențele sunt nesemnificative din punct de vedere statistic ( $p < 0.05$ ), în schimb toți parametrii cinetici au prezentat diferențe semnificative în funcție de tipul de lamă folosit la analiză. Rezultatele cele mai bune au fost oferite de camera Leja pentru parametrii TMot, PMot, VAP, VCL, VSL și ALH, în timp ce camera Minitube a oferit rezultate superioare pentru

parametrii STR, LIN, WOB și BCF. Toți parametrii cinetici analizați au prezentat valori mai mici atunci când s-a folosit camera MofA.

De remarcat însă faptul că valorile obținute cu Leja pentru mobilitatea totală și cea progresivă nu diferă semnificativ de cele obținute cu Minitube, ceea ce înseamnă că cele două camere vor tinde să ofere rezultate similare din acest punct de vedere. Deviația standard este apropiată ca valoare pentru toate cele trei tipuri de cameră indicând un grad de repetabilitate aproximativ asemănător.

Fiecare producător folosește o tehnică proprie și anumite materiale pentru fabricarea unui produs, iar acest lucru se aplică și în cazul camerelor de examinare a materialului seminal. În acest caz, substanțele chimice folosite pentru crearea stratului superficial precum și lipiciul folosit la îmbinarea componentelor în cazul unor tipuri de lame ar putea acționa toxic asupra spermatozoizilor ceea ce le va afecta capacitatea de deplasare, fiind cunoscut faptul că scăderea mobilității este unul dintre principalele semne ale intoxicației spermatozoizilor (Rajkovic și col., 2006). Pentru a se putea observa mai bine un potențial efect toxic, în cadrul acestui studiu materialul seminal a fost examinat de asemenea la 6 și 12 minute după umplerea camerei de analiză. În tabelul 5.2 se pot observa rezultatele obținute la 6 minute după umplere.

Camerele Leja și Minitube au oferit din nou rezultate mai bune și relativ asemănătoare pentru procentul mobilității, fără diferențe semnificative ( $p < 0.05$ ) între ele. De altfel, rezultatele oferite de către cele două tipuri amintite sunt foarte apropiate pentru toți parametrii cinetici, cu excepția BCF, ceea ce sugerează ca acestea oferă spermatozoizilor condiții relativ asemănătoare în timpul examinării.

Față de evaluarea imediat după umplerea camerei de analiză, s-a înregistrat o scădere accentuată a mobilității (21,95% pentru TMot, respectiv 29,97 pentru PMot) și a parametrilor VAP, VCL și VSL obținute cu tipul MofA. Așadar, nu doar procentul de spermatozoizi mobili a scăzut foarte mult, ci și viteza de deplasare a acestora. De asemenea, la 6 minute după umplerea camerei de analiză, s-a înregistrat o creștere însemnată a valorii deviației standard, fapt ce semnalează o diminuare a omogenității rezultatelor și a gradului de repetabilitate a metodei folosite (tabelul 5.2).

**Tabelul 5.2./Table 5.2.**

Valorile medii și deviația standard obținute în cadrul evaluării materialului seminal de vier, la șase minute după umplerea camerei de numărat – comparație între tipurile de cameră de analiză

Mean values and standard deviation obtained within the computer-assisted analysis of boar sperm, at six minutes after filling the chamber - comparison among the three types of disposable chambers

| Tipul camerei                    | Leja<br>(medie ± SD)     | MofA<br>(medie ± SD)     | Minitube<br>(medie ± SD) |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Conc ( $\times 10^6$ )           | 10,24±1,95 <sup>a</sup>  | 10,62±2,81 <sup>a</sup>  | 8,82±2,63 <sup>b</sup>   |
| TMot (%)                         | 69,57±9,25 <sup>a</sup>  | 51,03±17,96 <sup>b</sup> | 69,88±12,18 <sup>a</sup> |
| PMot (%)                         | 59,85±12,77 <sup>a</sup> | 25,23±15,96 <sup>b</sup> | 59,68±15,85 <sup>a</sup> |
| VAP ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) | 55,10±9,20 <sup>a</sup>  | 32,57±5,99 <sup>b</sup>  | 53,38±7,88 <sup>a</sup>  |
| VCL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) | 90,94±17,86 <sup>a</sup> | 64,32±15,34 <sup>b</sup> | 89,62±14,40 <sup>a</sup> |
| VSL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) | 48,54±8,73 <sup>a</sup>  | 26,74±5,05 <sup>b</sup>  | 47,17±7,99 <sup>a</sup>  |
| STR (VSL/VAP)                    | 0,88±0,04 <sup>a</sup>   | 0,82±0,04 <sup>b</sup>   | 0,88±0,04 <sup>a</sup>   |
| LIN (VSL/VCL)                    | 0,54±0,09 <sup>a</sup>   | 0,42±0,08 <sup>b</sup>   | 0,53±0,10 <sup>a</sup>   |
| WOB (VAP/VCL)                    | 0,61±0,08 <sup>a</sup>   | 0,51±0,08 <sup>b</sup>   | 0,60±0,09 <sup>a</sup>   |
| ALH ( $\mu\text{m}$ )            | 2,31±0,46 <sup>a</sup>   | 2,07±0,64 <sup>b</sup>   | 2,20±0,38 <sup>ab</sup>  |
| BCF (Hz)                         | 36,72±1,99 <sup>a</sup>  | 28,93±3,90 <sup>b</sup>  | 38,22±2,03 <sup>c</sup>  |

În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

În ceea ce privește parametrii seminali calculați la 12 minute după umplerea camerei de analiză (tabelul 5.3), se poate observa o scădere a parametrilor cinetici pentru toate cele trei tipuri de cameră de analiză, însă mai ales în cazul camerei MofA, unde valoarea mobilității progresive a scăzut până la 5,42%.

**Tabelul 5.3./Table 5.3.**

Valorile medii și deviația standard obținute în cadrul evaluării materialului seminal de vier, la 12 minute după umplerea camerei de numărat – comparație între tipurile de cameră de analiză

Mean values and standard deviation obtained within the computer-assisted analysis of boar sperm, at 12 minutes after filling the chamber - comparison among the three types of disposable chambers

| Tipul camerei          | Leja<br>(medie ± SD)    | MofA<br>(medie ± SD)    | Minitube<br>(medie ± SD) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Conc ( $\times 10^6$ ) | 9,29±1,46 <sup>ab</sup> | 8,49±2,40 <sup>bc</sup> | 6,89±2,04 <sup>c</sup>   |

**Tabelul 5.3./Table 5.3. - continuare**

| Tipul camerei      | Leja<br>(medie $\pm$ SD)       | MofA<br>(medie $\pm$ SD)       | Minitube<br>(medie $\pm$ SD)   |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| TMot (%)           | 67,03 $\pm$ 6,29 <sup>a</sup>  | 26,91 $\pm$ 13,59 <sup>b</sup> | 63,85 $\pm$ 8,23 <sup>a</sup>  |
| PMot (%)           | 57,76 $\pm$ 7,91 <sup>a</sup>  | 5,42 $\pm$ 5,46 <sup>b</sup>   | 55,77 $\pm$ 9,58 <sup>a</sup>  |
| VAP ( $\mu$ m/sec) | 52,70 $\pm$ 7,21 <sup>a</sup>  | 28,61 $\pm$ 10,51 <sup>b</sup> | 52,43 $\pm$ 5,17 <sup>a</sup>  |
| VCL ( $\mu$ m/sec) | 85,39 $\pm$ 16,98 <sup>a</sup> | 47,44 $\pm$ 20,76 <sup>b</sup> | 85,37 $\pm$ 14,55 <sup>a</sup> |
| VSL ( $\mu$ m/sec) | 46,51 $\pm$ 6,99 <sup>a</sup>  | 23,31 $\pm$ 8,18 <sup>b</sup>  | 46,66 $\pm$ 5,93 <sup>a</sup>  |
| STR (VSL/VAP)      | 0,86 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>   | 0,76 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>   | 0,87 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>   |
| LIN (VSL/VCL)      | 0,54 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>   | 0,47 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>   | 0,55 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>   |
| WOB (VAP/VCL)      | 0,61 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>   | 0,57 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>   | 0,61 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>   |
| ALH ( $\mu$ m)     | 2,17 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>   | 2,84 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>   | 2,12 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>   |
| BCF (Hz)           | 36,24 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>  | 18,03 $\pm$ 8,68 <sup>b</sup>  | 37,65 $\pm$ 1,60 <sup>a</sup>  |

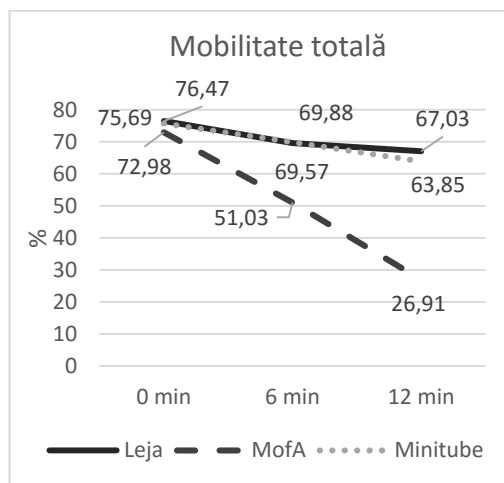
În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Scăderea mobilității materialului seminal odată cu trecerea timpului în cadrul examinării este un lucru normal, de aceea unii autori recomandă ca proba să fie analizată în intervalul de 5 minute de la umplerea camerei (Contri și col, 2010). Totuși, se poate observa o scădere mult mai redusă în cazul camerelor Leja și Minitube, fapt ce sugerează că substanțele folosite la producerea camerei MofA ar putea avea un efect toxic asupra spermatozoizilor de vier.

Din nou, valorile obținute cu tipul Leja nu au prezentat diferențe semnificative ( $p > 0.05$ ) față de cele obținute cu Minitube, pentru toți parametrii cinetici determinați.

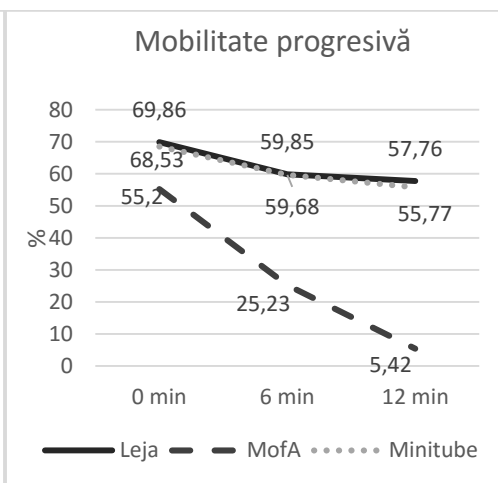
Efectul camerei de analiză asupra procentului de spermatozoizi mobili din proba de analizat este ilustrat în figurile 5.2 și 5.3.

Așa cum s-a menționat anterior, valorile mobilității (atât cea totală cât și cea progresivă) au fost mai mici în cazul camerei MofA, iar efectul timpului trecut de la umplerea camerei a fost mult mai accentuat. Valorile medii au fost mai apropiate de cele înregistrate imediat după umplere iar deviația standard mai redusă în cazul camerelor Leja și Minitube, ceea ce sugerează că acestea sunt mai precise și mai sigure, permițând o analiză cu rezultate acceptabile a materialului seminal chiar și după 12 minute.



**Figura 5.2** Mobilitatea totală a spermatozoidelor în funcție de tipul de cameră și timpul scurs de la umplere

**Figure 5.2.** Total sperm motility according to the chamber type and time after filling



**Figura 5.3** Mobilitatea progresivă a spermatozoidelor în funcție de tipul de cameră și timpul scurs de la umplere

**Figure 5.3.** Progressive sperm motility according to the chamber type and time after filling

Sunt necesare studii suplimentare asupra camerei de numărare MofA, pentru a confirma sau infirma efectul negativ exercitat asupra parametrilor cinetici ai materialului seminal și pentru a determina dacă acesta se datorează unor factori chimici (substanța folosită la crearea stratului superficial, lipiciul utilizat pentru îmbinarea componentelor) sau mecanici, cauzăți de designul diferit. De asemenea, se recomandă efectuarea unui studiu și pe material seminal provenit de la alte specii, fiind cunoscută sensibilitatea mai mare a spermatozoidelor de vier.

### 5.2.2. Efectul camerei de analiză asupra concentrației materialului seminal

Având în vedere posibilitatea ca cele trei tipuri de cameră de analiză să ofere rezultate diferite, studiul de față a folosit metode suplimentare de determinare a concentrației, pentru a putea decide care dintre camere este mai precisă. Astfel, concentrația a mai fost determinată cu ajutorul aparatelor SQA-Vp și Nucleocounter® NC-100™ precum și cu ajutorul camerei de numărare Thoma, prin metoda hemocitometrică.

Aparatul SQA-Vp (Sperm quality analyzer -version pig) convertește variațiile densității optice în semnale electrice pentru a estima numărul de spermatozoizi

din proba analizată, iar eficiența sa a fost demonstrată anterior (López Rodríguez și col, 2011).

Aparatul Nucleocounter® calculează automat numărul de celule din proba analizată, funcționând pe principiul identificării nucleilor prin colorarea acestora cu iodură de propidium și analizarea ulterioară prin microscopia cu fluorescență integrată. Nucleocounter® tinde să devină o nouă metodă de referință pentru determinarea concentrației materialului seminal deoarece prezintă un grad de precizie ridicat (Hansen și col., 2006) dar are unele avantaje față de metoda hemocitometrică, cum ar fi timpul de analiză mult mai scurt și efectuarea unui examen suplimentar (calcularea viabilității).

Hemocitometrul reprezintă metoda cea mai facilă și mai ieftină pentru determinarea concentrației materialului seminal, fiind numită metoda standard „de aur” pentru determinarea concentrației (Rijsselaere și col., 2003; Prathalingam și col., 2006). Totuși, din motive de igienă precum și din motive practice (timpul prea mare necesar unei măsurători) tendința actuală este de a se înlocui aceste camere de numărat clasice cu unele de unică folosință. În plus, calitatea camerelor reutilizabile este afectată de uzura în timp sau de eventualele zgârieturi apărute în urma multiplelor spălări, ceea ce crește riscul unor rezultate eronate.

În tabelul 5.4 sunt prezentate rezultatele obținute pentru concentrația în spermatozoizi, în funcție de metoda și de tipul de cameră folosite.

**Tabelul 5.4/Table 5.4.**

Valorile obținute pentru parametrul Concentrație, în funcție de metoda folosită.

În cazul analizei computerizate, au fost utilizate trei tipuri diferite de cameră:

Leja (20μm), MofA (20 μm) și Minitube (20 μm)

The values for sperm concentration, according to the method used for determination. In case of computer-assisted sperm analysis, three different counting chambers were used: Leja (20μm), MofA (20 μm) and Minitube (20 μm)

| Analiza computerizată (CASA)                  |                                               |                                                   | SQA-Vp<br>( $\times 10^6$ ) | Nucleocounter®<br>( $\times 10^6$ ) | Camera<br>Thoma<br>( $\times 10^6$ ) |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Leja<br>(media $\pm$ SD)<br>( $\times 10^6$ ) | MofA<br>(media $\pm$ SD)<br>( $\times 10^6$ ) | Minitube<br>(media $\pm$ SD)<br>( $\times 10^6$ ) |                             |                                     |                                      |
| 13,00 $\pm$ 2,17 <sup>a</sup>                 | 15,71 $\pm$ 3,18 <sup>b</sup>                 | 11,42 $\pm$ 2,02 <sup>c</sup>                     | 24,18                       | 25,52                               | 25,50                                |

\*În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă la  $p < 0.05$

\*\* Pentru Leja, MofA și Minitube s-au luat în calcul valorile obținute imediat după umplerea camerei

\*\*\* Deviația standard a fost omisă în cazul SQA-Vp, Nucleocounter și Camera Thoma, deoarece numărul de determinări a fost mult mai mic.

Făcând comparație între cele trei tipuri de cameră de analiză, se pot observa diferențe semnificative, cu MofA prezentând valoarea cea mai mare (dar și cea mai mare deviație standard), Leja o valoare intermediară și Minitube valoarea cea mai mică. Totuși, nici una dintre camere nu s-a apropiat de rezultatele obținute cu metodele suplimentare de analiză.

Atât aparatele SQA-Vp și Nucleocounter cât și camera de numărat Thoma pot fi considerate metode de referință, iar în studiul de față au prezentat valori foarte apropiate, ceea ce întărește ipoteza că valorile obținute cu ele sunt foarte aproape de valoarea reală.

Așadar, se pare că sistemul CASA poate prezenta unele deficiențe în ceea ce privește determinarea concentrației materialului seminal diluat de vier indiferent de tipul de cameră folosit pentru analiză, rezultate asemănătoare fiind obținute și de alți autori (Vyt și col., 2004b; Hansen și col., 2006). Această imprecizie se datorează cel mai probabil aglutinării spermatozoizilor în proba analizată. Spermatozoizii de vier se caracterizează printr-o rată mare a aglutinării în timpul conservării în stare lichidă la 17°C, unii autori indicând printre cauze contaminarea bacteriană (Ubeda și col., 2013; Prieto-Martínez și col., 2014, Kuster și Althouse, 2016). Acest fapt induce apariția de grupuri de spermatozoizi adunați în grămezi pe care sistemul CASA nu îi mai poate detecta, software-ul identificând doar spermatozoizii cu capetele libere. În acest fel, numărul total de spermatozoizi calculat este mai mic. Pe de altă parte, SQA-Vp și Nucleocounter funcționează pe alte principii, care le permit numărarea inclusiv a spermatozoizilor aglutinați.

Analiza Pearson arată un grad mare de corelație ( $p < 0.01$ ) între tipurile de cameră în ceea ce privește concentrația calculată (tabelul 5.5).

**Tabelul 5.5./Table 5.5.**

Corelații între cele trei tipuri de lame utilizate, în ceea ce privește calcularea concentrației în spermatozoizi a materialului seminal  
Correlations among the three types of analyzing chambers used within the study as regards the calculated sperm concentration

|          |                               | Leja    | MofA    | Minitube |
|----------|-------------------------------|---------|---------|----------|
| Leja     | Valoarea corelației (Pearson) | 1       | 0,618** | 0,594**  |
|          | Semnificație (2-tailed)       |         | 0,000   | 0,000    |
| MofA     | Valoarea corelației (Pearson) | 0,618** | 1       | 0,693**  |
|          | Semnificație (2-tailed)       | 0,000   |         | 0,000    |
| Minitube | Valoarea corelației (Pearson) | 0,594** | 0,693** | 1        |
|          | Semnificație (2-tailed)       | 0,000   | 0,000   |          |

\*\* . Corelația este semnificativă la  $p < 0.01$

Prin urmare, deși atât tipul Leja cât și tipurile MofA și Minitube oferă valori mult mai mici decât valoarea reală, totuși rezultatele lor se află sub influența unui factor comun, ceea ce întărește ipoteza aglutinării spermatozoizilor ca fiind elementul ce determină imprecizia sistemului CASA.

### **5.3. CONCLUZII PARȚIALE**

1. Studiul de față sugerează că rezultatele oferite de sistemul CASA la examinarea materialului seminal diluat de vier sunt influențate într-o măsură apreciabilă de tipul de cameră folosit la analiză.

2. În acest studiu camerele Leja și Minitube au oferit valori foarte apropiate, în timp ce camera MofA a oferit valori semnificativ mai mici. Sunt necesare studii suplimentare asupra camerei de analiză MofA, pentru a confirma sau infirma efectul negativ exercitat asupra parametrilor cinetici ai materialului seminal și pentru a determina dacă acesta se datorează unor factori chimici sau mecanici. De asemenea, se recomandă efectuarea unui studiu și pe material seminal provenit de la alte specii, fiind cunoscută sensibilitatea mai mare a spermatozoizilor de vier.

3. A fost observată o diferență semnificativă între concentrația determinată cu ajutorul CASA și cea obținută cu alte mijloace (Nucleocounter, SQA-Vp, camera Thoma). Metodele de referință utilizate în acest studiu prezintă o eficiență demonstrată anterior de alți autori iar valorile obținute cu acestea au fost foarte apropiate între ele, fapt ce sugerează că este vorba de o subestimare din partea sistemului CASA și nu de o supraestimare din partea celorlalte dispozitive.

**CAPITOLUL VI. OPTIMIZAREA PROCESĂRII ȘI CONSERVĂRII  
MATERIALULUI SEMINAL DE VIER  
CHAPTER VI. RESEARCH ACTIVITIES FOR THE IMPROVEMENT OF  
BOAR SEMEN PROCESSING**

Principala metodă de conservare a materialului seminal de vier este depozitarea în stare lichidă, timp de câteva zile la aproximativ 17 °C, după prelucrare. Această metodă s-a dovedit a fi mai eficientă decât congelarea, protejând mai bine capacitatea fecundantă a spermatozoizilor (Hu și col., 2015). Majoritatea diluanților pentru materialul seminal de vier aflați pe piață sunt concepuți în acest sens.

Diluanții pentru conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă se împart în general în două grupe: diluanți pe termen scurt (care permit conservarea timp de până la 3 zile) și diluanți pe termen lung (care permit conservarea peste 4 zile), deși unii autori (Pinart și col., 2015) propun o clasificare în patru grupe, respectiv diluanți pentru termen scurt (3-4 zile), mediu (5-6 zile), lung (7-8 zile) și extra-lung (peste 8 zile). Totuși, indiferent de tipul de diluant folosit, cele mai multe înșămânțări artificiale sunt efectuate în primele 3 zile după recoltare, deoarece se pare că prolificitatea scade dacă sperma folosită e mai veche de 4 zile (Johnson și col., 2000). Ținând cont de acest aspect, utilizarea diluanților pe termen lung ar fi inutilă, însă în realitate aceștia sunt utilizați pe scară largă, după ce s-a arătat că sunt mai eficienți în menținerea calității materialului seminal (Waterhouse și col., 2004; Dubé și col., 2004).

O mai bună cunoaștere a unor eventuale corelații între parametrii materialului seminal brut și cei ai materialului seminal după prelucrare și conservare ar fi de mare ajutor centrelor de producție de material seminal de vier, permițându-le să selecteze doar ejaculatele cu o rezistență bună la conservare.

De-a lungul timpului, mai mulți autori au încercat să găsească anumite corelații între parametrii spermei brute sau diluate și capacitatea de a fertiliza ovocitele (Flowers, 1997; Hirai și col., 2001; Sutkeviciene și col., 2005; McPherson și col., 2014). Literatura de specialitate este însă săracă în informații cu privire la corelațiile dintre parametrii determinați în cadrul examenului general al spermei brute și cei ai spermei după diluare și conservare, deși acest aspect prezintă o importanță apreciabilă pentru centrele de producție. De obicei, în cadrul procesării spermei, ejaculatele cu mai puțin de 60-70% mobilitate totală

sunt eliminate înainte de diluție, fiind astfel procesate doar ejaculatele cu mobilitate foarte bună. Totuși, dintre acestea, unele prezintă o calitate inferioară după conservare, ceea ce le face improprie utilizării la înșămânțare artificială. În aceste condiții, cunoașterea factorilor care semnalează potențialul unui ejaculat de a-și păstra valoarea biologică s-ar dovedi foarte utilă.

În trecut, dozele de înșămânțare artificială la suine erau umplute și închise manual iar această practică este încă utilizată în unele centre de producție. Umplerea automată a dozelor de înșămânțare prezintă un avantaj economic important față de metoda umplerii manuale, scurtând timpul necesar ambalării spermei și făcând posibilă umplerea unui număr mult mai mare de doze în cursul unei zile de muncă. Contactul spermei cu aerul este scurtat iar riscul contaminării este redus, dar pe de altă parte spermatozoizii intră în contact cu părțile unei mașini de umplere ce necesită o igienă riguroasă și sunt pompați în tuburi la viteză ridicată. Astfel, o întrebare normală ar fi dacă umplerea automată poate influența calitatea materialului seminal conservat. Din păcate, nu au putut fi găsite studii referitoare la posibilul impact al acestei metode de împachetare asupra calității materialului seminal de vier, în comparație cu metoda veche, manuală. Au fost depuse eforturi pentru aprecierea eficacității a diferite tipuri de recipiente, atât la suine (Eriksson și col., 2002) cât și la alte specii (Brinsko și col., 2000; Webb și col., 2005; Lopes și col., 2009), însă nu au putut fi găsite studii ce au comparat aceste metode de umplere și respectiv aceste tipuri de recipiente pentru sperma de vier.

Scopul acestor activități de cercetare a fost de a identifica eventualele diferențe în ceea ce privește parametrii cinetici ai spermei între un diluant pe termen scurt și unul pe termen lung în timpul unei perioade de conservare de șapte zile, de a detecta eventualele corelații între unii parametri ai spermei brute și cei ai spermei diluate și conservate timp de trei zile la 17°C și de a compara eficiența a două tipuri de recipiente pentru sperma de vier, mai exact tubul umplut și închis automat și flaconul umplut și închis manual în protejarea calității materialului seminal în timpul conservării.

## **6.1. STUDIU COMPARATIV PRIVIND EFICIENȚA A DOI DILUANȚI DIN CLASE DIFERITE (DILUANT PE TERMEN SCURT ȘI DILUANT PE TERMEN LUNG)**

### **6.1.1 Material și metodă**

Cinci ejaculate provenite de la cinci vieri clinic sănătoși și apți din punct de vedere sexual au fost recoltate prin metoda manuală (Bogdan, 1999; Ciornei, 2012) în cadrul unei unități comerciale specializate în producția de doze de înșămânțare artificială pentru suine. După examinarea generală, toate

ejaculatele au fost împărțite în două alicote și diluate în două moduri: cu un diluant pe termen scurt - BTS® (Minitube, Tiefenbach, Germania)(figura 6.1.-a) și respectiv cu un diluant pe termen lung – DiluPorc™ (Sinus Biochemistry & Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germania) (figura 6.1.-b), respectând specificațiile fiecărui producător. Sperma diluată astfel a fost examinată în ziua diluției (Ziua 0) precum și după una (Ziua 1), două (Ziua 2), trei (Ziua 3), patru (Ziua 4), cinci (Ziua 5) și șapte (Ziua 7) zile, cu ajutorul sistemului CASA, programul SpermVision versiunea 3.7 (Minitube of America - MOFA®, Verona, WI, USA) conectat la un microscop optic Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania) prevăzut cu placă încălzită la 38°C. S-au determinat următorii parametri: mobilitate totală (TMot), mobilitate progresivă (PMot), viteză în linie dreaptă (VSL), viteza medie (VAP), viteza curbilinie (VCL), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de rectilinitate (STR), coeficientul wobble (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH), frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF). Setările sistemului au fost ajustate după cum urmează: pentru parametrul “mobilitate totală” au fost luați în calcul toți spermatozoizii ce au prezentat orice tip de mișcări, în timp ce pentru “mobilitate progresivă” au fost luați în considerare doar spermatozoizii prezentând o viteză medie de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilinitate de cel puțin 0,3.



Figura 6.1. Diluanții utilizați pentru diluarea materialului seminal, prezentare comercială

a-diluantul pe termen scurt; b-diluantul pe termen lung

Figure 6.1. The extenders used for semen dilution during the study  
a-short term extender; b-long term extender

Datele înregistrate în calculator au fost procesate folosind programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii și deviația standard (SD). Diferențele

Între valorile oferite de cei doi diluanți folosiți la prelucrarea materialului seminal au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic atunci când  $p < 0,05$ . Pentru a identifica diferențele semnificative dintre cei doi diluanți, s-a folosit analiza "Independent t-test", luând în calcul prezumția de variații egale.

### 6.1.2 Rezultate și discuții

Ambii diluanți au oferit valori satisfăcătoare după șapte zile de conservare, în ceea ce privește parametrii cinetici (tabelul 6.1). Mobilitatea progresivă s-a menținut peste 60%, valoare ce reprezintă pragul de acceptare înainte de înșămânțarea artificială recomandat de unii autori (Flowers, 1997; Johnson și col., 2000).

**Tabelul 6.1/Table 6.1.**

Valorile parametrilor seminali oferite de diluantul pe termen scurt și diluantul pe termen lung, după șapte zile de conservare  
The values of seminal parameters for short-term and long-term extenders, as determined after seven days of storage

|                         |       | TMot               | PMot               | VAP                | VCL                | VSL                | STR               | LIN               | WOB               | ALH               | BCF                |
|-------------------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Diluant pe termen scurt | Medie | 75.43 <sup>a</sup> | 66.31 <sup>a</sup> | 56.43 <sup>a</sup> | 120.8 <sup>a</sup> | 43.37 <sup>a</sup> | 0.76 <sup>a</sup> | 0.36 <sup>a</sup> | 0.46 <sup>a</sup> | 3.44 <sup>a</sup> | 32.06 <sup>a</sup> |
|                         | SD    | 0.50               | 4.24               | 6.21               | 20.17              | 3.24               | 0.07              | 0.06              | 0.04              | 0.87              | 3.46               |
| Diluant pe termen lung  | Medie | 74.37 <sup>a</sup> | 66.88 <sup>a</sup> | 66.89 <sup>b</sup> | 132.7 <sup>a</sup> | 54.20 <sup>b</sup> | 0.80 <sup>a</sup> | 0.41 <sup>a</sup> | 0.50 <sup>a</sup> | 3.58 <sup>a</sup> | 33.17 <sup>a</sup> |
|                         | SD    | 2.33               | 3.74               | 6.74               | 23.05              | 3.66               | 0.08              | 0.07              | 0.05              | 0.90              | 3.23               |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică diferențe semnificative între diluanți ( $p < 0.05$ )

Un aspect interesant observat a fost acela că nu s-au evidențiat diferențe semnificative între cei doi diluanți în ceea ce privește mobilitatea totală și progresivă ( $p < 0.05$ ). De fapt, doar doi dintre parametrii cinetici determinați au prezentat diferențe semnificative, mai exact viteza medie (VAP) și viteza în linie dreaptă (VSL) (tabelul 6.2). Ambii parametri au oferit valori mai mari atunci când s-a folosit diluantul pe termen lung, ceea ce înseamnă că acesta ar putea stimula mai bine metabolismul spermatozoizilor, ajutându-i să se deplaseze mai repede.

**Tabelul 6.2/Table 6.2.**

Analiza Independent t-test a rezultatelor oferite de cei doi diluanți, după șapte zile de conservare (prezumția de variații egale)  
Independent t-test analysis of the results offered by the two extenders, after seven days of storage (presumption of equal variations)

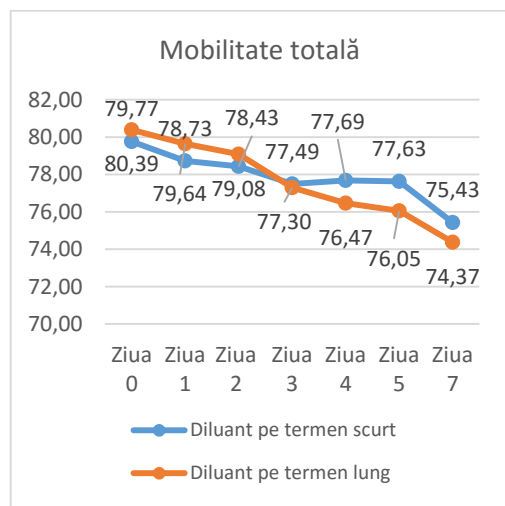
|      | Testul Levene pentru egalitatea variațiilor |       | Testul t pentru egalitatea valorilor medii |                 |                                                 |
|------|---------------------------------------------|-------|--------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------|
|      | F                                           | Sig.  | Grade de libertate                         | Sig. (2-tailed) | Diferența între valorile medii (BTS®-Diluporc™) |
| TMot | 2.933                                       | 0.125 | 8                                          | <b>0.351</b>    | 1,06                                            |
| PMot | 0.009                                       | 0.928 | 8                                          | <b>0.830</b>    | - 0,56                                          |
| VAP  | 0.254                                       | 0.628 | 8                                          | <b>0.034</b>    | -10,46                                          |
| VCL  | 0.085                                       | 0.778 | 8                                          | <b>0.409</b>    | -11,93                                          |
| VSL  | 0.766                                       | 0.407 | 8                                          | <b>0.001</b>    | -10,83                                          |
| STR  | 0.026                                       | 0.876 | 8                                          | <b>0.421</b>    | - 0,04                                          |
| LIN  | 0.016                                       | 0.903 | 8                                          | <b>0.260</b>    | - 0,05                                          |
| WOB  | 0.020                                       | 0.891 | 8                                          | <b>0.231</b>    | - 0,04                                          |
| ALH  | 0.075                                       | 0.791 | 8                                          | <b>0.805</b>    | - 0,14                                          |
| BCF  | 0.105                                       | 0.755 | 8                                          | <b>0.617</b>    | - 1,10                                          |

Toți ceilalți parametri cinetici au prezentat doar diferențe minore după șapte zile de conservare, lipsite de semnificație statistică (tabelul 6.2), ceea ce sugerează că cei doi diluanți oferă spermatozoizilor condiții similare.

#### *6.1.2.1. Variația procentului mobilității în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit*

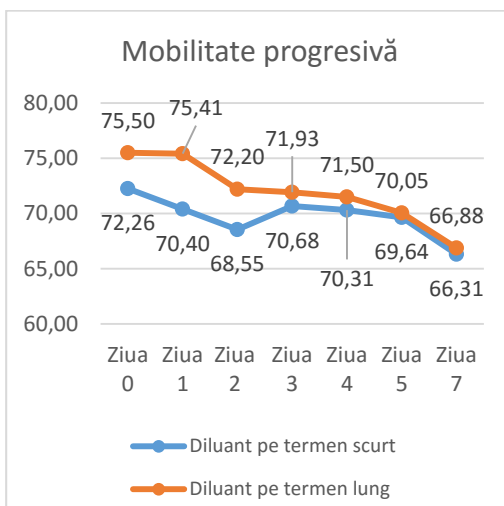
Printre alte teste, determinarea modificărilor suferite de procentul mobilității în timpul depozitării reprezintă un instrument important în evaluarea capacității unui diluant de a conserva calitatea materialului seminal (Martin-Hidalgo și col, 2013). Procentul mobilității este încă unul dintre cei mai evaluați indicatori ai calității materialului seminal, mai ales în centrele de înșămânțare artificială (Lenz și col, 2011), fiind bine cunoscut că o valoare ridicată a acestui parametru este esențială pentru fecundare (Runceanu și col, 2007).

Pentru o mai bună observare a influenței diluantului asupra procentului mobilității, mai jos este prezentată evoluția valorilor determinate în fiecare zi de conservare, începând cu ziua prelucrării și terminând cu a șaptea zi de stocare (figurile 6.2 și 6.3).



**Figura 6.2.** Variația mobilității totale în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.2.** The variation of total motility during preservation, according to the type of extender



**Figura 6.3.** Variația mobilității progresive în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.3.** The variation of progressive motility during preservation, according to the type of extender

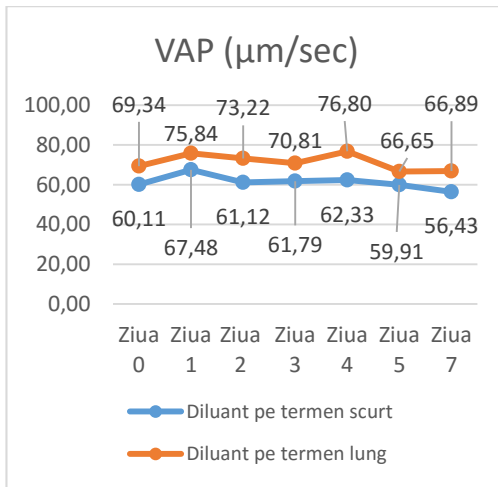
În studiul de față, mobilitatea totală reprezintă procentul de spermatozoizi prezentând orice formă de deplasare, în timp ce mobilitatea progresivă se referă doar la spermatozoizii cu mișcări evidente de înaintare (viteza medie de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilinitate de cel puțin 0,3).

Mobilitatea totală a arătat diferențe minime între cei doi diluanți (sub 2%) în toate cele 7 zile de studiu. În cazul mobilității progresive, s-a putut observa o diferență vizibilă în primele trei zile, după care valorile au tins să se echilibreze, fiind aproape identice în ziua a șaptea. Acest aspect a fost surprinzător, deoarece diluanții pe termen scurt garantează valori bune ale mobilității doar pentru trei zile de conservare. Deși diluanții pe termen lung conțin în mod normal substanțe care protejează celulele seminale mai bine în timpul depozitării pe termen lung, în experimentul nostru acest efect nu a fost semnificativ în ceea ce privește mobilitatea. Absența diferențelor semnificative în ceea ce privește mobilitatea spermatozoizilor între anumiți diluanți pe termen scurt și lung pentru sperma de vier a fost raportată și într-un alt studiu (Vyt și col., 2004a).

### 6.1.2.2. Variația vitezei spermatozoizilor în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

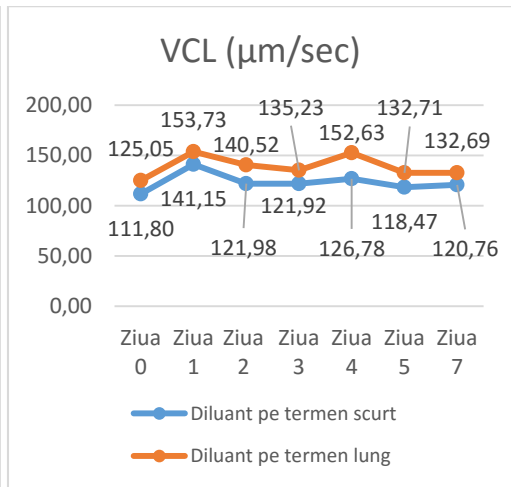
Viteza spermatozoizilor în proba analizată este reflectată de trei parametri: viteza medie (VAP), viteza curbilinie (VCL) și viteza în linie dreaptă (VSL). Efectul acestora asupra calității materialului seminal nu este pe deplin cunoscut. De exemplu, unii autori (Holt și col, 1997; Park, 2013) raportează o corelație negativă între VAP și rata parturițiilor, în timp ce alții raportează corelații pozitive cu fertilitatea (Budworth și col., 1988). Valori mai mari ale acestor parametri indică o deplasare mai rapidă a spermatozoizilor, ceea ce ar putea ajuta la atingerea într-un timp mai scurt a locului de fertilizare, însă pe de altă parte ar putea însemna un consum mai rapid al resurselor energetice.

Deși diluantul pe termen lung a oferit valori mai mari pentru toți cei trei parametri în toate cele șapte zile de studiu (figurile 6.4, 6.5 și 6.6), totuși VCL nu a prezentat diferențe semnificative ( $p > 0.05$ ) în niciuna dintre zile (figura 6.5). Unele diferențe semnificative au fost depistate pentru VAP în zilele 0, 2, 4 și 7 ( $p < 0.05$ ) precum și pentru VSL în zilele 0, 2, 3, 4 și 7 ( $p < 0.05$ ), cu valori mai mari oferite de diluantul pe termen lung.



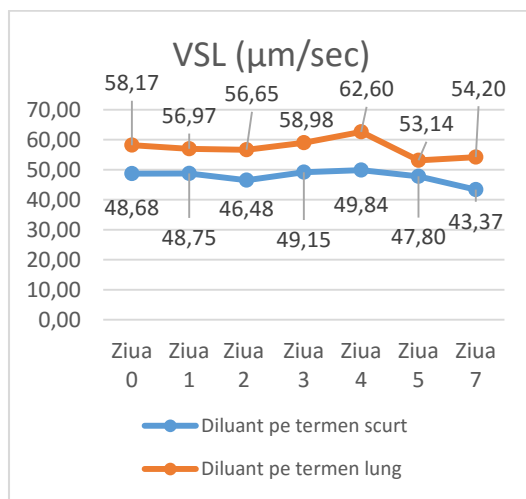
**Figura 6.4.** Variația vitezei medii în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.4.** The variation of average path velocity during preservation, according to the type of extender



**Figura 6.5.** Variația vitezei curbiliniei în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.5.** The variation of curvilinear velocity during preservation, according to the type of extender



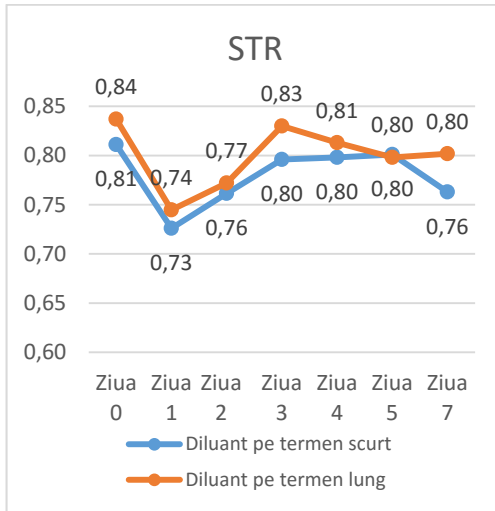
**Figura 6.6.** Variația vitezei în linie dreaptă în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.6.** The variation of straight line velocity during preservation, according to the type of extender

Rezultatele sugerează că diluantul pe termen lung folosit în acest experiment ar putea stimula metabolismul spermatozoidelor mai mult decât diluantul pe termen scurt, însă nu în mod constant.

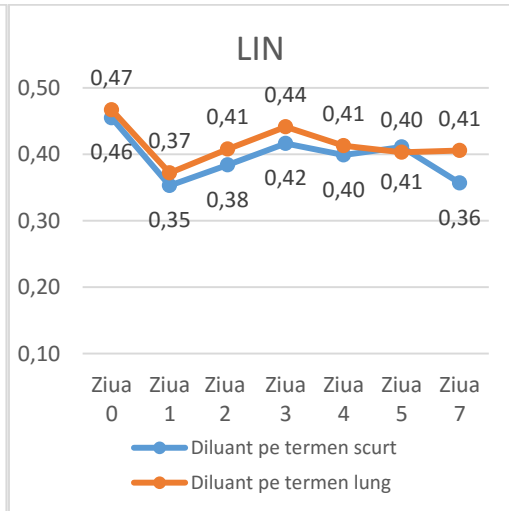
#### 6.1.2.3. Efectul diluantului folosit la prelucrare asupra direcției de deplasare a spermatozoidelor

Există o serie de indicatori determinați de sistemul CASA care reflectă direcția și regularitatea deplasării spermatozoidelor, după cum urmează: coeficientul de rectilitate (STR), care reprezintă raportul dintre VSL și VAP; coeficientul de liniaritate (LIN) care reprezintă VSL și VCL; coeficientul wobble care înseamnă raportul dintre VAP și VCL; amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) care reprezintă distanța medie la care capul spermatozoidului se îndepărtează de traiectoria sa medie; frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF) care arată frecvența cu care capul spermatozoidului se intersectează cu traiectoria medie. Pe scurt, când STR, LIN și WOB au valori mai mari, deplasarea spermatozoidului este mai rectilinie, în timp ce valori mai mari pentru ALH indică o traiectorie mai neregulată, ceea ce sugerează o deplasare mai puțin eficientă.



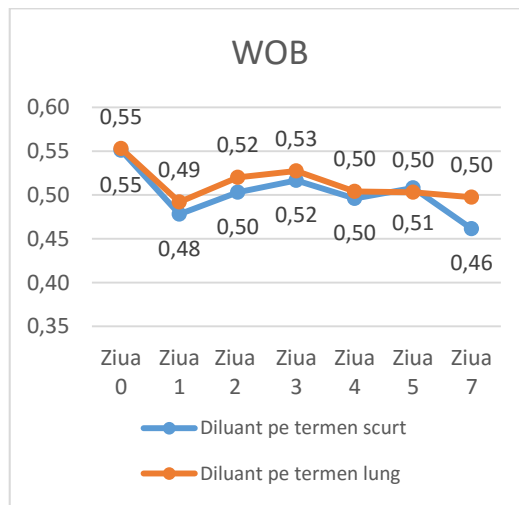
**Figura 6.7.** Variația coeficientului de rectilinitate în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.7.** The variation of straightness coefficient during preservation, according to the type of extender



**Figura 6.8.** Variația coeficientului de liniaritate în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.8.** The variation of linearity coefficient during preservation, according to the type of extender

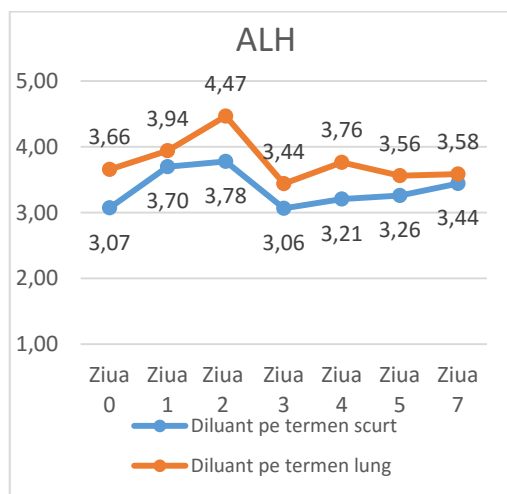


**Figura 6.9.** Variația coeficientului wobble în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.9.** The variation of wobble coefficient during preservation, according to the type of extender

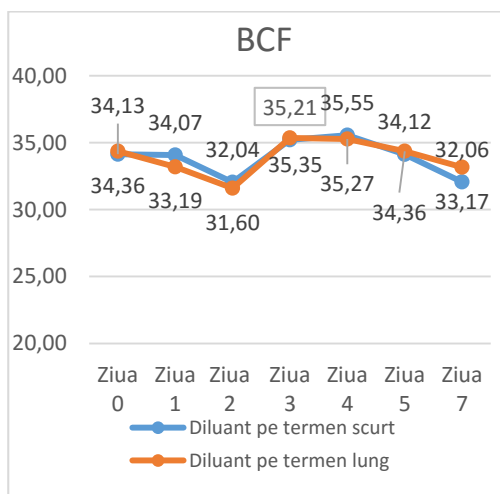
Coeficienții STR, LIN și WOB au prezentat diferențe vizibile între zilele de studiu (figurile 6.7, 6.8 și 6.9). Totuși, nu au fost înregistrate diferențe semnificative între cei doi diluanți ( $p>0.05$ ), în niciuna dintre zile. Ambii diluanți au prezentat valorile cele mai mari în ziua diluării, după care a urmat o scădere pronunțată în ziua următoare, urmată de o creștere până în ziua a treia după diluție și o scădere lentă până în ultima zi de studiu.

Cât despre ALH, valorile cele mai mari pentru ambii diluanți au fost înregistrate în Ziua 2 după diluție (figura 6.10), cu diferențe moderate între zilele de studiu. Din nou, analiza statistică nu a identificat nicio diferență semnificativă între cei doi diluanți, nici măcar în Ziua 2 după diluție, când diferența a fost maximă ( $p=0,27$ ).



**Figura 6.10.** Variația amplitudinii de deplasare a capului în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.10.** The variation of amplitude of lateral head displacement during preservation, according to the type of extender



**Figura 6.11.** Variația frecvenței de intersectare cu traiectoria medie în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit

**Figure 6.11.** The variation of beat cross frequency during preservation, according to the type of extender

ALH indică distanța medie pe care capul spermatozoidului o parcurge în direcție transversală de la traiectorie sa medie. O valoare mai mare a acestui parametru reflectă o distanță mai mare parcursă de spermatozoid într-o direcție greșită, ceea ce duce la un consum mai puțin eficient a resurselor energetice și la prelungirea timpului necesar pentru a ajunge la locul fecundării.

Diferențe minime au fost depistate între cei doi diluanți în ceea ce privește BCF, fără semnificație statistică ( $p > 0.05$ ). De asemenea, diferențele între zilele de studiu au fost relativ scăzute, cu excepția unei creșteri accentuate de la Ziua 2 la Ziua 3 (figura 6.11). BCF indică frecvența la care capul spermatozoidului se intersectează cu traiectoria medie, iar valorile mai reduse înregistrate în Ziua 2 pot fi corelate cu valorile mai mari ale ALH din aceeași zi, deoarece spermatozoizii au parcurs o distanță mai mare pentru a ajunge înapoi la traiectoriile medii, necesitând astfel un interval mai mare de timp.

### 6.1.3 Concluzii parțiale

1. Diluantul pe termen lung folosit în acest experiment (Sinus DiluPorc™) pare să furnizeze rezultate puțin mai bune în cazul depozitării materialului seminal pentru o perioadă mai îndelungată, însă considerăm că ambii diluanți studiați sunt eficienți în vederea conservării în stare lichidă până la șapte zile, la 17°C, fără diferențe majore în ceea ce privește parametrii cinetici.

2. Singurele diferențe semnificative identificate de analiza statistică au fost în cazul vitezei de deplasare, însă nu în toate zilele de studiu. Niciunul dintre ceilalți parametri cinetici nu au prezentat diferențe semnificative, însă trebuie precizat că diluantul pe termen lung a oferit valori ușor mai mari aproape la fiecare examinare.

3. Deși BTS® garantează calitatea materialului seminal doar timp de trei zile de conservare, în studiul de față a menținut toate ejaculatele între valori satisfăcătoare pentru o perioadă mult mai lungă în ceea ce privește parametrii cinetici.

## 6.2. STUDIU PRIVIND CORELAȚIILE ÎNTRE UNII PARAMETRI AI MATERIALULUI SEMINAL BRUT ȘI CEI AI MATERIALULUI SEMINAL DUPĂ PRELUCRARE ȘI CONSERVARE

### 6.2.1 Material și metodă

Studiul a cuprins analiza a peste 1000 de ejaculate recoltate într-o perioadă de doi ani de la 400 de vieri apti de reproducție cazați într-o unitate comercială din Germania specializată în producția de doze de înșămânțare artificială a scroafelor. Recoltarea a fost efectuată prin metoda manuală (Bogdan, 1999) (figura 6.12) dar și cu ajutorul vaginului artificial, folosind un procedeu asemănător celui descris de Barrabes Aneas S. și col. (2008) (figura 6.13), cu un interval de aproximativ șapte zile între două recoltări succesive de la același vier. Doar ejaculatele cu peste 65% mobilitate totală au fost prelucrate, toate celelalte fiind eliminate înaintea diluției.



**Figura 6.12.** Recoltarea materialului seminal de vier prin metoda manuală

**Figure 6.12.** Boar semen collection by manual method



**Figura 6.13.** Recoltarea materialului seminal de vier cu ajutorul vaginului artificial

**Figure 6.13.** Boar semen collection by artificial vagina

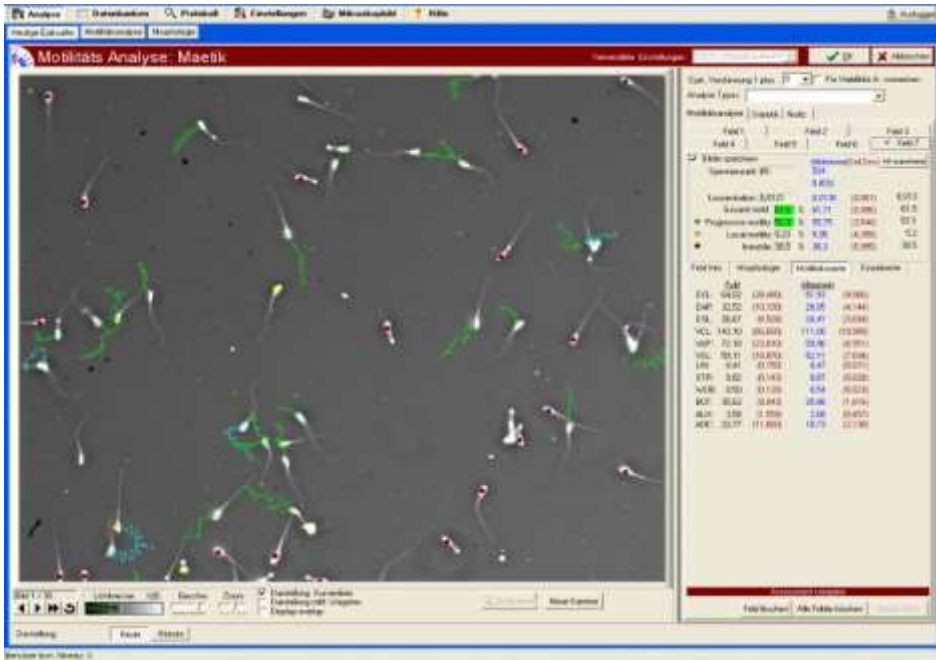
Materialul seminal a fost diluat cu BTS® (Minitube, Tiefenbach, Germania), iar examinarea a fost efectuată în doi pași. Primul pas a constat în evaluarea spermei brute în primele 10 minute după ejaculare, utilizând (cu excepția volumului) dispozitivul SQA-Vp (A-Tech, Medical Electronic Systems Ltd, Los Angeles, CA, USA) (figura 6.14), cu determinarea următorilor parametri: volum, concentrație, mobilitate totală, numărul total de spermatozoizi/ejaculat (TS/Ej.), numărul total de spermatozoizi mobili/ejaculat (TMS/Ej.), numărul total de spermatozoizi mobili/ml (TMS/ml), procentajul spermatozoizilor morfologic normali (%Morph), numărul total de spermatozoizi morfologic normali/ejaculat (TMorphNS/Ej.) și numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali/ejaculat (TMMorphNS/Ej.). Volumul a fost determinat prin cântărire, metodă folosită frecvent în laboratoarele de examinare atașate centrelor de producție a materialului seminal de vier (Lorton, 2014).



**Figura 6.14.** Examinarea materialului seminal brut cu ajutorul dispozitivului SQA-Vp

**Figure 6.14** Raw semen examination using SQA-Vp

Cel de-al doilea pas a fost executat pe materialul seminal după prelucrare și trei zile de conservare în stare lichidă, la 17°C în recipiente de 100 ml (90 ml spermă diluată + 10 ml aer). Pentru această examinare s-a utilizat programul SpermVision versiunea 3.7 (Minitube of America - MOFA®, Verona, WI, SUA) conectat la un microscop optic Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania) prevăzut cu o placă încălzită la 38°C, iar următorii parametri au fost determinați: mobilitate totală (TMot), mobilitate progresivă (PMot), viteză în linie dreaptă (VSL), viteza medie (VAP), viteza curbilinie (VCL), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de rectilinitate (STR), coeficientul wobble (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH), frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF) (figura 6.15). Setările sistemului au fost ajustate după cum urmează: pentru parametrul "mobilitate totală" au fost luați în calcul toți spermatozoizii ce au prezentat orice tip de mișcări, în timp ce pentru "mobilitate progresivă" au fost luați în considerare doar spermatozoizii prezentând o viteză medie de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilinitate de cel puțin 0,3.



**Figura 6.15** Imagine oferită de programul SpermiVision 3.7 în cadrul analizei computerizate a spermei de vier

**Figure 6.15** Image showed by SpermiVision 3.7 during computerized analysis of boar sperm

Datele înregistrate în calculator au fost procesate folosind programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii și deviația standard (SD). Pentru a identifica eventualele corelații între parametrii spermei brute și cei ai spermei prelucrate și conservate, s-a efectuat Corelația Pearson (2-tailed).

### 6.2.2. Rezultate și discuții

Deși principalii indicatori spermatici determinați în cadrul examenului general al spermei brute par să aibă o valoare predictivă redusă asupra fecundității și prolificității (Schulze și col., 2013), aceștia ar putea corela cu parametrii spermei conservate. Astfel, o mai bună cunoaștere a acestor corelații ar fi de un real folos pentru centrele de producție a materialului seminal, dându-le posibilitatea de a selecta doar ejaculatele cu potențial ridicat de conservare.

În continuare sunt prezentate rezultatele analizei Pearson pentru identificarea corelațiilor dintre fiecare parametru determinat pe materialul seminal brut și parametrii materialului seminal prelucrat și conservat.

### 6.2.2.1. Volumul

Analiza Pearson a detectat trei corelații semnificative, mai exact corelații negative cu mobilitatea progresivă și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie și o corelație negativă cu amplitudinea de deplasare laterală a capului (tabelul 6.3.).

**Tabelul 6.3./Table 6.3.**

Corelații între volumul ejaculatului și parametrii seminali după prelucrare și conservare

Correlations between volume of ejaculate and seminal parameters after preservation

|                      | TMot   | PMot     | VAP   | VCL    | VSL   | STR   | LIN   | WOB   | ALH    | BCF      |
|----------------------|--------|----------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| Volumul ejaculatului | -0,060 | -0,081** | 0,011 | -0,006 | 0,031 | 0,031 | 0,029 | 0,027 | 0,065* | -0,135** |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Un volum mai mare al ejaculatului indică o cantitate mai mare de plasmă seminală, deoarece aproximativ 93% din volumul materialului seminal brut este format din plasmă (Ciornei, 2012). Aceasta pare să aibă un impact negativ asupra mobilității și frecvenței de intersectare a spermatozoizilor cu traiectoria medie, însă la o scară redusă, ținând cont de valoarea scăzută a corelației ( $r = -0,081$  și respectiv  $-0,135$ ). Corelația pozitivă cu amplitudinea de deplasare a capului este de asemenea neglijabilă.

### 6.2.2.2. Concentrația în spermatozoizi a ejaculatului

Patru corelații semnificative, deși reduse ca valoare, au fost identificate între concentrația spermei brute și cei ai materialului seminal prelucrat și conservat (tabelul 6.4.).

O valoare mai mare a concentrației în spermatozoizi indică o cantitate mai redusă de plasmă seminală/spermatozoid. Deoarece concentrația a prezentat o corelație pozitivă cu viteza curbilinie dar în același timp una negativă cu coeficientul de rectilinitate, am putea afirma că, deși la o scară redusă (ținând cont de valorile mici ale corelațiilor), un număr mai mare de spermatozoizi/unitatea de volum poate duce la o intensificare a vitezei acestora după conservare însă și la o deplasare mai puțin regulată.

**Tabelul 6.4./Table 6.4.**

Corelații între concentrația ejaculatului și parametri seminali după prelucrare și conservare

Correlations between concentration of raw semen and seminal parameters after preservation

|       | TMot   | PMot   | VAP   | VCL    | VSL    | STR     | LIN      | WOB      | ALH   | BCF   |
|-------|--------|--------|-------|--------|--------|---------|----------|----------|-------|-------|
| Conc. | -0,036 | -0,014 | 0,011 | 0,078* | -0,036 | -0,074* | -0,116** | -0,144** | 0,043 | 0,058 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

#### 6.2.2.3. Mobilitatea totală

După cum era de așteptat, a fost identificată o corelație pozitivă între mobilitatea totală a spermei brute și ambele tipuri de mobilitate (totală și progresivă) a spermei conservate (tabelul 6.5.).

**Tabelul 6.5./Table 6.5.**

Corelații între mobilitatea totală a ejaculatului și parametri seminali după prelucrare și conservare

Correlations between total motility in raw semen and seminal parameters after preservation

|             | TMot    | PMot    | VAP   | VCL   | VSL   | STR   | LIN   | WOB   | ALH   | BCF   |
|-------------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Mob. totală | 0,242** | 0,238** | 0,058 | 0,026 | 0,052 | 0,013 | 0,035 | 0,051 | 0,015 | 0,013 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Surprinzător însă, aceste corelații sunt doar moderate ( $r = 0.242$  și  $0.238$ ), ceea ce indică faptul că un ejaculat cu o mobilitate totală ridicată poate deseori rezulta în doze de înșămânțare cu mobilitate moderată sau scăzută și invers.

Cu excepția celor enumerate mai sus, nu au mai fost identificate alte corelații între mobilitatea spermei brute și parametri spermei conservate.

#### 6.2.2.4. Numărul total de spermatozoizi mobili/ml

Acest parametru reprezintă o combinație între mobilitatea totală și concentrația materialului seminal. Corelațiile sale cu parametri spermei conservate sunt oarecum similare cu cei ai concentrației, mai exact una slab negativă cu STR, LIN și WOB precum și una slab pozitivă cu VCL (tabelul 6.6.).

Pe de altă parte, nu a fost detectată nicio corelație cu TMot sau PMot, așa cum a prezentat mobilitatea totală a spermei brute, ceea ce ar putea sugera că numărul total de spermatozoizi mobili/ml este modulată mai degrabă de către concentrația materialului seminal decât de către procentul mobilității.

**Tabelul 6.6./Table 6.6.**

Corelații între numărul de spermatozoizi mobili/ml în sperma brută și parametrii seminali după prelucrare și conservare  
Correlations between the number of motile sperm/ml in raw semen and seminal parameters after preservation

|         | TMot  | PMot  | VAP   | VCL     | VSL    | STR     | LIN      | WOB      | ALH   | BCF    |
|---------|-------|-------|-------|---------|--------|---------|----------|----------|-------|--------|
| TMS /ml | 0,022 | 0,042 | 0,027 | 0,083** | -0,019 | -0,068* | -0,103** | -0,126** | 0,045 | 0,068* |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

În plus, se pare că există o corelație pozitivă (deși slabă) cu BCF. Toate acestea sugerează că un număr mai mare de spermatozoizi mobili/ml în sperma brută va tinde să influențeze comportamentul lor după conservare, făcându-i să se deplaseze mai repede dar mai puțin liniar.

#### 6.2.2.5. Procentajul spermatozoidilor cu morfologie normală

Procentul spermatozoidilor normali din punct de vedere morfologic într-un ejaculat este unul dintre cei mai importanți parametri din punct de vedere calitativ. Un mic procent (între 5% și 10%) de spermatozoizi cu anomalii morfologice este normal în ejaculatul unui vier (Drugociu, 2009), însă dacă această proporție depășește 25% atunci întreg ejaculatul trebuie eliminat (Gadea, 2002). Motivul pentru această recomandare este că doar spermatozoidii morfologic normali sunt capabili să supraviețuiască după conservare și să fertilizeze ovocitul (Runceanu și col., 2007). Astfel, o proporție mare de anomalii va afecta procesul fecundării.

În studiul de față, unele corelații moderate au fost depistate între acest parametru și mobilitatea totală și progresivă după conservare (tabelul 6.7.).

De asemenea, corelații slab pozitive au fost semnalate cu VAP și VSL. Astfel, se pare că un procent mai mare de spermatozoizi normali în ejaculat va duce la obținerea unui procent mai mare de spermatozoizi mobili și mai rapizi după conservare.

**Tabelul 6.7./Table 6.7.**

Corelații între proporția spermatozoizilor morfologic normali din ejaculat și parametri seminali după prelucrare și conservare  
Correlations between the percentage of morphologically normal spermatozoa in raw semen and seminal parameters after preservation

|        | TMot    | PMot    | VAP    | VCL   | VSL    | STR   | LIN   | WOB    | ALH   | BCF   |
|--------|---------|---------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| %Morph | 0,268** | 0,268** | 0,070* | 0,024 | 0,071* | 0,023 | 0,055 | 0,077* | 0,001 | 0,042 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

#### 6.2.2.6. Numărul total de spermatozoizi în întregul ejaculat

Acest parametru este probabil cel mai important din punct de vedere cantitativ, modulând numărul de doze de înșămânțare produse și oferind informații prețioase referitoare la intensitatea spermatogenezei. Deși o spermatogeneză mai intensă, cu producerea unui număr mai mare de spermatozoizi și implicit de doze de înșămânțare într-un anumit interval de timp este unul dintre dezideratele centrelor de producție de material seminal, o activitate accelerată a tubilor seminiferi ar putea duce la un număr mai mare de spermatozoizi anormali din cauza activității accelerate, reflectând astfel un proces de formare a spermatozoizilor mai puțin eficient.

În studiul nostru, doar corelații slabe au fost semnalate între numărul total de spermatozoizi și parametri după prelucrare și conservare (tabelul 6.8.), mai exact corelații pozitive cu VCL și ALH și negative cu TMot, PMot, LIN și WOB.

**Tabelul 6.8./Table 6.8.**

Corelații între numărul total de spermatozoizi din întregul ejaculat și parametri seminali după prelucrare și conservare  
Correlations between the total number of spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

|           | TMot    | PMot    | VAP   | VCL    | VSL   | STR    | LIN     | WOB      | ALH     | BCF    |
|-----------|---------|---------|-------|--------|-------|--------|---------|----------|---------|--------|
| TS/<br>Ej | -0,077* | -0,071* | 0,017 | 0,063* | 0,000 | -0,030 | -0,076* | -0,110** | 0,081** | -0,042 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Coeficientul wobble este definit de raportul dintre viteza medie și viteza curbilinie. Astfel, dacă valoarea sa este mai mare, traiectoria spermatozoizilor este mai eficientă. Deoarece numărul total de spermatozoizi pare să fie corelat

negativ cu acest coeficient dar în același timp și cu liniaritatea și procentul mobilității, am putea concluziona că, la o rată mai intensă a spermatogenezei, calitatea materialului seminal ar putea fi afectată, prezentând un potențial mai redus de conservare.

#### 6.2.2.7. Numărul total de spermatozoizi mobili din întregul ejaculat

Acest parametru reprezintă o combinație între procentul mobilității totale și numărul total de spermatozoizi din întreg ejaculatul. Asemănător TS/Ej., acesta a prezentat corelații slab pozitive cu VCL și ALH precum și corelații slab negative cu LIN și WOB (tabelul 6.9.). Totuși, nu a fost depistată nicio corelație cu TMot sau PMot.

**Tabelul 6.9./Table 6.9.**

Corelații între numărul total de spermatozoizi mobili din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare  
Correlations between the total number of motile spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

|        | TMot   | PMot   | VAP   | VCL    | VSL   | STR    | LIN     | WOB      | ALH     | BCF    |
|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|---------|----------|---------|--------|
| TMS/Ej | -0,019 | -0,014 | 0,031 | 0,068* | 0,014 | -0,026 | -0,066* | -0,096** | 0,084** | -0,036 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Din nou, am putea concluziona că o valoare mai mare a acestui indicator va tinde să determine spermatozoizii să se deplaseze mai repede dar mai puțin liniar după prelucrare și conservare.

#### 6.2.2.8. Numărul total de spermatozoizi morfologic normali din întregul ejaculat

Doar corelații slabe au fost identificate, și anume una slab pozitivă cu VCL și una negativă cu WOB și ALH (tabelul 6.10.).

**Tabelul 6.10./Table 6.10**

Corelații între numărul total de spermatozoizi morfologic normali din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare  
Correlations between the total number of morphologically normal spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

|             | TMot  | PMot  | VAP   | VCL    | VSL   | STR    | LIN    | WOB      | ALH     | BCF    |
|-------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|----------|---------|--------|
| TMorphN /Ej | 0,005 | 0,010 | 0,039 | 0,070* | 0,023 | -0,022 | -0,059 | -0,086** | 0,082** | -0,027 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Rezultatele ar putea sugera aceleași aspecte ca în cazul numărului total de spermatozoizi și al numărului total de spermatozoizi mobili din ejaculat.

#### 6.2.2.9. Numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali din ejaculat

Acest parametru se referă la probabil cei mai importanți spermatozoizi din ejaculat, și anume cei care posedă abilitatea de a se deplasa către situsul fertilizării, însă prezintă și o morfologie normală, ținând cont că integritatea morfologică a unui spermatozoid este o condiție esențială pentru implicarea sa în procesul fecundației (Runceanu și col, 2007). Un ejaculat cu o valoare mai ridicată a acestui parametru va asigura producerea unui număr mai mare de doze de însămânțare, cu o calitate mai bună. Totuși, doar corelații slabe au fost depistate între acest indicator și parametrii cinetici ai spermei conservate (tabelul 6.11.).

**Tabelul 6.11./Table 6.12**

Corelații între numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare  
Correlations between the total number of motile and morphologically normal spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

|              | TMot  | PMot  | VAP   | VCL    | VSL   | STR    | LIN    | WOB     | ALH     | BCF    |
|--------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|---------|---------|--------|
| TMMorphN /Ej | 0,056 | 0,059 | 0,047 | 0,069* | 0,033 | -0,017 | -0,047 | -0,069* | 0,080** | -0,022 |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Corelațiile sunt aproape identice cu cele prezentate de TMorphN/Ej: slab pozitive cu VCL și ALH și slab negativă cu WOB.

#### 6.2.3 Concluzii parțiale

1. Deși au fost detectate unele corelații, din păcate parametrii determinați în cadrul examenului general al spermei brute prezintă o valoare de predicție redusă asupra parametrilor spermei prelucrate și conservate timp de trei zile la 17°C.

2. Doar corelații slabe sau moderate au fost identificate, care au însă o valoare prea mică pentru a sta la baza unei concluzii certe.

3. Cele mai multe dintre corelațiile observate ar putea sugera că o densitate mai mare a materialului seminal brut și o rată mai intensă a producției de spermatozoizi vor determina spermatozoizii să se deplaseze mai repede dar și

mai neregulat după conservare. Totuși, deoarece valorile corelațiilor au fost mici, se pare că parametrii seminali tind să se comporte diferit de la un ejaculat la altul.

### **6.3. STUDIU COMPARATIV PRIVIND EFICIENȚA RECIPIENTELOR FOLOSITE LA CONSERVAREA MATERIALULUI SEMINAL DE VIER ÎN STARE LICHIDĂ**

#### **6.3.1. Material și metodă**

Cinci ejaculate provenite de la cinci vieri clinic sănătoși și apți din punct de vedere sexual au fost recoltate prin metoda manuală (Bogdan, 1999; Ciornei, 2012) în cadrul unei unități comerciale specializate în producția de doze de însămânțare artificială pentru suine. Ejaculatele au fost supuse examenului general și diluate cu un diluant pe termen scurt - BTS® (Minitube, Tiefenbach, Germania), după care au fost împărțite în două alicote și ambalate folosind două tipuri diferite de recipiente utilizate în mod uzual pentru conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă, respectiv flacon de 100 de ml cu închidere manuală (figura 6.16.-A) (Minitube, Tiefenbach, Germania) și tub de 100 ml cu închidere automată (figura 6.16.-B) (Minitube, Tiefenbach, Germania). Pentru a evita expunerea spermatozoizilor la condiții chimice diferite cauzate de folosirea unor recipiente fabricate din materiale diferite, au fost utilizate recipiente fabricate din același material (material plastic) și de aceeași companie (Minitube, Germania).

Sperma diluată și ambalată astfel a fost examinată în ziua diluției (Ziua 0) precum și după una (Ziua 1), două (Ziua 2), trei (Ziua 3), patru (Ziua 4) și cinci (Ziua 5) zile de conservare în stare lichidă, la 17°C. Examinarea a fost efectuată cu ajutorul sistemului CASA, programul SpermVision versiunea 3.7 (Minitube of America - MOFA®, Verona, WI, USA) conectat la un microscop optic Zeiss Axio Scope.A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania) prevăzut cu placă încălzită la 38°C. Următorii parametri au fost determinați: mobilitate totală (TMot), mobilitate progresivă (PMot), viteză în linie dreaptă (VSL), viteza medie (VAP), viteza curbilinie (VCL), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de rectilinitate (STR), coeficientul de oscilație a traiectoriei (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH), frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF). Setările sistemului au fost ajustate după cum urmează: pentru parametrul "mobilitate totală" au fost luați în calcul spermatozoizii ce au prezentat orice tip de mișcări, în timp ce pentru "mobilitate progresivă" au fost luați în considerare doar spermatozoizii prezentând o viteză medie de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilinitate de cel puțin 0,3.



**Figura 6.16.** Recipientele utilizate pentru conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă: flacon (A) și tub (B)

**Figure 6.16.** The types of containers used for preservation of liquid state boar sperm: bottle (A) and tube (B)

Datele înregistrate în calculator au fost procesate folosind programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii și deviația standard (SD). Diferențele între valorile obținute în cazul celor două tipuri de recipiente de conservare au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic atunci când  $p < 0,05$ . Pentru a identifica diferențele semnificative, s-a folosit analiza "Independent t-test", luând în calcul prezumția de variații egale.

### 6.3.2. Rezultate și discuții

După cele cinci zile de conservare la 17°C, materialul seminal a prezentat valori acceptabile în ceea ce privește parametrii cinetici (tabelul 6.12.), indiferent de tipul de recipient utilizat. Mobilitatea progresivă s-a menținut peste 60%, valoare ce reprezintă pragul de acceptare înainte de înșămânțarea artificială recomandat de unii autori (Flowers, 1997; Johnson și col., 2000).

**Tabelul 6.12./Table 6.12**

Valorile parametrilor seminali în funcție de recipientul folosit, după cinci zile de conservare

The values of seminal parameters after five days of preservation, according to the type of container that was used

| Tipul recipientului |       | TMot               | PMot               | VAP                | VCL                | VSL                | STR               | LIN               | WOB               | ALH               | BCF                |
|---------------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Flacon              | Medie | 68,60 <sup>a</sup> | 64,49 <sup>a</sup> | 69,27 <sup>a</sup> | 103,0 <sup>a</sup> | 62,19 <sup>a</sup> | 0,89 <sup>a</sup> | 0,60 <sup>a</sup> | 0,67 <sup>a</sup> | 2,42 <sup>a</sup> | 34,43 <sup>a</sup> |
|                     | SD    | 11,93              | 12,78              | 11,50              | 16,25              | 10,51              | 0,02              | 0,05              | 0,06              | 0,35              | 3,21               |
| Tub                 | Medie | 74,43 <sup>b</sup> | 70,38 <sup>b</sup> | 73,73 <sup>b</sup> | 118,1 <sup>b</sup> | 65,51 <sup>b</sup> | 0,88 <sup>b</sup> | 0,56 <sup>b</sup> | 0,63 <sup>b</sup> | 2,63 <sup>b</sup> | 37,69 <sup>b</sup> |
|                     | SD    | 10,54              | 11,54              | 8,61               | 19,12              | 7,60               | 0,02              | 0,06              | 0,06              | 0,37              | 2,06               |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică diferențe semnificative între recipiente ( $p < 0.05$ )

De remarcat este însă că toți parametrii luați în calcul au prezentat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) după cele cinci zile de conservare, în funcție de recipientul folosit (tabelul 6.13).

**Tabelul 6.13./Table 6.13**

Analiza Independent t-test a rezultatelor oferite de cele două tipuri de recipiente, după cinci zile de conservare (prezumția de variații egale)

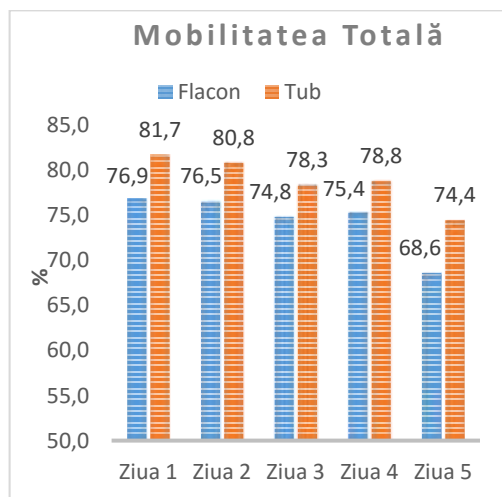
The output of Independent t-test analyzing the values offered by the two types of containers, after five days of storage (equal variances assumed)

| Parametru | Testul Levene pentru egalitatea variațiilor |                   | Testul t pentru egalitatea valorilor medii |                   |                                             |
|-----------|---------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|
|           | F                                           | Sig. (valoarea p) | Grade de libertate                         | Sig. (valoarea p) | Diferența între valorile medii (flacon-tub) |
| TMot      | 2,33                                        | 0,13              | 138                                        | <b>,003</b>       | -5,83                                       |
| PMot      | 1,67                                        | 0,20              | 138                                        | <b>,005</b>       | -5,89                                       |
| VAP       | 5,51                                        | 0,02              | 138                                        | <b>,010</b>       | -4,46                                       |
| VCL       | 4,77                                        | 0,03              | 138                                        | <b>,000</b>       | -15,08                                      |
| VSL       | 8,14                                        | 0,01              | 138                                        | <b>,034</b>       | -3,32                                       |
| STR       | 0,91                                        | 0,34              | 138                                        | <b>,026</b>       | 0,01                                        |
| LIN       | 0,00                                        | 0,96              | 138                                        | <b>,000</b>       | 0,04                                        |
| WOB       | 0,40                                        | 0,53              | 138                                        | <b>,000</b>       | 0,04                                        |
| ALH       | 0,37                                        | 0,55              | 138                                        | <b>,001</b>       | -0,21                                       |
| BCF       | 9,73                                        | 0,00              | 138                                        | <b>,000</b>       | -3,26                                       |

Astfel, parametrii TMot, PMot, VAP, VCL, VSL, ALH și BCF au prezentat valori mai mari în cazul folosirii recipientelor de tip tub umplut automat, în timp ce parametrii STR, LIN și WOB au prezentat valori superioare în cazul utilizării flacoanelor umplute manual (tabelul 6.12 și tabelul 6.13), ceea ce poate conduce la concluzia că în cazul tuburilor umplute și închise automat, spermatozoizii se deplasează într-o proporție mai mare și cu o viteză superioară, însă deplasarea este mai neregulată.

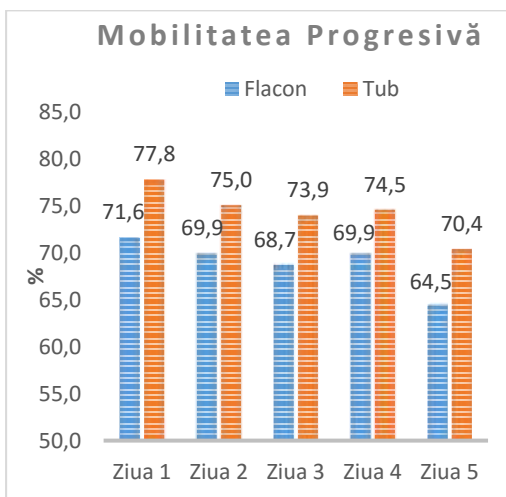
*Efectul recipientului asupra procentului de spermatozoizi mobili pe durata perioadei de conservare*

Monitorizarea procentului mobilității reprezintă un instrument utilizat frecvent pentru aprecierea eficienței condițiilor de conservare, de exemplu eficiența diluantului (Martin-Hidalgo și col., 2013) sau a recipientului (Eriksson și col., 2002). Mobilitatea spermatozoizilor este încă unul dintre cei mai evaluați indicatori ai calității materialului seminal, mai ales în centrele de însămânțare artificială (Lenz și col., 2011), fiind bine cunoscut că o valoare ridicată a acestui parametru este esențială pentru producerea fecundației (Runcanu și col., 2007).



**Figura 6.17.** Variația mobilității totale în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.17.** The variation of total sperm motility during preservation, according to the type of container



**Figura 6.18.** Variația mobilității progresive în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.18.** The variation of progressive sperm motility during preservation, according to the type of container

Pentru o mai bună observare a influenței recipientului asupra procentului mobilității, este prezentată evoluția valorilor determinate pentru acest parametru în fiecare zi de conservare, începând cu prima zi (24 ore) după așezarea dozelor de înșămânțare la 17 °C și terminând cu a cincea zi de conservare (120 ore) (figurile 6.17. și 6.18.).

În acest studiu, mobilitatea totală reprezintă procentul de spermatozoizi prezentând orice formă de deplasare, în timp ce mobilitatea progresivă se referă doar la spermatozoizii cu mișcări evidente de înaintare (viteza medie de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilitate de cel puțin 0,3).

Atât mobilitatea totală cât și cea progresivă au prezentat valori superioare în cazul folosirii recipientelor de tip tub umplut automat, în toate cele cinci zile de conservare, ceea ce sugerează că acest tip de recipient protejează mai bine valoarea biologică a spermatozoizilor. Este dificil să se precizeze cauzele acestui fenomen. Ambele tipuri de recipiente au provenit de la aceeași companie și sunt fabricate din același material, astfel încât influența factorilor chimici este exclusă. Rămân drept cauze posibile:

- forma recipientului;
- tipul de umplere. Flaconul este umplut manual, în timp ce tubul este umplut automat. În cazul umplerii manuale, procesul durează mai mult, iar spermatozoizii ar putea fi stresați suplimentar. În plus, contactul spermei cu aerul este mai îndelungat, ceea ce ar putea spori contaminarea bacteriană.
- tipul de închidere a recipientului. Flaconul este prevăzut cu un capac ce se închide manual, prin rotire în jurul filetelui, în timp ce tubul este închis automat, prin presarea la căldură a capătului deschis. Astfel, tuburile sunt închise în mod cert etanș, în timp ce în cazul flacoanelor rămâne posibilitatea pătrunderii aerului în timpul conservării, dacă închiderea nu a fost executată suficient de strâns. Pătrunderea de aer atmosferic este echivalentă practic cu prezența unui volum prea mare de aer în interiorul dozei de înșămânțare, favorizând schimbul de gaze și creșterea pH-ului materialului seminal, ceea ce duce la scăderea mobilității spermatozoizilor (Vyt și col., 2007).

Efecte ale tipului de recipient asupra mobilității progresive în timpul conservării au fost observate și de alți autori. De exemplu, pentru sperma de câine, Pinto și col (1999) raportează diferențe majore la 48 de ore de depozitare în timp ce Lopes și col. (2009) semnalează diferențe semnificative la 48 și 72 de ore de depozitare, atât pentru mobilitatea progresivă cât și pentru integritatea membranară. Pentru sperma de armăsar, unii autori (Brinsko și col. 2000; Melo și col., 2006) au observat că mobilitatea spermatozoizilor este protejată mult mai bine într-un anumit tip de recipient comercial comparativ cu alte tipuri

disponibile pe piață, în timp ce alți autori nu au observat diferențe majore după primele 8 (Maciel și col., 2012) sau 24 (Katila și col., 1997; Webb și col., 2005) ore de conservare.

*Efectul recipientului asupra vitezei de deplasare a spermatozoizilor, pe durata perioadei de conservare*

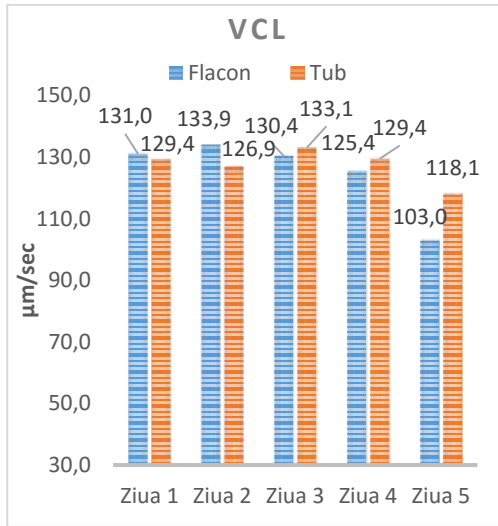
Sistemele CASA pot calcula nu doar procentul de spermatozoizi mobili dintr-o probă, dar și viteza cu care aceștia se deplasează, pe care o definesc prin trei parametri: viteza medie (VAP), viteza curbilinie (VCL) și viteza în linie dreaptă (VSL).

Influența vitezei de deplasare a spermatozoizilor asupra capacității de fecundare este încă discutabilă. Studii anterioare au raportat atât corelații negative cu rata parturii (Holt și col., 1997; Park, 2013) cât și pozitive cu fecunditatea (Budworth, 1988), prolificitatea (Broekhuijse și col., 2012) sau rata fertilizării *in-vitro* (Hirano și col., 2001), dar și lipsa corelațiilor cu indicii de fertilitate (Didion, 2008). O viteză mai mare de deplasare poate duce la parcurgerea într-un timp mai scurt a distanței până la oviducte sporind șansele fecundării, însă poate reflecta și un metabolism mai intens, care ar duce la epuizarea mai rapidă a celulei spermatice.

În studiul de față, viteza curbilinie (VCL) a prezentat valori aproximativ egale, fără diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ) între cele două tipuri de recipiente în primele patru zile de conservare și valori semnificativ mai mari ( $p < 0,05$ ) în cazul recipientelor de tip tub, după cinci zile de conservare (figura 6.19.). Independența VCL față de tipul recipientului la începutul perioadei de depozitare a fost observată și de alți autori, pentru sperma de armăsar (Kattila și col., 1997).

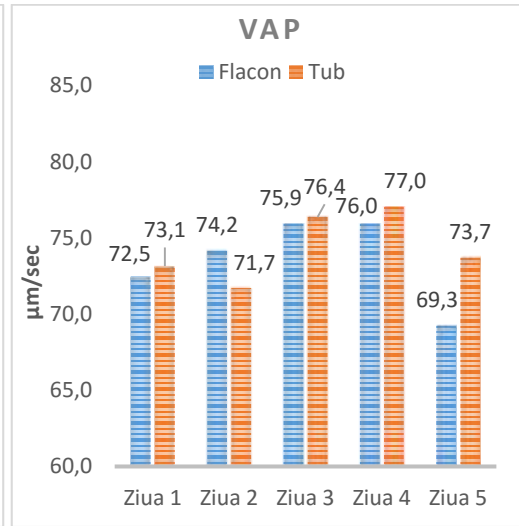
În mod asemănător, viteza medie (VAP) a fost aproximativ egală după primele patru zile pentru cele două recipiente, în schimb după cea de-a cincea zi spermatozoizii conservați în flacon s-au deplasat cu o viteză medie semnificativ mai mică comparativ cu cei păstrați în tub ( $p < 0,05$ ) (figura 6.20.).

De remarcat este creșterea graduală a vitezei medii de deplasare a spermatozoizilor de la ziua 1 până la ziua 4 (excepție făcând ziua 2, pentru recipientul de tip tub) deși viteza curbilinie s-a menținut relativ constantă.



**Figura 6.19.** Variația vitezei curbilinii în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.19.** The variation of sperm curvilinear velocity during preservation, according to the type of container

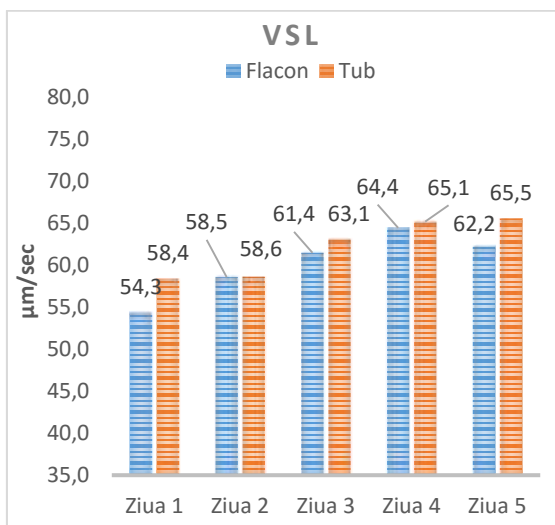


**Figura 6.20.** Variația vitezei medii în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.20.** The variation of average path velocity during preservation, according to the type of container

Viteza în linie dreaptă (VSL) a prezentat valori semnificativ mai mari la spermatozoizii din tuburi comparativ cu cei din flacoane în zilele 1 și 5 ( $p < 0,05$ ) și valori apropiate, fără diferențe semnificative în celelalte trei zile (figura 6.21.). Se remarcă aceeași creștere graduală a valorilor indiferent de recipientul folosit, ca și în cazul VAP.

Rezultatele sugerează că cele două tipuri de recipiente nu influențează în mod diferit viteza de deplasare a spermatozoizilor după primele patru zile de conservare, însă după cea de-a cincea zi apar diferențe semnificative în ceea ce privește toți cei trei indicatori ai vitezei, cu valori superioare în cazul recipientelor de tip tub. Acest aspect sugerează că tuburile umplute și închise automat protejează mai bine metabolismul spermatozoizilor în timpul conservării comparativ cu flacoanele închise și umplute manual.

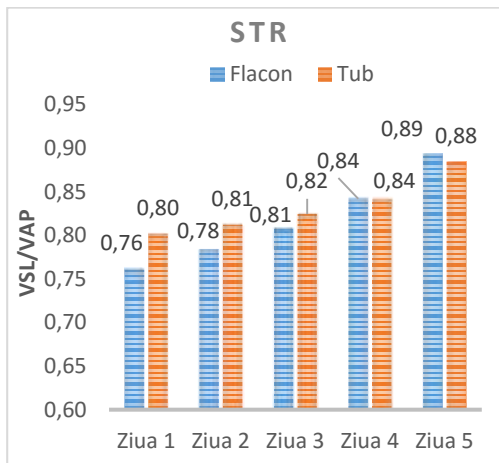


**Figura 6.21.** Variația vitezei în linie dreaptă în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.21.** The variation of straight line velocity during preservation, according to the type of container

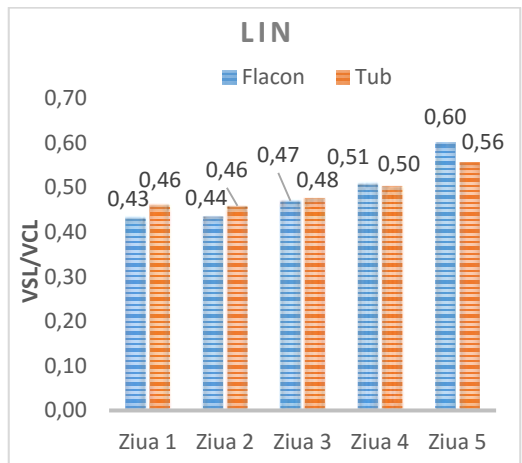
*Efectul recipientului asupra direcției de deplasare a spermatozoizilor, pe durata perioadei de conservare*

Sistemul CASA poate determina și o serie de indicatori care reflectă direcția și uniformitatea deplasării spermatozoizilor, după cum urmează: coeficientul de rectilinitate (STR), reprezentând raportul dintre VSL și VAP; coeficientul de liniaritate (LIN) reprezentând raportul dintre VSL și VCL; coeficientul de oscilație a traiectoriei (WOB) care înseamnă raportul dintre VAP și VCL; amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) care reprezintă media distanței la care capul spermatozoidului se îndepărtează de traiectoria sa medie; frecvența de bătaie a capului (BCF) care arată frecvența cu care capul spermatozoidului se intersectează cu traiectoria medie. Pe baza celor enunțate mai sus, se poate afirma că deplasarea spermatozoidului este mai rectilinie, mai uniformă atunci când STR, LIN și WOB au valori mai mari, în timp ce valori mai mari pentru ALH indică o traiectorie mai neregulată. În mod normal, cu cât ALH este mai ridicată, cu atât BCF este mai redusă și invers, deoarece o distanță mai mare la care spermatozoidul se îndepărtează de traiectoria sa medie va însemna un timp mai îndelungat necesar pentru a se întoarce la ea și așadar un număr mai mic de intersecții pe unitatea de timp. Parametrii WOB și BCF au fost corelați pozitiv cu rata parturițiilor de către unii autori (Schulze și col., 2013).



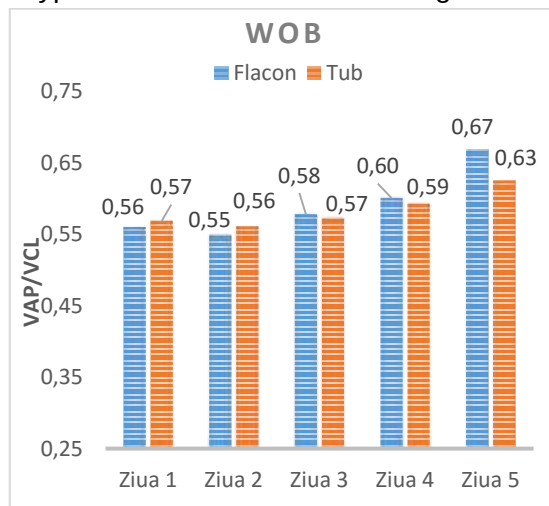
**Figura 6.22.** Variația coeficientului de rectilinitate în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.22.** The variation of straightness during preservation, according to the type of container



**Figura 6.23.** Variația coeficientului de liniaritate în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.23.** The variation of linearity during preservation, according to the type of container



**Figura 6.24.** Variația coeficientului de oscilație a traiectoriei în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

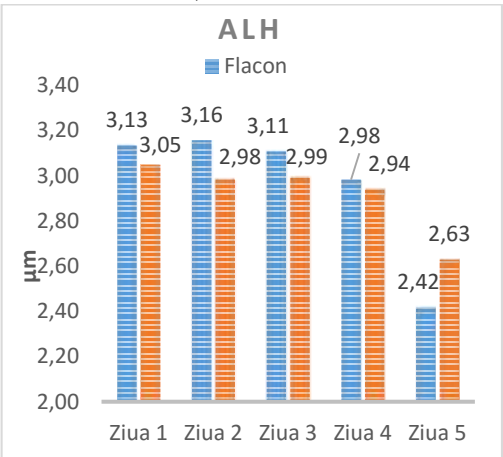
**Figure 6.24.** The variation of wobble during preservation, according to the type of container

Coeficientul de rectilitate (STR) a prezentat valori semnificativ mai mari în cazul recipientului de tip tub în zilele 1 și 2, nesemnificativ diferite în zilele 3 și 4 și semnificativ mai mari în cazul recipientului de tip flacon în ziua 5 de conservare (figura 6.22).

Coeficientul de liniaritate (LIN) a prezentat în ziua 1 valori semnificativ mai mari pentru materialul conservat în tuburi, în zilele 2, 3 și 4 diferențe nesemnificative, iar în ziua a 5 valori semnificativ mai mari pentru sperma conservată în flacoane (figura 6.23).

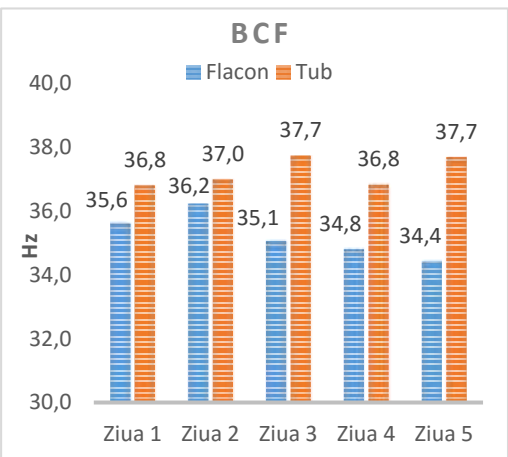
Coeficientul de oscilație a traiectoriei (WOB) nu a arătat diferențe semnificative în funcție de recipientul utilizat în timpul primelor patru zile după depunerea la 17°C. În schimb, în ziua 5 WOB a fost superior în cazul utilizării flacoanelor (figura 6.24).

Atât STR, cât și LIN și WOB au prezentat aceeași creștere graduală observată în cazul VAP și VSL (excepție făcând WOB în ziua 2). Acest aspect denotă o eficientizare a deplasării spermatozoizilor odată cu trecerea timpului. Viteza efectivă de deplasare (VCL) a rămas relativ constantă, însă traiectoria a devenit mai puțin neregulată.



**Figura 6.25.** Variația amplitudinii de deplasare a capului în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.25.** The variation of amplitude of lateral head displacement during preservation, according to the type of container



**Figura 6.26.** Variația frecvenței de intersectare cu traiectoria medie în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit

**Figure 6.26.** The variation of beat cross frequency during preservation, according to the type of container

Amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) a fost semnificativ mai mare la spermatozoizii conservați în flacoane în ziua 2 și la cei conservați în

tuburi în ziua 5. În celelalte trei zile nu au fost observate diferențe semnificative (figura 6.25).

ALH indică distanța medie pe care capul spermatozoidului o parcurge în direcție transversală de la traiectorie sa medie. Deși o valoare mai mare a acestui parametru indică o distanță mai mare parcursă de spermatozoid într-o direcție greșită, există studii care au depistat corelații pozitive între ALH și rata parturii (Vyt și col., 2008). Un nivel ridicat al ALH (peste 3,5  $\mu\text{m}$ ) este un semn al hiperactivării spermatozoidului, mai ales în asociație cu o valoare ridicată a VCL (Schmidt și Kamp, 2004). Hiperactivarea spermatozoidelor este un fenomen necesar fertilizării (Chang și Suarez, 2010), desfășurându-se în mod fiziologic în oviduct și aflându-se în strânsă legătură cu fenomenul capacitării (Armon și Eisenbach, 2011), însă dacă apare prematur poate compromite succesul fecundării prin epuizarea spermatozoidelor.

Frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie a fost, cu excepția zilei 2, semnificativ mai mare în cazul spermatozoidelor conservate în tuburi (figura 6.26). Conform unor autori (Schulze și col., 2013) BCF ar putea fi corelat pozitiv cu fecunditatea, așadar o valoare mai mare a sa ar putea fi un semn al calității superioare.

### 6.3.3. Concluzii parțiale

Prin analiza rezultatelor obținute, se pot nota următoarele concluzii:

1. Ambele tipuri de recipiente utilizate în acest studiu pentru conservarea materialului seminal de vier s-au dovedit eficiente, menținând principalii parametri cinetici între valori acceptabile;

2. S-a observat o scădere graduală a procentului mobilității în timpul conservării. Astfel, așa cum era de așteptat, cele mai mici valori pentru mobilitatea totală și progresivă au fost obținute după cinci zile de conservare, pentru ambele tipuri de recipiente. Acest aspect confirmă ipoteza că metoda de conservare prin menținere la temperatura camerei este eficientă doar pentru intervale scurte de timp (de ordinul zilelor).

3. În mod surprinzător, a fost observată o eficientizare în timp a deplasării spermatozoidelor. Astfel, viteza curbilinie a rămas relativ constantă pe perioada studiului, în timp ce viteza medie și cea în linie dreaptă au crescut, înregistrând cele mai mari valori după 5 zile de conservare. În acest mod, traiectoria urmată de spermatozoizi a devenit mai liniară odată cu trecerea timpului.

4. Comparând cele două tipuri de recipiente utilizate în acest studiu, se pare că tubul umplut și închis automat protejează mai bine mobilitatea spermatozoidelor. Pe toată durata conservării, mobilitatea totală și cea progresivă au fost mai mari pentru spermatozoidii menținuți în tuburi,

comparativ cu cei menținuți în flacoane. În condițiile în care procentul mobilității reprezintă în continuare principalul criteriu de evaluare a calității spermei înainte de însămânțare, se poate afirma că acest tip de recipient reprezintă nu doar o soluție economică, dar și o soluție pentru menținerea calității spermei pentru un timp mai îndelungat.

5. Nu trebuie omis însă faptul că după 5 zile de conservare spermatozoizii conservați în flacoane au prezentat o mișcare mai liniară decât cei conservați în tuburi, cu valori superioare ale coeficienților de liniaritate, rectilinitate și wobble.

6. Viteza de deplasare a spermatozoizilor a fost dependentă de tipul recipientului doar după cea de-a cincea zi de conservare, după primele patru zile diferențele fiind nesemnificative.

## **CAPITOLUL VII. CERCETĂRI PRIVIND INFLUENȚA SEZONULUI ASUPRA PARAMETRILOR CANTITATIVI ȘI CALITATIVI AI SPERMEI DE VIER CHAPTER VII. THE INFLUENCE OF THE SEASON ON THE MAIN SEMINAL PARAMETERS IN BOAR**

Optimizarea reproducției animale în general și a suinelor în special, implică o cunoaștere în detaliu a fenomenelor intime ce se desfășoară în cadrul acesteia.

Conform cercetărilor anterioare, spermatogeneza la vier este influențată de o serie de factori, cum ar fi rasa, vârsta, alimentația, factorii de mediu, starea de sănătate și frecvența recoltărilor, care vor determina variația parametrilor spermatici. Din momentul implementării biotehnologiilor de înșămânțare artificială la animale, a existat un interes continuu legat de aceste variații, mai ales la vierii de mare valoare genetică (Tardif și col., 1999).

De-a lungul timpului, numeroși autori au cercetat efectele sezonului asupra funcției de reproducției la suine, atât la masculi (Lawrence și col., 1970, Ciereszko A și col., 2000, Cheon și col., 2002; Syring, 2008; Yeste și col., 2010) cât și la femele (Tast și col., 2001; Peltoniemi și Kemp, 2009; Kraeling și Webel, 2015). La vierii, modificările sezoniere ale spermei par să fie influențate de fotoperioadă (Andersson H., 2000) și temperatură (Kunavongkrit A și col., 2005). Aceasta din urmă, în cazul valorilor ridicate din timpul verii, are un efect dăunător ce cauzează distrucții ale liniei germinale, rezultând într-o scădere temporară a producției de spermatozoizi și a capacității fecundante. Fenomenul a dus la apariția termenului de „infertilitate de sezon” la suine, pentru a reflecta rezultatele mai slabe obținute după înșămânțările artificiale din timpul verii.

Rezultatele studiilor pe această temă au dus la concluzia că vierii întreținuți în condiții de temperatură ridicată produc spermă de calitate inferioară, cu o concentrație scăzută și cu un nivel ridicat de spermatozoizi imaturi și anormali. Procentul mare de spermatozoizi imaturi ar putea fi cauzat de disfuncția epididimală, ca o consecință a temperaturii prea mari. Pe de altă parte, temperaturile scăzute nu afectează de obicei calitatea spermei sau fertilitatea.

Producția de spermă poate oscila cu până la 25-30% în cursul unui an, fapt ce forțează centrele de înșămânțare artificială să dețină vierii suplimentari pentru a compensa aceste fluctuații (Cheon și col., 2002). În aceste condiții, o cunoaștere mai bună a factorilor ce influențează atât cantitatea cât și calitatea spermei poate ajuta la creșterea eficienței unităților de producție a materialului seminal de vier.

Scopul acestui studiu a fost de a observa mecanismele ce reglează fertilitatea la suine prin examinarea variațiilor sezoniere a spermei în două ferme ce oferă vierilor de reproducție condiții diferite de întreținere.

## **7.1. VARIAȚIILE SEZONIERE ALE PARAMETRILOR SEMINALI LA VIERII CAZAȚI ÎN CONDIȚII OBIȘNUITE**

### **7.1.1. Variațiile parametrilor materialului seminal brut**

#### *7.1.1.1. Material și metodă*

Studiul a cuprins analiza unui număr total de 11 476 ejaculate recoltate pe parcursul a 8 sezoane, începând cu primăvara anului 2013 și sfârșind cu iarna dintre anii 2014-2015. Recoltarea și examinarea materialului seminal a fost efectuată într-o unitate din Germania, specializată în producerea de material seminal de vier și taur. Pentru recoltare s-au folosit metoda manuală cu mănușă dublă (Bogdan, 1999; Ciornei, 2012) și metoda vaginului artificial, asemănător celui descris de Barrabes Aneas și col. (2008), cu un interval de aproximativ 7 zile între două recoltări succesive de la același vier. Doar ejaculatele cu cel puțin 65% mobilitate totală au fost înregistrate și procesate, celelalte fiind eliminate.

Examinarea cantitativă și calitativă a materialului seminal a avut loc în primele 10 minute după recoltare. Au fost determinați următorii parametri: volumul ejaculatului, concentrația în spermatozoizi, mobilitatea totală, numărul total de spermatozoizi/ejaculat (TS/Ej.), numărul total de spermatozoizi mobili/ejaculat (TMS/Ej.), numărul total de spermatozoizi mobili/ml (TMS/ml), procentajul spermatozoizilor morfologic normali (%Morph), numărul total de spermatozoizi morfologic normali/ejaculat (TMorphNS/Ej.) și numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali/ejaculat (TMMorphNS/Ej.). Volumul a fost determinat prin cântărire, o metodă folosită deseori în laboratoarele de examinare (Lorton, 2014), în timp ce pentru ceilalți parametri a fost utilizat dispozitivul SQA-Vp (A-Tech, Medical Electronic Systems Ltd, Los Angeles, CA, USA).

Valorile obținute au fost incluse într-o bază comună de date și procesate cu ajutorul programului IBM SPSS® Statistics versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Astfel au putut fi calculate valoarea medie și deviația standard pentru fiecare parametru și pentru fiecare sezon în parte. Pentru a semnală diferențele semnificative între sezoane a fost aplicat testul de analiză a variațiilor, One-Way ANOVA. Pragul de semnificație statistică a fost setat la  $p < 0,05$ .

#### *7.1.1.2. Rezultate și discuții*

Pentru o mai bună înțelegere a condițiilor de studiu, mai întâi sunt prezentate valorile sezoniere înregistrate pe perioada studiului pentru principalii factori

climatici. După cum era de așteptat, temperatura a înregistrat cele mai mari valori în timpul verii, cele mai mici în timpul iernii și valori apropiate pentru primăvară și toamnă (tabelul 7.1.). De asemenea, nu sunt surprinzătoare pentru o zonă de climat temperat umiditatea relativă scăzută din timpul verii și ridicată din timpul iernii. Se remarcă însă umiditatea redusă din timpul primăverii, dublată de cantități medii de precipitații și umiditatea ridicată din timpul toamnei, dublată însă de cantități mari de precipitații.

**Tabelul 7.1./Table 7.1.**

Valorile medii sezoniere pentru principalii factori climatici înregistrați în regiunea și pe durata studiului  
Seasonal mean values for the main climate factors recorded in the region and period of study

(<http://www.daswetter.com/historische-daten>

<http://www.wetteronline.de/wetterdaten>

<http://www.wetterkontor.de/de/wetter/deutschland/monatswerte-station>

<http://umweltdaten.nuernberg.de/wetterdaten/messstation-nuernberg-flugfeld/archiv>)

|           | Temperatura medie (°C) | Umiditatea relativă medie (%) | Durata medie a zilei-lumină (ore) | Precipitații totale (l/m <sup>2</sup> ) | Ore de strălucire a soarelui (ore/zi) | Presiune atmosferică (hPa) |
|-----------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Primăvara | 9,27                   | 73,25                         | 13,68                             | 49,00                                   | 5,04                                  | 1013,70                    |
| Vara      | 18,37                  | 70,03                         | 15,38                             | 66,93                                   | 7,86                                  | 1016,02                    |
| Toamna    | 10,35                  | 87,80                         | 10,82                             | 63,70                                   | 3,30                                  | 1016,45                    |
| Iarna     | 2,60                   | 89,12                         | 9,10                              | 28,68                                   | 1,61                                  | 1017,45                    |

Durata medie a zilei-lumină a fost cea specifică latitudinii în care s-a desfășurat studiul, cu valori mai mari în timpul verii și primăverii și mai mici în timpul toamnei și iernii. Un aspect asemănător se poate observa în ceea ce privește orele efective de strălucire a soarelui (tabelul 7.1.).

Nu au fost înregistrate diferențe majore de la un sezonul la altul în cazul presiunii atmosferice.

Pentru o apreciere completă, valorile medii și deviațiile standard pentru fiecare parametru seminal analizat pe parcursul celor opt sezoane luate în calcul sunt prezentate în tabelul 7.2.

**Tabelul 7.2./Table 7.2.**

Valorile parametrilor materialului seminal brut pe parcursul celor opt sezoane luate în studiu

Mean values of raw semen parameters during the eight seasons considered for the study

| Sezon                   |       | Volum<br>(ml) | Conc.<br>( $\times 10^6$ /ml) | TMS/ml<br>( $\times 10^6$ /ml) | Mobilitate<br>totală<br>(%) | %Morph.<br>(%) | TS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | TMS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | TMorphNS<br>/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | TMMorphNS<br>/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) |
|-------------------------|-------|---------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Primăvara<br/>13</b> | Medie | 160,50        | 364,77                        | 321,19                         | 87,16                       | 85,87          | 51,48                       | 44,89                        | 44,21                                 | 38,89                                  |
|                         | SD    | 79,95         | 172,95                        | 164,12                         | 7,22                        | 9,28           | 25,08                       | 22,36                        | 22,21                                 | 20,55                                  |
| <b>Vara 13</b>          | Medie | 206,33        | 325,39                        | 276,75                         | 84,61                       | 82,12          | 59,40                       | 50,15                        | 48,57                                 | 41,55                                  |
|                         | SD    | 101,77        | 157,66                        | 143,48                         | 7,98                        | 11,44          | 32,43                       | 28,45                        | 28,38                                 | 26,15                                  |
| <b>Toamna 13</b>        | Medie | 213,62        | 323,87                        | 279,10                         | 85,67                       | 83,71          | 61,10                       | 52,27                        | 50,98                                 | 44,11                                  |
|                         | SD    | 96,88         | 155,97                        | 144,89                         | 7,77                        | 10,70          | 27,29                       | 24,17                        | 23,95                                 | 22,46                                  |
| <b>Iarna 13-14</b>      | Medie | 188,69        | 398,47                        | 349,37                         | 86,67                       | 85,10          | 67,37                       | 58,50                        | 57,50                                 | 50,30                                  |
|                         | SD    | 81,92         | 179,88                        | 171,37                         | 6,88                        | 8,59           | 29,26                       | 26,36                        | 26,47                                 | 24,65                                  |
| <b>Primăvara<br/>14</b> | Medie | 182,01        | 339,09                        | 294,74                         | 86,17                       | 84,59          | 55,88                       | 48,15                        | 47,20                                 | 41,06                                  |
|                         | SD    | 79,50         | 153,87                        | 143,90                         | 7,23                        | 9,52           | 26,17                       | 23,01                        | 22,79                                 | 21,05                                  |
| <b>Vara 14</b>          | Medie | 199,51        | 314,83                        | 268,12                         | 85,19                       | 83,10          | 56,45                       | 48,02                        | 46,72                                 | 40,22                                  |
|                         | SD    | 85,35         | 142,59                        | 124,70                         | 7,70                        | 10,76          | 26,18                       | 22,58                        | 22,30                                 | 20,53                                  |
| <b>Toamna 14</b>        | Medie | 241,97        | 318,62                        | 274,36                         | 85,53                       | 83,64          | 68,19                       | 58,11                        | 56,74                                 | 48,85                                  |
|                         | SD    | 104,74        | 150,66                        | 139,51                         | 7,66                        | 10,35          | 28,19                       | 24,20                        | 24,04                                 | 21,97                                  |
| <b>Iarna 14-15</b>      | Medie | 193,18        | 355,12                        | 308,80                         | 86,59                       | 84,59          | 61,83                       | 53,57                        | 52,28                                 | 45,71                                  |
|                         | SD    | 78,38         | 167,09                        | 154,49                         | 7,11                        | 9,67           | 28,43                       | 25,53                        | 25,30                                 | 23,58                                  |

Se observă o variație inter-sezonieră evidentă a tuturor indicatorilor spermatici. Dintre aceștia, volumul a prezentat cel mai mare interval de variație (de peste 30%), în timp ce mobilitatea spermatozoizilor pare să fi fost mult mai stabilă (tabelul 7.2). La vier, principalii factori incriminați pentru modificărilor sezoniere ale materialului seminal sunt temperatura și fotoperioada (Cheon și col., 2002).

*Efectul sezonului asupra parametrilor cantitativi*

Sezonul de recoltare a avut o influență clară asupra cantității de material seminal ejaculată.

Volumul a înregistrat valori superioare în timpul toamnei și valori inferioare în timpul primăverii cu diferențe semnificative între toate cele patru sezoane (tabelul 7.3.). Pentru sezonul de iarnă a fost obținută cea mai mică deviație standard, ceea ce reflectă un interval mai mic de variație.

**Tabelul 7.3./Table 7.3.**

Valorile medii ale parametrilor cantitativi ai materialului seminal de vier în funcție de sezonul recoltării

Mean values of quantitative seminal parameters in boar according to the season of collection

| Sezon            |       | Volumul ejaculatului (ml) | Conc. ( $\times 10^6$ /ml) | TS/Ej. ( $\times 10^9$ ) |
|------------------|-------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Primăvara</b> | Medie | 175,40 <sup>a</sup>       | 346,98 <sup>a</sup>        | 54,52 <sup>a</sup>       |
|                  | SD    | 80,24                     | 160,40                     | 25,92                    |
| <b>Vara</b>      | Medie | 201,54 <sup>b</sup>       | 317,98 <sup>bc</sup>       | 57,33 <sup>b</sup>       |
|                  | SD    | 90,58                     | 147,28                     | 28,21                    |
| <b>Toamna</b>    | Medie | 228,41 <sup>c</sup>       | 321,13 <sup>bc</sup>       | 64,80 <sup>c</sup>       |
|                  | SD    | 102,03                    | 153,22                     | 27,98                    |
| <b>Iarna</b>     | Medie | 192,76 <sup>d</sup>       | 359,23 <sup>d</sup>        | 62,35 <sup>d</sup>       |
|                  | SD    | 78,72                     | 168,79                     | 28,55                    |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Rezultatele în ceea ce privește volumul ejaculatului sunt în concordanță cu cele ale altor studii. De exemplu, Wolf și Smital (2009) au observat prin analiza ejaculatelor recoltate pe o perioadă de 7 ani că cel mai mare volum a fost obținut în lunile de toamnă târzie iar cel mai mic în primăvara timpurie. De asemenea, Janett și col., (2005) precum și Murase și col., (2007) au observat valori

semnificativ mai mari în timpul toamnei. Volumul ejaculatului pare să fie influențat într-o măsură apreciabilă de temperatura ambientală și de regimul de lumină (Yeste și col., 2010), ceea ce conduce spre concluzia că temperaturile mai scăzute în combinație cu fotoperioada descrescătoare stimulează glandele sexuale anexe rezultând o cantitate mai mare de plasmă seminală și implicit un volum mai mare al ejaculatului. În același context, prezența temperaturilor mai scăzute însă cu o fotoperioadă crescătoare nu a fost asociată în cadrul acestui studiu cu valori mari ale volumului (tabelul 7.3.), întărind ipoteza unei acțiuni comune temperatură-fotoperioadă, deși există autori care susțin că regimul de lumină nu afectează cantitatea ejaculatului, mai importante fiind rolurile temperaturii și umidității (Knecht și col., 2014).

Pe de altă parte, concentrația în spermatozoizi a fost superioară în timpul iernii ( $p < 0,05$ ). Acest aspect ar putea sugera că spermatogeneza este mai intensă în timpul iernii, însă nu trebuie neglijată valorile relativ scăzute obținute pentru volumul ejaculatului, în aceeași perioadă a anului. Concentrația mai ridicată din timpul iernii ar putea fi pusă mai degrabă pe seama volumului scăzut și nu a unei spermatogeneze mai intense. Cel mai bun indicator al ratei spermatogenezei este numărul total de spermatozoizi/ejaculat, iar acesta a prezentat valori superioare în timpul toamnei, nu iernii. De remarcat că numărul total de spermatozoizi/ejaculat a fost semnificativ mai mic pe perioada primăverii și verii comparativ cu sezoanele de toamnă și iarnă. Sezoanele de primăvară și vară se caracterizează printr-un regim de lumină în cea mai mare parte cu un caracter crescător și prelungit, în timp ce sezoanele de toamnă și iarnă se caracterizează printr-un regim de lumină în general redus și cu un caracter descrescător. Conform unor autori spermatogeneza redusă din timpul verii poate fi pusă pe seama temperaturilor ridicate, care au un efect dăunător, provocând destrucții ale liniei germinale (Cheon și col., 2002). Din rezultatele acestui studiu reiese însă că rata spermatogenezei este mai degrabă reglată de fotoperioadă decât de temperatură. Efectul mai mic al temperaturilor asupra ratei spermatogenezei comparativ cu cel al fotoperioadei este relevat de analiza concomitentă a celor două anotimpuri cu temperaturi apropiate (primăvara și toamna) însă care au înregistrat valori semnificative pentru numărul total de spermatozoizi ( $p < 0,05$ ), respectiv cele mai mari toamna și cele mai mici primăvara. Efectul pozitiv al caracterului descrescător al fotoperioadei asupra producției de material seminal la vieri a fost observat și de alți autori. De exemplu, Knecht și col. (2013) a observat valori mai mari atât pentru volumul ejaculatului și numărul total de spermatozoizi cât și pentru numărul de doze de înșămânțare obținute, în jumătatea anului în care fotoperioada are un caracter descrescător.

*Efectul sezonului asupra parametrilor calitativi*

Mobilitatea totală a spermatozoizilor a prezentat valori semnificativ mai mari în timpul iernii și primăverii comparativ cu valorile din timpul verii și toamnei (tabelul 7.4.). Cea mai mare medie a acestui parametru a fost înregistrată în sezonul rece (86,59%), însă fără diferențe semnificative față de sezonul de primăvară (86,48%). De asemenea, media cea mai mică a fost înregistrată în timpul sezonului estival (85,02%), însă fără o diferență semnificativă față de media din timpul toamnei (85,60%). Un aspect asemănător a fost semnalat și într-un studiu anterior (Barranco și col., 2013).

**Tabelul 7.4./Table 7.4.**

Valorile medii ale parametrilor calitativi ai materialului seminal de vier în funcție de sezonul recoltării

Mean values of qualitative seminal parameters in boar according to the season of collection

| Tip Anotimp |       | Mobilitate totală (%) | Spermatozoizi morfologic normali (%) |
|-------------|-------|-----------------------|--------------------------------------|
| Primăvara   | Medie | 86,48 <sup>ad</sup>   | 84,98 <sup>ad</sup>                  |
|             | SD    | 7,24                  | 9,46                                 |
| Vara        | Medie | 85,02 <sup>bc</sup>   | 82,81 <sup>b</sup>                   |
|             | SD    | 7,79                  | 10,98                                |
| Toamna      | Medie | 85,60 <sup>bc</sup>   | 83,67 <sup>c</sup>                   |
|             | SD    | 7,71                  | 10,51                                |
| Iarna       | Medie | 86,59 <sup>ad</sup>   | 84,64 <sup>ad</sup>                  |
|             | SD    | 7,09                  | 9,57                                 |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Deși utilitatea sa în aprecierea capacității fecundante a unui ejaculat este controversată după ce mai multe studii au indicat lipsa corelațiilor cu indicatorii de fertilitate la scroafe (Quintero-Moreno și col., 2004; Sancho și col., 2006), totuși mobilitatea totală reprezintă în continuare principalul parametru calitativ evaluat în centrele de recoltare și procesare a spermei (Lenz și col, 2011). Bazat pe acest aspect, cea mai bună calitate a materialului seminal a fost obținută în timpul iernii, în timp ce calitatea cea mai slabă a fost înregistrată în timpul verii. Rezultatele sunt în concordanță cu cele raportate de numeroși alți autori, care au observat o scădere a calității spermatice în timpul sezonului estival. Drept cauză principală a acestui fenomen este indicată adesea temperatura prea

mare, iar măsura în care se petrece este dependentă de anumiți factori, printre care rasa vierilor (Park și Yi, 2002; Sonderman și Luebbe, 2008; Yeste și col., 2010), linia genetică (Flowers, 2008) sau vârsta (Huang și col., 2010). Conform unor autori (Huang și col., 2010), performanțele sexuale sunt superioare dacă vierii sunt menținuți la temperaturi sub 22°C, iar alți autori recomandă menținerea vierilor în condiții de microclimat controlat, care să păstreze temperatura între limite confortabile (Suriyasomboon și col., 2004).

Procentul spermatozoizilor morfologic normali a fost de asemenea superior în perioada iarnă-primăvară, cu diferențe semnificative față de perioada vară-toamnă (tabelul 7.4). Procentul cel mai mare s-a înregistrat primăvara (84,98%), dar fără diferențe semnificative față de sezonul de iarnă (84,64%) ( $p > 0,05$ ). La polul opus s-a situat sezonul de vară (82,81%), cu diferențe semnificative față de toate celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ).

Integritatea morfologică a spermatozoizilor este o condiție esențială fertilizării (Runcanu și col., 2007) la fel ca și mobilitatea. Însumarea datelor conduce către concluzia că sezonul rece oferă ejaculate superioare din punct de vedere calitativ comparativ cu sezonul cald, ceea ce se află în concordanță cu rezultatele altor studii (Murase și col., 2007; Barranco și col., 2013).

Se pare că integritatea morfologică a spermatozoizilor ejaculați este afectată de valori ridicate ale temperaturii ambientale și umidității relative. Într-un studiu anterior, Suriyasomboon și col. (2005) au testat eficacitatea unui sistem de cazare a vierilor cu reglarea temperaturii. Sistemul nu s-a dovedit eficient pentru reducerea anomaliilor morfologice, însă studiul a demonstrat încă o dată că variațiile sezoniere ale procentului de spermatozoizi morfologic normali sunt dependente de variațiile temperaturii ambientale și umidității relative. Deoarece studiul a fost realizat într-o zonă apropiată de ecuator, în care ziua este aproximativ egală cu noaptea pe întreaga durată a anului, factorul fotoperioadă a putut fi eliminat, rămânând în discuție doar influența celor doi factori amintiți mai sus. De altfel, absența influenței fotoperioadei asupra anomaliilor morfologice a fost raportată și în alt studiu (Rivera și col., 2005). Regiunea în care s-a realizat studiul lui Suriyasomboon și col. este caracterizată de succesiunea a trei sezoane: sezonul cald, cu temperaturi ridicate, sezonul ploios, cu umiditatea ridicată și sezonul rece, în care nici temperatura nici umiditatea nu ating temperaturi extreme. Procentul de spermatozoizi morfologic normali a fost mai mic în sezonul cald și în sezonul ploios comparativ cu sezonul rece, conducând astfel către concluzia că atât temperatura ambientală cât și umiditatea relativă ridicată au efect dăunător asupra integrității morfologice a spermatozoizilor. Este dificil de precizat care dintre cei doi factori prezintă o influență mai puternică, deoarece procentul anomaliilor morfologice

a fost aproximativ egal pentru condiții de temperatură ridicată și umiditate redusă și respectiv condiții de temperatură redusă și umiditate ridicată (Suryiasoonboon și col., 2005).

Mobilitatea redusă în combinație cu procentul mai mare de anomalii morfologice ar putea fi una dintre cauzele așa-numitei „infertilități de sezon” descrise la suine. Pe lângă acțiunea negativă a temperaturii și umidității ridicate, unii autori acuză și deficiențele de testosteron induse de variațiile regimului de lumină (Murase și col., 2007).

*Efectul sezonului asupra parametrilor micști, cantitativi și calitativi*

Prin parametri micști sunt desemnați acei parametri seminali care oferă atât informații cantitative cât și calitative asupra unui ejaculat.

Numărul de spermatozoizi mobili/ml (TMS/ml) a prezentat cele mai mari valori în timp iernii, iar cele mai mici în timpul verii și toamnei (tabelul 7.5). Acest aspect sugerează dependența TMS/ml de parametrul concentrație.

**Tabelul 7.5./Table 7.5.**

Valorile medii ale parametrilor micști, cantitativi și calitativi, în funcție de sezonul recoltării

Mean values of mixed, quantitative and qualitative seminal parameters in boar according to the season of collection

| Tip Anotimp      |       | TMS/ml<br>( $\times 10^6$ ) | TMS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | TMorphNS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | TMMorphNS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) |
|------------------|-------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>Primăvara</b> | Medie | 302,87 <sup>a</sup>         | 47,15 <sup>ab</sup>          | 46,28 <sup>ab</sup>               | 40,39 <sup>ab</sup>                |
|                  | SD    | 150,87                      | 22,86                        | 22,65                             | 20,92                              |
| <b>Vara</b>      | Medie | 270,69 <sup>bc</sup>        | 48,65 <sup>ab</sup>          | 47,27 <sup>ab</sup>               | 40,62 <sup>ab</sup>                |
|                  | SD    | 130,60                      | 24,49                        | 24,28                             | 22,35                              |
| <b>Toamna</b>    | Medie | 276,63 <sup>bc</sup>        | 55,32 <sup>cd</sup>          | 53,98 <sup>cd</sup>               | 46,59 <sup>cd</sup>                |
|                  | SD    | 142,10                      | 24,36                        | 24,16                             | 22,33                              |
| <b>Iarna</b>     | Medie | 312,65 <sup>d</sup>         | 54,04 <sup>cd</sup>          | 52,78 <sup>cd</sup>               | 46,14 <sup>cd</sup>                |
|                  | SD    | 156,59                      | 25,64                        | 25,45                             | 23,72                              |

În cadrul aceleiași coloane, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Pe de altă parte, numărul total de spermatozoizi mobili din ejaculat a oferit valori superioare în timpul toamnei (fără diferențe semnificative față de iarnă) și valori inferioare în timpul primăverii (fără diferențe semnificative față de vară) (tabelul 7.4). Variația a fost asemănătoare cu cea observată în cazul celorlalți doi parametri micști, respectiv numărul total de spermatozoizi morfologic

normali/ejaculat și numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali din ejaculat.

TMS/Ej. are o importanță practică deosebită, fiind parametrul pe baza căruia se calculează de obicei în centrele de producție numărul de doze de înșămânțare produse. Bazat pe acest aspect, sezoanele cu cea mai bună activitate sexuală a vierilor, prin prisma celor mai multe doze de înșămânțare/ejaculat produse au fost toamna și iarna, fără diferențe semnificative între ele. La polul opus s-au situat sezoanele de primăvară și vară, de asemenea fără diferențe semnificative între ele.

Deși nu sunt cunoscute încă pe deplin mecanismele genetice ale variațiilor sezoniere în performanțele sexuale la suine, unii autori indică și prezența unui sistem ancestral, moștenit de la mistreț (Ciereszko și col, 2000). Porcul mistreț prezintă activitate sexuală sezonieră, cu împerecheri preponderent toamnă-târziu și iarna, astfel încât parturițiile să aibă loc primăvara. Astfel, nu este exclus ca valorile mai mari înregistrate în timpul toamnei și iernii pentru parametrii seminali micști, cantitativi și calitativi, să fie datorate mecanismului amintit mai sus.

#### *7.1.1.3. Concluzii parțiale*

1. În cazul cazării în condiții uzuale de microclimat, s-a observat o variație sezonieră clară, pentru toți parametrii evaluați.

2. Volumul ejaculatului a fost superior în timpul toamnei, sugerând că temperaturile mai scăzute în combinație cu fotoperioda descrescătoare stimulează glandele sexuale anexe rezultând într-o cantitate mai mare de plasmă seminală și implicit un volum mai mare al ejaculatului.

3. Concentrația în spermatozoizi a ejaculatului a fost superioară în timpul iernii, însă acest aspect a fost datorat în primul rând volumului relativ redus înregistrat în acest sezon și nu unei spermatogeneze mai intense.

4. Numărul total de spermatozoizi/ejaculat a prezentat valori mai mari în timpul toamnei, asemănător volumului și valori mai mici în timpul primăverii. Prin analiza concomitentă a acestor două sezoane cu temperaturi apropiate dar care prezintă caractere diferite ale fotoperioadei (descrescător în timpul toamnei, respectiv crescător în timpul primăverii), se poate concluziona că fotoperioda prezintă o influență asupra spermatogenezei.

5. Mobilitatea spermatozoidelor și procentul de spermatozoizi morfologic normali au fost superioare în timpul iernii și primăverii și inferioare în timpul verii, confirmând rezultatele majorității studiilor precedente pe acest subiect.

## **7.1.2. Variațiile parametrilor materialului seminal diluat și conservat**

### **7.1.2.1. Material și metodă**

Studiul a fost efectuat pe o perioadă de 24 de luni, între Martie 2013 și Februarie 2015. Un număr total de 4814 ejaculate au fost obținute de la 700 de vieri maturi din punct de vedere sexual și clinic sănătoși, cazați în condiții normale într-o unitate specializată în producerea dozelor de înșămânțare artificială din Germania. Recoltarea materialului seminal a fost efectuată prin metoda manuală, cu mână dublă (Bogdan, 1999; Ciornei, 2012) și cu ajutorul vaginului artificial, asemănător celui descris de Barrabes Aneas și col. (2008), cu un interval de aproximativ 7 zile între două recoltări succesive de la același vier. După examenul general, sperma a fost diluată cu BTS® (Minitube, Tiefenbach, Germania) și supusă conservării la 17°C, în doze de 100 ml (90 ml spermă diluată + 10 ml aer).

Examinarea materialului seminal s-a realizat după trei zile de conservare, utilizând sistemul CASA, programul SpermVision (Minitube of America - MOFA®, Verona, WI, USA) versiunea 3.7, conectat la un microscop Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania) prevăzut cu plăcuță încălzită la 38°C. Setările au fost ajustate după cum urmează: pentru parametrul mobilitate totală au fost luați în considerare toți spermatozoizii prezentând orice tip de mișcare, în timp ce pentru parametrul mobilitate progresivă au fost luați în considerare doar spermatozoizii cu o viteză medie (VAP) de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilitate (STR) de cel puțin 0,3.

Următorii parametri seminali au fost determinați: mobilitatea totală (TMot), mobilitatea progresivă (PMot), viteza medie a spermatozoizilor (VAP), viteza curbilinie (VCL), viteza în linie dreaptă (VSL), coeficientul de rectilitate (STR), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de oscilație (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF).

Datele obținute au fost procesate statistic cu ajutorul programului IBM SPSS® Statistics versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii și deviația standard, iar pragul de semnificație statistică a fost setat la  $p < 0,01$ . Pentru a semnala diferențele semnificative, a fost aplicat testul de analiză a variațiilor, One-Way ANOVA.

### **7.1.2.2. Rezultate și discuții**

Valorile medii și deviațiile standard pentru fiecare parametru analizat pe parcursul celor opt sezoane luate în calcul sunt prezentate în tabelul 7.6.

**Tabelul 7.6./Table 7.6.**

Valorile parametrilor cinetici ai materialului seminal de vier pe parcursul celor opt sezoane luate în studiu

The values of boar sperm kinetic parameters during the eight seasons taken into study

| Sezon           |       | TMot  | PMot  | VAP   | VCL    | VSL   | STR  | LIN  | WOB  | ALH  | BCF   |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|------|------|------|------|-------|
| Primăvara 2013  | Medie | 79,25 | 72,39 | 61,61 | 115,5  | 50,28 | 0,81 | 0,44 | 0,54 | 2,77 | 36,25 |
|                 | SD    | 10,47 | 13,46 | 11,63 | 25,73  | 9,44  | 0,06 | 0,07 | 0,05 | 0,56 | 3,26  |
| Vara 2013       | Medie | 72,25 | 63,21 | 56,99 | 107,7  | 46,19 | 0,81 | 0,44 | 0,53 | 2,73 | 34,20 |
|                 | SD    | 13,47 | 16,79 | 12,89 | 29,06  | 10,40 | 0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,65 | 3,86  |
| Toamna 2013     | Medie | 72,98 | 62,49 | 56,93 | 113,5  | 44,48 | 0,78 | 0,40 | 0,51 | 2,96 | 33,18 |
|                 | SD    | 14,68 | 18,79 | 14,76 | 33,13  | 11,27 | 0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,74 | 4,85  |
| Iarna 2013-2014 | Medie | 80,73 | 75,82 | 73,41 | 145,4  | 56,17 | 0,76 | 0,39 | 0,51 | 3,34 | 37,23 |
|                 | SD    | 10,28 | 12,18 | 9,55  | 25,44  | 7,88  | 0,08 | 0,08 | 0,05 | 0,61 | 2,88  |
| Primăvara 2014  | Medie | 81,11 | 76,14 | 72,20 | 140,6  | 55,71 | 0,77 | 0,40 | 0,52 | 3,25 | 37,10 |
|                 | SD    | 10,48 | 12,62 | 10,12 | 25,97  | 8,45  | 0,08 | 0,08 | 0,06 | 0,61 | 3,25  |
| Vara 2014       | Medie | 74,67 | 66,72 | 61,15 | 118,8  | 48,14 | 0,79 | 0,41 | 0,52 | 3,01 | 34,74 |
|                 | SD    | 12,96 | 15,98 | 12,21 | 27,91  | 9,17  | 0,07 | 0,08 | 0,05 | 0,62 | 3,18  |
| Toamna 2014     | Medie | 74,24 | 66,29 | 62,73 | 124,7  | 48,15 | 0,77 | 0,39 | 0,51 | 3,12 | 34,38 |
|                 | SD    | 14,21 | 16,69 | 13,23 | 30,84  | 10,02 | 0,08 | 0,08 | 0,05 | 0,69 | 4,12  |
| Iarna 2014-2015 | Medie | 79,64 | 74,74 | 73,63 | 141,81 | 58,09 | 0,79 | 0,42 | 0,52 | 3,32 | 37,30 |
|                 | SD    | 10,52 | 12,50 | 10,05 | 25,69  | 8,94  | 0,08 | 0,08 | 0,06 | 0,60 | 2,99  |

**Efectul sezonului asupra mobilității totale și progresive**

După cum se poate observa în tabelul 7.6., mobilitatea totală a înregistrat cele mai mari valori în timpul iernii ( $80,12\% \pm 10,43$ ), iar cele mai mici în timpul verii ( $73,39\% \pm 13,28$ ). Valoarea medie înregistrată pentru sezonul de primăvară ( $80,08\% \pm 10,51$ ) a fost asemănătoare cu cea pentru sezonul de iarnă, în timp ce toamna a fost apropiată ca valoare medie ( $73.66 \pm 14.44$ ) de vară.

Mobilitatea progresivă a oferit de asemenea cele mai mari valori în timpul iernii ( $75,22\% \pm 12,36$ ), iar cea mai mică în timpul toamnei ( $64,55\% \pm 17,78$ ).

Așadar, atât mobilitatea totală cât și cea progresivă au prezentat valori superioare în sezonul de iarnă, ceea ce ar putea sugera că temperaturile ambientale scăzute au o influență pozitivă sau cel puțin nu au o influență negativă asupra calității spermei. Deoarece spermatozoizii dobândesc calitatea de a fi mobili în timpul fazei de maturare în epididim (Berndtson, 2014) se poate afirma că activitatea epididimală poate fi stimulată sau inhibată de variațiile temperaturii.

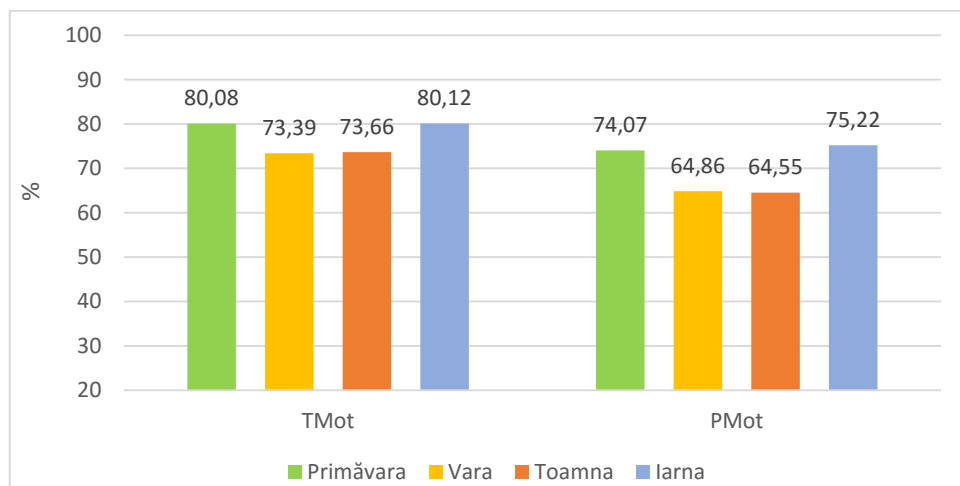
**Tabelul 7.7./Table 7.7.**

Variațiile sezoniere ale mobilității totale și progresive la spermatozoizii de  
vier din sperma diluată

Seasonal variations of total and progressive sperm motility in boar  
extended semen

| Tipul sezonului |       | TMot<br>(%)        | PMot<br>(%)        |
|-----------------|-------|--------------------|--------------------|
| Primăvară       | Medie | 80.08 <sup>a</sup> | 74.07 <sup>a</sup> |
|                 | SD    | 10.51              | 13.22              |
| Vară            | Medie | 73.39 <sup>b</sup> | 64.86 <sup>b</sup> |
|                 | SD    | 13.28              | 16.50              |
| Toamnă          | Medie | 73.66 <sup>b</sup> | 64.55 <sup>b</sup> |
|                 | SD    | 14.44              | 17.78              |
| Iarnă           | Medie | 80.12 <sup>a</sup> | 75.22 <sup>a</sup> |
|                 | SD    | 10.43              | 12.36              |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.01$



**Figura 7.1.** Influența sezonului asupra mobilității totale și progresive a spermatozoizilor

**Figure 7.1.** The influence of season on total and progressive motility

Analiza One-Way ANOVA indică diferențe statistic semnificativ între iarnă și primăvară pe de o parte și respectiv toamnă și iarnă de cealaltă parte, atât pentru mobilitatea totală cât și pentru cea progresivă ( $p < 0,01$ ). În mod interesant, sezonul de primăvară a oferit valori foarte apropiate de cele oferite de sezonul de iarnă, în timp ce sezonul de vară a prezentat o valoare medie aproape identică celei din timpul toamnei (Figura 7.1). În general, iarna și primăvara sunt caracterizate de o fotoperioadă crescătoare, în timp ce vara și toamna de o fotoperioadă descrescătoare, ceea ce sugerează că mobilitatea spermatozoizilor de vier conservați la 17°C este influențată nu doar de temperatura ambientală ci și de caracterul fotoperioadei. Rezultatele acestui studiu sugerează că mobilitatea totală și progresivă sunt mai mari în lunile cu fotoperioadă crescătoare.

#### *Efectul sezonului asupra vitezei de deplasare a spermatozoizilor*

Toți cei trei parametri ce indică viteza spermatozoizilor au variat între sezoane, cu cele mai mari valori fiind observate în timpul iernii.

Viteza medie de deplasare (VAP) a prezentat valori superioare în timpul iernii ( $73,53 \mu\text{m/s} \pm 9,83$ ) în timp ce valorile cele mai mici au fost observate în timpul verii ( $58,95 \mu\text{m/s} \pm 12,74$ ) (Tabelul 7.7.). Testul ANOVA indică diferențe nesemnificative între valorile din timpul verii în comparație cu cele din timpul toamnei ( $p > 0,01$ ).

Graficul indică un comportament al vitezei medii asemănător cu cel al mobilității totale (figura 7.2.), sugerând o posibilă corelație între acești doi parametri. Semnificația vitezei de deplasare a spermatozoizilor este încă

disputată. Unii autori indică o corelație pozitivă ale acestui indicator cu fertilitatea (Budworth, 1988), în timp ce alții ce alții semnalează corelații negative cu rata parturii (Holt, 1997; Park, 2013). O deplasare mai rapidă ajută la atingerea situsului de fertilizare într-un timp mai scurt dar indică și un metabolism mai intens, ce poate duce mai repede la epuizarea gameților.

**Tabelul 7.8./Table 7.8.**

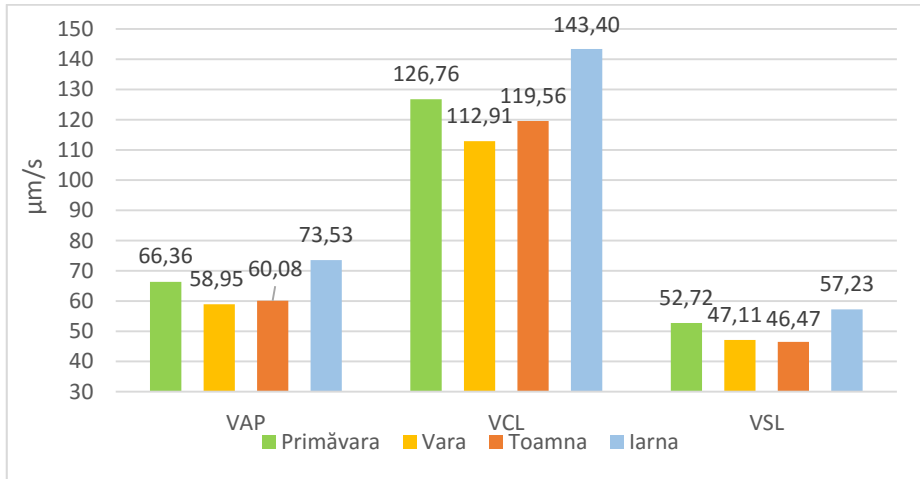
Efectul sezonului asupra vitezei de deplasare a spermatozoizilor  
Seasonal mean values of boar sperm velocity

| Tipul sezonului |       | VAP<br>( $\mu\text{m/s}$ ) | VCL<br>( $\mu\text{m/s}$ ) | VSL<br>( $\mu\text{m/s}$ ) |
|-----------------|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Primăvară       | Medie | 66.36 <sup>a</sup>         | 126.76 <sup>a</sup>        | 52.72 <sup>a</sup>         |
|                 | SD    | 12.17                      | 28.71                      | 9.40                       |
| Vară            | Medie | 58.95 <sup>b</sup>         | 112.91 <sup>b</sup>        | 47.11 <sup>b</sup>         |
|                 | SD    | 12.74                      | 29.05                      | 9.89                       |
| Toamnă          | Medie | 60.08 <sup>b</sup>         | 119.56 <sup>c</sup>        | 46.47 <sup>b</sup>         |
|                 | SD    | 14.24                      | 32.38                      | 10.77                      |
| Iarnă           | Medie | 73.53 <sup>c</sup>         | 143.40 <sup>d</sup>        | 57.23 <sup>c</sup>         |
|                 | SD    | 9.83                       | 25.63                      | 8.53                       |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.01$

Un model asemănător de variații sezoniere au fost observat în cazul vitezei curbilinii (figura 7.2.) deși în acest caz au fost observate diferențe semnificative între toate cele patru sezoane ( $p < 0,01$ ) (tabelul 7.8.).

Viteza în linie dreaptă a fost singurul tip de viteză ce a prezentat valori mai mici toamna, însă fără diferențe semnificative față de valorile din timpul verii (tabelul 7.8.).



**Figura 7.2.** Influența sezonului asupra vitezei de deplasare a spermatozoizilor de vier din sperma conservată

**Figure 7.2.** The influence of season on boar sperm velocity in stored semen

*Efectul sezonului asupra direcției de deplasare a spermatozoizilor*

Deși iarna pare să influențeze în mod pozitiv procentul de spermatozoizi mobili și viteza lor de deplasare, coeficienții de rectilitate și liniaritate au înregistrat valori mai mari în timpul sezonului de vară ( $0,80 \pm 0,07$  pentru STR și  $0,43 \pm 0,08$  pentru LIN) (Tabelul 7.9.).

**Tabelul 7.9./Table 7.9.**

Efectul sezonului asupra parametrilor de traiectorie ai spermatozoizilor de vier din sperma conservată

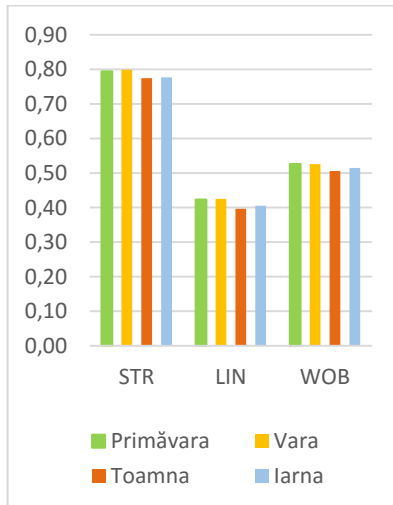
Seasonal mean values of boar sperm trajectory parameters in stored semen

| Tipul sezonului |       | STR<br>(=VSL/VAP) | LIN<br>(=VSL/VCL) | WOB<br>(=VAP/VCL)  | ALH<br>(μm)       | BCF<br>(Hz)        |
|-----------------|-------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Primăvară       | Medie | 0.79 <sup>a</sup> | 0.42 <sup>a</sup> | 0.526 <sup>a</sup> | 2.98 <sup>a</sup> | 36.63 <sup>a</sup> |
|                 | SD    | 0.08              | 0.08              | 0.06               | 0.63              | 3.28               |
| Vară            | Medie | 0.80 <sup>a</sup> | 0.43 <sup>a</sup> | 0.526 <sup>a</sup> | 2.86 <sup>b</sup> | 34.45 <sup>b</sup> |
|                 | SD    | 0.07              | 0.08              | 0.06               | 0.65              | 3.57               |
| Toamnă          | Medie | 0.77 <sup>b</sup> | 0.40 <sup>b</sup> | 0.506 <sup>c</sup> | 3.05 <sup>a</sup> | 33.83 <sup>c</sup> |
|                 | SD    | 0.08              | 0.08              | 0.06               | 0.72              | 4.51               |
| Iarnă           | Medie | 0.78 <sup>b</sup> | 0.41 <sup>c</sup> | 0.515 <sup>d</sup> | 3.33 <sup>c</sup> | 37.27 <sup>d</sup> |
|                 | SD    | 0.08              | 0.08              | 0.06               | 0.61              | 2.94               |

În cadrul aceleași coloane, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.01$

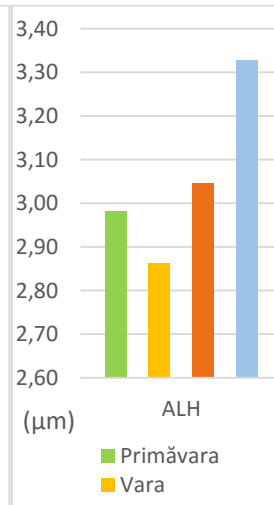
De asemenea, coeficientul wobble a arătat valori mai mari vara, cu diferențe nesemnificative ( $p>0,01$ ) față de sezonul de primăvară. Valorile observate toamna și iarna au fost apropiate ca valoare, însă diferite din punct de vedere statistic ( $p<0,01$ ).

Coeficientul wobble este definit prin raportul dintre viteza medie și viteza curbilinie ceea ce indică faptul că traiectoria spermatozoizilor este mai eficientă cu cât valoarea acestui parametru este mai ridicată. Așadar, deși procentul de spermatozoizi mobili și viteza lor de deplasare a fost mai mare în timpul iernii, se pare că traiectoria urmată de celulele seminale este mai puțin neregulată în timpul sezonului cald (figura 7.3.). Un traseu neregulat implică un efort suplimentar și astfel consumul de energie pentru a atinge situsul fertilizării este mai ridicat.



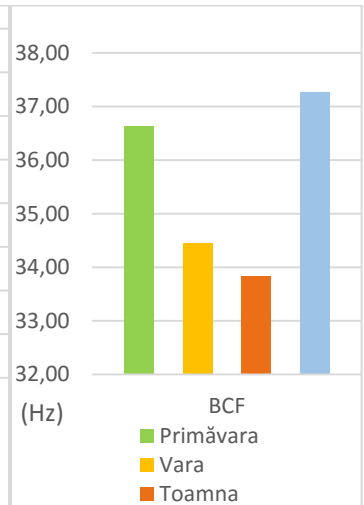
**Figura 7.3.** Efectul sezonului asupra STR, LIN și WOB din sperma conservată de vier

**Figure 7.3.** The effect of season on STR, LIN and WOB in boar stored semen



**Figura 7.4.** Efectul sezonului asupra ALH din sperma conservată de vier

**Figure 7.4.** The effect of season on ALH in boar stored semen



**Figura 7.5.** Efectul sezonului asupra BCF din sperma conservată de vier

**Figure 7.5.** The effect of season on BCF in boar stored semen

Coeficientul ALH, care definește distanța medie la care capul spermatozoidului se îndepărtează de traiectoria sa principală, a prezentat valori mai mari în timpul iernii (figura 7.4), în timp ce valorile mai mici au fost

înregistrate în timpul verii. Rezultatele nu sunt surprinzătoare, ținând cont că există corelații între WOB și ALH.

Și pentru BCF valorile au fost mai mari iarna, iar One-Way ANOVA a semnalat diferențe statistic semnificative pentru toate cele patru tipuri de sezon.

#### **7.1.2.3. Concluzii parțiale**

1. Studiul de față sugerează că sezonul de recoltare influențează parametrii materialului seminal de vier examinat după trei zile de conservare la 17°C. Această influență a fost evidentă pentru toți cei 10 parametri examinați.

2. Se pare că în timpul iernii se înregistrează valori mai mari pentru mobilitatea totală și progresivă, pentru viteza de deplasare a spermatozoizilor (curbă linie, medie sau în linie dreaptă) dar și pentru amplitudinea de deplasare laterală a capului și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie. Pe de altă parte, sezonul de vară oferă valori superioare pentru coeficienții de rectilitate, liniaritate și wobble.

3. Se poate afirma că sezonul rece stimulează metabolismul spermatozoizilor, sporind procentajul spermatozoizilor mobili și viteza lor. Pe de altă parte, deplasarea celulelor spermatice este mai uniformă în sezonul cald, putând reflecta un consum mai eficient al resurselor energetice.

4. Similitudini majore au fost observate între valorile din timpul iernii și primăverii și de asemenea între valorile din timpul verii și toamnei, sugerând o dependență a acestor parametri de caracterul fotoperioadei, respectiv crescătoare sau descrescătoare.

## **7.2. VARIAȚIILE SEZONIERE ALE PARAMETRILOR SEMINALI LA VIERII CAZAȚI ÎN CONDIȚII STANDARDIZATE**

### **7.2.1. Material și metodă**

#### *Vierii*

Materialul seminal a provenit de la 31 vierii din rasa Pietrain, clinic sănătoși și maturi din punct de vedere sexual, cu vârste cuprinse între 8 luni și 2,5 ani, dintr-o unitate modernă, construită recent, specializată în reproducție suină.

Pe parcursul studiului, vierii au fost cazați în condiții standardizate. Temperatura a fost menținută pe perioada întregului an în jurul valorii de 18°C, utilizând sisteme de încălzire iarna și aspersiuni cu apă în timpul verii. Lumina a fost asigurată artificial, timp de 11 ore zilnic, indiferent de sezon. Hrana a fost preparată după aceeași rețetă pe tot parcursul studiului și administrată automat, prin instalații speciale. Apa a fost asigurată *ad libitum*.

### *Recoltarea și examinarea materialului seminal*

Materialul seminal a fost recoltat prin metoda manuală cu mână dublă (Bogdan, 1999; Ciornei, 2012), pe manechin, cu un interval de cel puțin 7 zile între două recoltări succesive de la același vier.

După recoltare au fost determinați principalii parametri seminali, după cum urmează: volumul ejaculatului –folosind paharul gradat, concentrația în spermatozoizi, numărul total de spermatozoizi/ejaculat, mobilitate totală, număr total de spermatozoizi mobili/ejaculat, mobilitate progresivă, număr total de spermatozoizi progresivi/ejaculat –utilizând sistemul CASA, modelul CEROS II (IMV Technologies, L'Aigle, Franța).

Doar ejaculatele cu cel puțin 60% mobilitate totală au fost înregistrate și procesate, celelalte fiind eliminate.

Durata studiului a fost de 12 luni, între 1 Decembrie 2012 și 30 Noiembrie 2013, incluzând astfel toate cele patru sezoane specifice climatului temperat: iarna (Decembrie, Ianuarie, Februarie), primăvară (Martie, Aprilie, Mai), vară (Iunie, Iulie, August) și toamnă (Septembrie, Octombrie, Noiembrie).

### *Analiza statistică*

Datele obținute au fost procesate statistic utilizând programul IBM SPSS® Statistics, versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, SUA). Rezultatele sunt prezentate ca valori medii și deviația standard (SD). Pentru a semnală diferențele statistic semnificativ, a fost aplicat testul One-Way ANOVA, iar pragul de semnificație a fost setat la  $p < 0,05$ .

## **7.2.2. Rezultate și discuții**

### *Variația sezonieră a volumului*

După cum se poate observa în tabelul 7.10. valorile medii au variat între 155,74 în timpul toamnei și 218,75 în timpul verii.

**Tabelul 7.10./Table 7.10.**

Valorile medii ale volumului ejaculatului la vierii cazați în condiții standardizate, în funcție de sezon  
Mean values of ejaculate volume in boars held in standardized conditions , according to the season

| Volumul ejaculatului | Sezon                |                     |                     |                      |
|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
|                      | Iarnă                | Primăvară           | Vară                | Toamnă               |
| Medie (ml)           | 166,01 <sup>ad</sup> | 194,69 <sup>b</sup> | 218,75 <sup>c</sup> | 155,74 <sup>ad</sup> |
| SD                   | 47,45                | 45,06               | 54,92               | 55,68                |

În cadrul aceleiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Volumul unui ejaculat este alcătuit în proporție de aproximativ 93% din plasmă seminală (Ciornei, 2012), care este produsă aproape în totalitate de către glandele sexuale anexe. În acest studiu, cele mai mari valori pentru volum au fost înregistrate în perioada Iunie-August, cu diferențe semnificative față de celelalte perioade ale anului, ceea ce ar sugera că activitatea glandelor anexe a fost mai intensă în timpul verii. Aceste rezultate le contrazic însă pe cele obținute de alți autori. De exemplu, Janett și col., (2005) au observat valori semnificativ mai mari toamna, în timp ce Cheon și col. (2002) și Suriyasomboon și col.(2004) au raportat cele mai mici valori pentru sezonul de vară. Lawrence și col. (1970) au obținut ejaculate cu volum mai ridicat în perioada Octombrie-Decembrie, perioadă în care temperaturile ambientale nu au depășit 76,8°F (24,89°C).

*Variația sezonieră a concentrației ejaculatelor în spermatozoizi*

Concentrația materialului seminal a variat între  $454,89 \times 10^6/\text{ml}$  în timpul verii și  $571,62 \times 10^6/\text{ml}$  în timpul toamnei (tabelul 7.11.).

**Tabelul 7.11./Table 7.11.**

Valorile medii ale concentrației materialului seminal la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare

Mean values of sperm concentration in boars held in standardized conditions, according to the season

| Concentrația în spermatozoizi     | Sezon                 |                       |                       |                     |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
|                                   | Iarnă                 | Primăvară             | Vară                  | Toamnă              |
| Media ( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | 467,49 <sup>abc</sup> | 466,90 <sup>abc</sup> | 454,89 <sup>abc</sup> | 571,62 <sup>d</sup> |
| SD                                | 128,53                | 113,73                | 121,52                | 159,62              |

În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Cu excepția toamnei, nu au fost depistate diferențe semnificative între sezoane. Se poate observa că între Septembrie și Noiembrie s-a înregistrat cea mai mare valoare medie pentru parametrul Concentrație, dar și cea mai mare deviație standard, indicând o variabilitate mai ridicată a valorilor.

Concentrația mai ridicată din timpul toamnei poate fi explicată prin volumul mai scăzut al ejaculatelor din aceeași perioadă. Astfel, rezultatele ar putea sugera că rata spermatogenezei a rămas constantă, concentrația fiind modulată indirect de către volumul ejaculatului. Mai exact, glandele anexe au crescut numărul de spermatozoizi pe unitatea de volum indirect, prin reducerea cantității de plasmă seminală.

Rezultatele acestui studiu au fost într-o manieră ridicată diferite de cele obținute în alte studii, în care pe perioada toamnei au fost observate valori semnificativ mai mici (Syring, 2008; Petrocelli și col., 2015). În studiul lui Syring (2008) autorul a observat o influență clară a sezonului dar și a temperaturilor ambientale asupra parametrilor seminali.

*Variația sezonieră a numărului total de spermatozoizi/ejaculat*

Numărul total de spermatozoizi/ejaculat (TS/Ej.) este parametrul care reflectă cel mai bine rata spermatogenezei. Acest parametru a prezentat valori semnificativ mai ridicate în tipul sezonului de vară (Tabelul 7.12.). Astfel, se pare că activitatea sporită a glandelor anexe din perioada lunie-August a fost acompaniată de o intensificare a spermatogenezei. La polul opus se află sezonul de iarnă, în timp ce între sezoanele de primăvară și toamnă nu au fost observate diferențe semnificative ( $p > 0,05$ ).

**Tabelul 7.12./Table 7.12.**

Valorile medii ale numărului total de spermatozoizi/ejaculat la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare  
Mean values of total number of sperm/ejaculate in boars held in standardized conditions, according to the season

| TS/Ej.                     | Sezon              |                     |                    |                     |
|----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
|                            | Iarnă              | Primăvară           | Vară               | Toamnă              |
| Media<br>( $\times 10^9$ ) | 74,30 <sup>a</sup> | 87,66 <sup>bd</sup> | 95,91 <sup>c</sup> | 84,71 <sup>bd</sup> |
| SD                         | 19,84              | 17,44               | 24,92              | 29,09               |

În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Rezultatele le contrazic pe cele obținute într-un alt studiu, (Janett și col., 2005), în care numărul total de spermatozoizi a fost semnificativ mai mic primăvara și vara comparativ cu toamna și iarna. De asemenea, autorii respectivi au raportat și un procent mai mic de spermatozoizi morfologic normali în timpul verii.

Un alt studiu a observat o producție mai ridicată de spermatozoizi toamna și iarna și mai scăzută vara (Ciereszko și col., 2000). Autorii au afirmat ca modificările ar fi putut fi cauzate de tulburări ale spermatogenezei din cauza temperaturilor ridicate din timpul verii și că variația acestui parametru s-a aflat în legătură cu modificările lunare ale activității acrozinei între Noiembrie și Martie.

*Variații sezoniere ale mobilității totale și progresive*

Unul dintre principalii indicatori ai calității ce trebuie luați în considerare în cadrul examenului general al spermei este mobilitatea spermatozoizilor, care reflectă abilitatea acestora de a atinge situsul fertilizării. Dacă valoarea mobilității se află sub o anumită valoare standard pre-stabilită, întreg ejaculatul este eliminat. În acest studiu, pragul de acceptare a unui ejaculat a fost de 60% mobilitate totală.

Mobilitatea totală (TMot) a variat între  $82,39\% \pm 8,98$  în timpul verii și  $87,94\% \pm 6,11$  în timpul iernii (tabelul 7.13.). Deși în aparență au fost înregistrate valori mai mici vara, se poate observa că diferențele între valorile medii din timpul verii și cele din timpul primăverii și toamnei sunt statistic nesemnificative ( $p > 0,05$ ), ceea ce sugerează că standardizarea condițiilor de cazare a ajutat la evitarea stresului caloric caracteristic verii, fiind demonstrat anterior ca temperaturile de peste  $30^{\circ}\text{C}$  conduc la o scădere evidentă a calității spermei (Schnurrbusch și col., 2002).

Sezonul recoltării este unul dintre principalii factori care influențează procentul de spermatozoizi mobili din ejaculatul de vier (Ibănescu și col., 2014), însă în acest studiu această influență a fost minimă, nefiind observate diferențe semnificative între trei din cele patru sezoane. Singurul anotimp ce a prezentat diferențe semnificative comparativ cu restul a fost iarna, pe parcursul căreia au fost înregistrate cea mai mare valoare medie și cea mai mică variabilitate a valorilor (tabelul 7.13).

**Tabelul 7.13./Table 7.13.**

Valorile medii ale mobilității totale și progresive a spermatozoizilor la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare  
Mean values of total and progressive sperm motility in boars held in standardized conditions, according to the season

|          |       | Sezon              |                      |                      |                      |
|----------|-------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|          |       | Iarnă              | Primăvară            | Vară                 | Toamnă               |
| TMot (%) | Media | 87,94 <sup>a</sup> | 85,05 <sup>bcd</sup> | 82,39 <sup>bcd</sup> | 83,35 <sup>bcd</sup> |
|          | SD    | 6,11               | 8,10                 | 8,98                 | 8,12                 |
| PMot (%) | Media | 61,41 <sup>a</sup> | 54,25 <sup>bcd</sup> | 54,14 <sup>bcd</sup> | 52,31 <sup>bcd</sup> |
|          | SD    | 9,38               | 13,59                | 13,04                | 10,68                |

În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

Un comportament identic poate fi observat pentru mobilitatea progresivă (PMot), care în cadrul analizei computerizate a materialului seminal indică procentul de spermatozoizi cu mișcări evidente de înaintare (tabelul 7.13.).

Cele mai mari valori au fost obținute în timpul iernii:  $61,41 \pm 9,38$ . Totuși, se poate observa lipsa diferențelor semnificative (tabelul 7.13) între celelalte trei sezoane, aspect ce se află în dezacord cu rezultatele altor studii, care au raportat valori semnificativ mai mari în timpul primăverii (Syring, 2008) sau iernii și primăverii (Barranco și col., 2013). Barranco și col. (2013) au observat de asemenea că spermatozoizii din ejaculatele recoltate vara și, la un nivel mai scăzut toamna, sunt mai sensibili la congelare decât cei din ejaculate recoltate iarna și primăvara. Murase și col. (2007) au raportat cel mai mic procentaj de spermatozoizi mobili ( $p < 0,05$ ) în lunile de vară târzie și toamnă timpurie. În studiul lor, această perioadă a coincis cu cele mai ridicate temperaturi ambientale și cu o umiditate relativă ridicată și a oferit se asemenea cel mai ridicat nivel al aglutinării spermatozoizilor, cel mai scăzut procentaj de spermatozoizi cu acrozom intact și cel mai ridicat procentaj de spermatozoizi cu anomalii morfologice.

*Variația sezonieră a numărului total de spermatozoizi mobili/ejaculat și a numărului total de spermatozoizi cu mobilitate progresivă/ejaculat*

Acești doi parametri reflectă atât intensitatea procesului de formare a spermatozoizilor, cât și eficiența maturării lor.

Numărul total de spermatozoizi mobili (TMS/Ej.) a prezentat valori mai ridicate în timpul verii, însă diferențele față de primăvară și toamnă nu au fost semnificative (tabelul 7.14.).

**Tabelul 7.14/Table 7.14**

Valorile medii ale TMS/Ej. și TPS/Ej., la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare  
Mean values of TMS/Ej. și TPS/Ej., in boars held in standardized conditions, according to the season

|                              |       | Sezon               |                     |                     |                     |
|------------------------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                              |       | Iarnă               | Primăvară           | Vară                | Toamnă              |
| TMS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | Media | 65,42 <sup>a</sup>  | 74,68 <sup>bd</sup> | 79,51 <sup>cd</sup> | 71,46 <sup>ad</sup> |
|                              | SD    | 18,11               | 16,61               | 24,17               | 27,11               |
| TPS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | Media | 45,71 <sup>ab</sup> | 47,82 <sup>bc</sup> | 52,74 <sup>c</sup>  | 44,20 <sup>bd</sup> |
|                              | SD    | 14,14               | 16,09               | 21,56               | 17,68               |

În cadrul aceluiași rând, exponenți diferiți indică o diferență statistic semnificativă a valorilor la  $p < 0.05$

În mod interesant, iarna a oferit valori semnificativ mai mici pentru TMS/Ej., în comparație cu celelalte sezoane, deși valoarea pentru TMot a fost cea mai mare. Acest aspect poate fi explicat prin valoarea scăzută a TS/Ej. înregistrată

În acest sezon si sugerează că TMS/Ej. este modulată mai degrabă de către numărul total de spermatozoizi din ejaculat decât de către procentajul spermatozoidilor mobili.

Cât despre numărul total de spermatozoizi cu mișcări progresive (TPS/Ej.), au fost înregistrate valori semnificativ mai mari în timpul verii comparativ cu celelalte sezoane, fapt ce poate fi corelat cu valorile mai mari ale TS/Ej. din timpul acestei perioade. Toate celelalte sezoane au arătat între ele diferențe minore, nesemnificative în ceea ce privește valoarea TPS/Ej.

### **7.2.3. Concluzii parțiale**

1. Influența sezonului asupra principalilor parametri seminali de vier a fost mai puțin vizibilă comparativ cu alte studii pe această temă. Deși au putut fi observate unele variații ale valorilor de la un sezon la altul, acestea au fost mai reduse, și ar fi putut fi cauzate de alți factori ce afectează spermatogeneza, cum ar fi vârsta vierilor sau infecțiile subclinice. De asemenea, în timp ce majoritatea autorilor afirmă că în timpul verii cantitatea spermei este redusă, în acest studiu au fost obținute valori mai mari pentru volum și numărul total de spermatozoizi/ejaculat. Aceste aspecte sugerează că standardizarea și optimizarea microclimatului în fermă poate reduce stresul caloric asupra spermatogenezei din timpul verii, oferind astfel o soluție împotriva infertilității de sezon la suine. Studii suplimentare sunt necesare pentru a observa dacă acest sistem de cazare este eficient și în ceea ce privește parametrii speciali ai materialului seminal.

2. Cea mai bună lună din punct de vedere reproductiv (prin prisma numărului de spermatozoizi cu mișcări progresive din ejaculat) a fost luna iunie iar cel mai bun sezon a fost vara. La polul opus s-au situat luna septembrie și sezonul de toamnă;

3. Numărul de spermatozoizi mobili și numărul de spermatozoizi cu mobilitate progresivă dintr-un ejaculat sunt influențate mai degrabă de către numărul total de spermatozoizi din ejaculat decât de procente mobilității totale și mobilității progresive.

4. Concentrația materialului seminal este moderată mai mult de către activitatea glandelor anexe (prin creșterea sau scăderea volumului ejaculat) decât de către rata spermatogenezei;

5. Condițiile de întreținere influențează variația sezonieră a principalilor indicatori spermatici la vier.

**CAPITOLUL VIII. SUBPOPULAȚIILE DE SPERMATOZOIZI DIN  
MATERIALUL SEMINAL DE VIER ȘI VARIAȚIA SEZONIERĂ A ACESTORA  
CHAPTER VIII. MOTILE SPERM SUBPOPULATIONS IN BOAR SPERM  
AND THEIR SEASONAL VARIATION**

Pe lângă calcularea automată a procentului de spermatozoizi mobili din proba analizată, sistemul CASA prezintă și avantajul analizei individuale a parametrilor cinetici (viteză curbilinie, viteza medie, coeficient de liniaritate, etc.) pentru fiecare spermatozoid pătruns în câmpul de analiză precum și înregistrarea valorilor calculate, într-o măsură ce variază în funcție de sistemul utilizat. De obicei, sistemele CASA analizează între 7 și 15 câmpuri, calculând valorile individuale pentru toți spermatozoizii observați, pe baza cărora determină valorile medii pentru fiecare câmp. Ulterior, computerul utilizează valorile medii pentru toate câmpurile pentru a calcula valoarea medie pentru proba analizată, pe care o stochează. În plus, acesta memorează și valorile individuale ale spermatozoizilor din câmpul cu valorile cele mai apropiate de media rezultată pentru proba analizată. Valorile respective permit o analiză ulterioară mai aprofundată a unei probe de material seminal, cu încadrarea spermatozoizilor în anumite sub-grupuri pe baza parametrilor cinetici, așa numitele sub-populații mobile, ceea ce oferă posibilitatea creării unui profil pentru fiecare ejaculat.

Punctul de plecare pentru acest procedeu a fost observația că într-o probă de material seminal și respectiv într-un ejaculat, spermatozoizii nu formează un grup omogen. În afară de împărțirea în spermatozoizi mobili/imobili sau vii/morți, celulele seminale dintr-o probă pot fi împărțite în subgrupuri morfometrice (Martí și col., 2012; Vicente-Fiel și col., 2013), funcționale (Pérez-Llano și col., 2003), morfo-funcționale (Pérez-Llano și col., 2009), biochimice (Calamera și col., 2003) și mai ales, cinetice (Quintero-Moreno și col., 2004; Ramió și col., 2008; Muiño și col., 2009; Dorado și col., 2010; Ferraz și col., 2014).

După ideea lansată de W.V. Holt (Holt, 1996) că ejaculatele de vier sunt formate din anumite sub-grupuri aproximativ omogene din punct de vedere cinetic ce pot fi determinate pe baza rezultatelor oferite de CASA, a urmat un val de studii asupra acestor așa-numite subpopulații mobile, atât pe sperma de vier (Ramió și col., 2008; Pérez-Llano și col., 2009; Henning și col., 2014), cât și pe cea provenită de la alte specii: bărbat (Calamera și col., 2003), taur (Muiño și col., 2008; Ferraz și col., 2014), armăsar (Quintero-Moreno și col., 2003), măgar (Miró și col., 2009; Dorado și col., 2013), berbec (Martí și col., 2012), țap (Dorado și col., 2010; Vicente-Fiel, 2013), cerb (Martinez-Pastor și col., 2005) sau câine (Peña și col., 2012).

Clasificarea spermatozoizilor dintr-o probă în aceste subpopulații mobile reprezintă un pas util, oferind informații mai complete asupra valorii biologice a unui ejaculat decât simpla prezentare a mediilor pentru parametrii calculați (Amann și Waberski, 2014). De exemplu, unii autori (Flores și col., 2009) au observat că subpopulațiile mobile din ejaculatul de vier rezistă într-o manieră diferită la procedura de congelare, în timp ce alții (Ramio și col. 2008) au remarcat că răspunsul unei probe de material seminal de vier la capacitatea și reacția acrozomială *in vitro* este corelată cu anumite schimbări în proporția subpopulațiilor din structura sa, aspecte ce se pot dovedi foarte utile în selectarea ejaculatelor de calitate superioară.

Rolul și importanța subpopulațiilor de spermatozoizi în ejaculatul de vier nu sunt pe deplin cunoscute, însă este cert că prezintă importanță practică și științifică, iar unii autori cu experiență în domeniu recomandă deja introducerea acestui concept în cadrul evaluării calitative a materialului seminal, pentru a obține informații optimizate asupra unui ejaculat (Rodríguez-Gil, 2013).

Deși subpopulațiile de spermatozoizi dintr-un ejaculat reprezintă un subiect studiat intens în ultimii ani, la momentul desfășurării cercetărilor nu au putut fi identificate studii cu privire la variația lor sezonieră, la vieri.

Scopul acestui studiu a fost de a observa variația sezonieră a subpopulațiilor mobile din materialul seminal diluat de vier.

## 8.1. MATERIAL ȘI METODĂ

### *Materialul seminal*

Studiul a cuprins analiza unui număr total de 4814 ejaculate obținute de la 700 de vieri maturi din punct de vedere sexual și clinic sănătoși, cazați în condiții normale într-o unitate specializată în producerea dozelor de însămânțare artificială din Germania. Durata recoltării a fost de 24 de luni, cuprinsă între Martie 2013 și Februarie 2015. Recoltarea materialului seminal a fost efectuată prin metoda manuală, cu mână dublă (Bogdan, 1999; Ciornei, 2012) și cu ajutorul vaginului artificial, asemănător celui descris de Barrabes Aneas și col. (2008), cu un interval de aproximativ 7 zile între două recoltări succesive de la același vier. După ce au fost testate calitativ în cadrul examenului general, ejaculatele au fost diluate cu BTS® (Minitube, Tiefenbach, Germania) și supuse conservării la 17°C, în doze de 100 ml (90 ml spermă diluată + 10 ml aer).

### *Analiza materialului seminal și identificarea subpopulațiilor*

Examinarea materialului seminal s-a realizat după trei zile de conservare, utilizând sistemul CASA, programul SpermVision (Minitube of America - MOFA®, Verona, WI, USA) versiunea 3.7, conectat la un microscop Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germania) prevăzut cu

plăcuță încălzită la 38°C. Setările au fost ajustate după cum urmează: pentru parametrul mobilitate totală au fost luați în considerare toți spermatozoizii prezentând orice tip de mișcare, în timp ce pentru parametrul mobilitate progresivă au fost luați în considerare doar spermatozoizii cu o viteză medie (VAP) de cel puțin 25  $\mu\text{m/s}$  și un coeficient de rectilinitate (STR) de cel puțin 0,3.

Următorii parametri seminali au fost determinați: viteza medie a spermatozoizilor (VAP), viteza curbilinie (VCL), viteza în linie dreaptă (VSL), coeficientul de rectilinitate (STR), coeficientul de liniaritate (LIN), coeficientul de oscilație (WOB), amplitudinea de deplasare laterală a capului (ALH) și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie (BCF).

Pentru fiecare probă analizată, au fost accesate datele individuale ale spermatozoizilor aflați în câmpul salvat de computer, obținând astfel valorile calculate pentru un număr total de 433 145 de spermatozoizi analizați pe parcursul celor doi ani. Toate datele au fost ulterior incluse într-o bază de date comună.

Pentru identificarea subpopulațiilor, valorile au trecut printr-o serie de analize statistice, utilizând programul IBM SPSS® Statistics versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, USA). Primul pas a fost reprezentat de efectuarea analizei componentelor principali (Principal Component Analysis, cunoscută și sub abrevierea PCA) asupra celor 8 parametri cinetici amintiți mai sus, folosind ca și criteriu de extracție valoarea „Eigenvalue”, al cărei minim a fost setat la 1. PCA are drept scop reducerea numărului de variabile dintr-o bază de date, pentru a o face mai ușor de vizualizat și analizat. Analiza se bazează pe identificarea corelațiilor dintre variabile și a tiparelor de variație și extragerea elementelor ce influențează în cea mai mare măsură variația valorilor. După aplicarea PCA, au fost identificați doar doi componenți cu Eigenvalue mai mare de 1. În matricea componentelor au fost observate două tipare de variație, primul caracterizând VCL, VAP, VSL, BCF și ALH iar al doilea caracterizând STR, LIN și WOB. În consecință, au fost selectate pentru analizele ulterioare cele două variabile cu cele mai mari valori în matricea componentelor, mai exact VAP (0,973) și LIN (0,924). Următorul pas a fost reprezentat de standardizarea valorilor pentru parametrii VAP și LIN, astfel încât valoarea medie să fie 0 iar deviația standard să fie 1. Rolul standardizării valorilor este de a evita calcularea eronată a centrelor subgrupurilor din cauza scalei diferite de valori pentru cei doi parametri. Mai departe, încadrarea spermatozoizilor în subpopulații a fost realizată cu ajutorul procedurii „k-means cluster analysis” utilizând distanțele euclidiene. Numărul solicitat de subgrupuri (clustere) a fost de 4, pe baza informațiilor din majoritatea studiilor anterioare pe această temă. După

aplicarea acestei analize, apartenența fiecărui spermatozoid la unul dintre subgrupuri a fost salvată, pentru a putea calcula procentul fiecărei subpopulații identificate.

## **8.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

Determinarea subpopulațiilor de spermatozoizi dintr-un ejaculat reprezintă o analiză modernă, recomandată de unii autori pentru în scopul de utiliza la potențial maxim sistemul CASA (Amann și Waberski, 2014). Deși nu s-a ajuns încă la un consens în ce privește rolul fiziologic al acestora, utilitatea analizei a fost demonstrată prin unele studii care au evidențiat de exemplu legătura dintre structura subpopulațiilor și fertilitate (Yániz și col., 2015), activarea mobilității în prezența bicarbonatului (Satake și col., 2006; Henning și col., 2014) sau rezistența la congelare (Ortega-Ferrusola și col., 2009). Răspunsul diferit la acțiunea unor agenți precum bicarbonatul indică faptul că subpopulațiile de spermatozoizi dintr-un ejaculat sunt caracterizate de un potențial diferit de a-și schimba activitatea biologică și implicit de a suporta capacitatea. Acest aspect prezintă o importanță majoră, indicând că posibilitatea unui ejaculat de a obține un procent corect de spermatozoizi capacitați depinde de o anumită distribuție a subpopulațiilor de spermatozoizi mobili (Ramió și col., 2008).

Interpretarea rezultatelor analizei computerizate a spermei doar pe baza valorilor medii este considerată de unii autori incompletă (de Paz și col, 2011; Amann și Waberski, 2014).

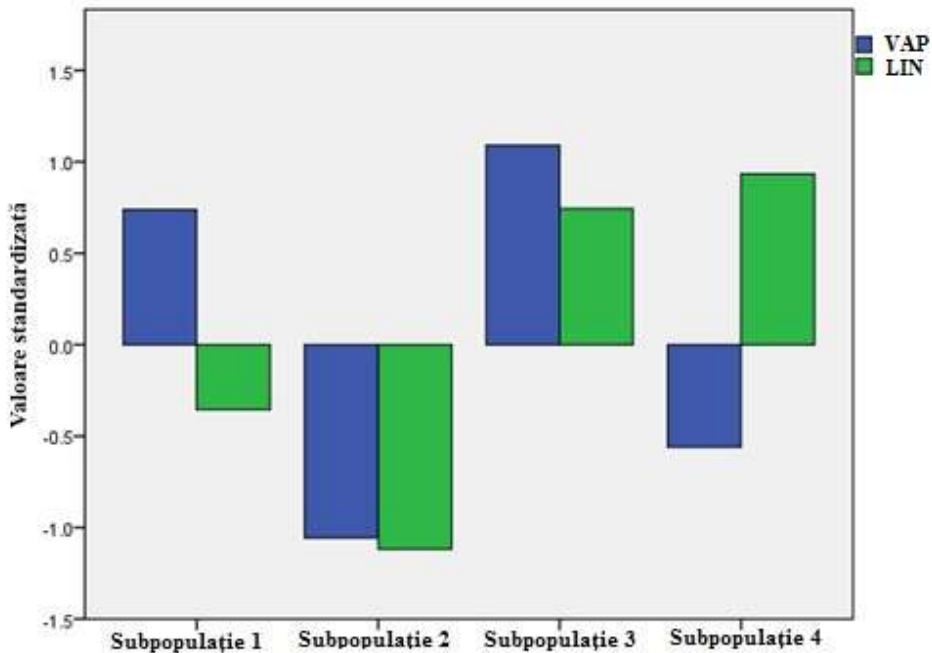
În urma analizei de clustering efectuate în cadrul acestui studiu, heterogenitatea materialului seminal a fost evidentă, cu existența unor subgrupuri distincte de spermatozoizi caracterizate prin valori diferite pentru viteza de deplasare și coeficientul de liniaritate. Valorile medii ale parametrilor cinetici pentru cele patru subpopulații sunt redați în tabelul 8.2. Pe scurt, caracteristicile principale ale acestora sunt după cum urmează (figura 8.1.):

- subpopulația 1 a cuprins spermatozoizi ce s-au deplasat cu o viteză ridicată însă cu un coeficient de liniaritate relativ scăzut (figura 8.2. A). Acest grup a cuprins circa 28% din totalul spermatozoidelor analizați (tabelul 8.1.);

- subpopulația 2 a cuprins spermatozoizi caracterizați de viteză și liniaritate reduse (figura 8.2. B). Aproximativ 26% din totalul spermatozoidelor au făcut parte din acest grup.

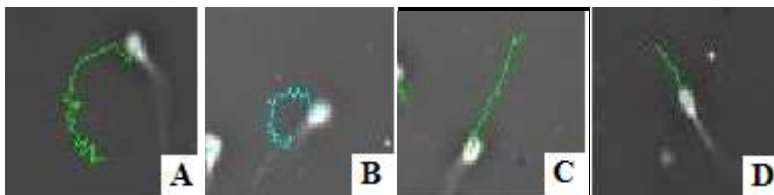
- subpopulația 3 a fost reprezentată de spermatozoizi cu viteză și coeficient de liniaritate relativ ridicate (figura 8.2. C). În total, aproximativ 20% spermatozoizi au făcut parte din acest grup (tabelul 8.1.).

- subpopulația 4 a inclus spermatozoizi ce s-au deplasat cu viteză redusă însă cu un coeficient de liniaritate ridicat (figura 8.2. D). Acești spermatozoizi au reprezentat circa 26% din numărul total (tabelul 8.1.).



**Figura 8.1.** Caracteristicile celor patru subpopulații de spermatozoizi identificate în sperma de vier, în ceea ce privește viteza medie și coeficientul de liniaritate (valori standardizate)

**Figure 8.1.** The characteristics of the four motile sperm subpopulations identified in boar semen, in terms of average path velocity and linearity (standardized values)



**Figura 8.2.** Traseele reprezentative pentru cele patru subpopulații de spermatozoizi identificate în sperma de vier (A-subpopulația 1; B-subpopulația 2; C-subpopulația 3; D-subpopulația 4)

**Figure 8.2.** Representative motility tracks for sperm within the four motile subpopulation identified in boar semen (A-subpopulation1; B-subpopulation 2; C-subpopulation 3; D-subpopulation 4)

Prezența a patru subpopulații distincte de spermatozoizi în materialul seminal a fost evidențiată de mai mulți autori, atât la vier (Montserrat Rivera și col, 2005; Ramió și col., 2008) cât și la alte specii (Quintero-Moreno și col., 2003; Miró și col., 2005; Dorado și col., 2011; Maya-Soriano și col., 2015). Această structură a materialului seminal pare să fie relativ constantă, rămânând neschimbată de exemplu după expunerea masculilor la regimuri diferite de lumină (Rivera și col., 2006) și capacitate (Ramió și col., 2008) în cazul spermei de vier sau după crioconservare în cazul spermei de câine (Dorado și col., 2011).

**Tabelul 8.1./Table 8.1.**

Dimensiunea fiecărei subpopulații în totalul spermatozoidilor luați în calcul  
The size of each motile sperm subpopulation identified in boar semen

| Subpopulație | Număr<br>spermatozoizi |         |  | %     |
|--------------|------------------------|---------|--|-------|
|              |                        |         |  |       |
|              | 1                      | 120 906 |  | 27,91 |
|              | 2                      | 113 239 |  | 26,14 |
|              | 3                      | 85 820  |  | 19,81 |
|              | 4                      | 113 180 |  | 26,13 |
| <b>Total</b> |                        | 433 145 |  | 100   |

De remarcat că ponderea subpopulațiilor a fost aproximativ egală, excepția fiind subgrupul spermatozoidilor cu viteză și coeficient de liniaritate ridicate, care a înregistrat o valoare mai mică în comparație cu celelalte trei (tabelul 8.1.). Într-un studiu anterior, Ramió și col. (2008) au obținut o distribuție asemănătoare, cu subgrupul spermatozoidilor rapizi și liniari fiind cel mai slab reprezentat (19%) pe când celelalte trei subgrupuri au prezentat valori apropiate.

Valorile medii pentru parametrii cinetici ale subpopulațiile determinate în cadrul acestui studiu sunt prezentate în tabelul 8.2..

Pe lângă diferențele referitoare la viteza și liniaritatea deplasării, se poate observa că subgrupurile identificate diferă și prin prisma amplitudinii de deplasare laterale a capului și a frecvenței de intersectare cu traiectoria medie. Se remarcă valorile superioare pentru ALH arătate de subgrupurile 1 și 3. Aceste subpopulații au fost caracterizate și de valori mari pentru VAP și BCF (tabelul 8.1.). Pe de altă parte, subgrupul 2, caracterizat de valori mici pentru VAP, a prezentat în același timp valori reduse și pentru ALH și BCF și cele inferioare arătate de subgrupurile 2 și 4.

**Tabelul 8.2./Table 8.2.**

Valorile medii și deviațiile standard caracteristice celor patru subpopulații de spermatozoizi identificate în sperma de vier, în ceea ce privește parametrii cinetici

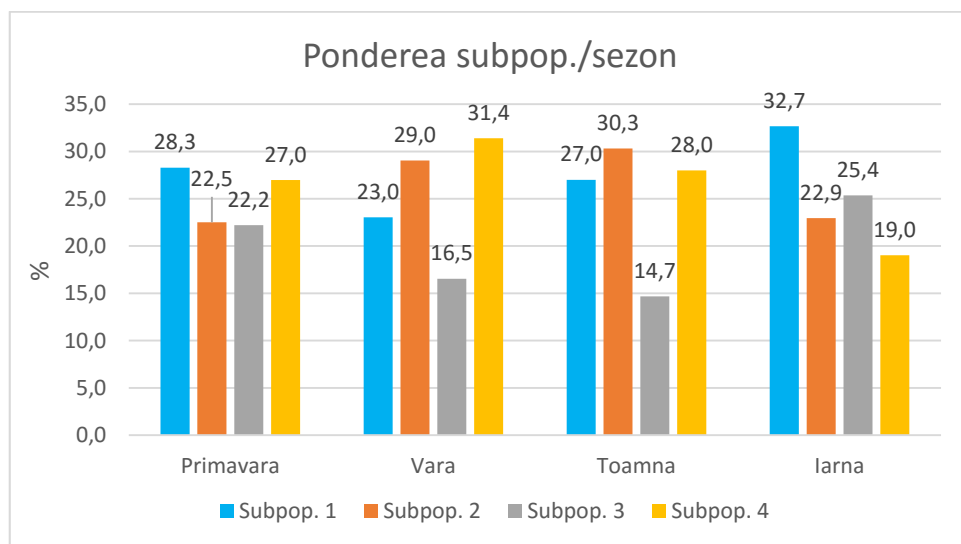
Mean values and standard deviation showed by the four motile sperm subpopulations in boar semen in terms of the kinetic parameters

|                  | Subpopulația<br>1<br>(medie ± SD) | Subpopulația<br>2<br>(medie ± SD) | Subpopulația<br>3<br>(medie ± SD) | Subpopulația<br>4<br>(medie ± SD) |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| VCL<br>(μm/sec)  | 168,03±55,67                      | 29,94±33,99                       | 144,68±45,67                      | 42,60±27,09                       |
| VAP<br>(μm/sec)  | 74,80±20,95                       | 9,67±10,67                        | 87,54±21,44                       | 27,68±16,51                       |
| VSL<br>(μm/sec)  | 49,03±15,96                       | 5,46±6,45                         | 78,38±19,10                       | 24,37±15,26                       |
| ALH<br>(μm)      | 3,95±1,51                         | 1,13±1,29                         | 3,16±1,31                         | 1,43±1,07                         |
| BCF<br>(Hz)      | 37,05±8,49                        | 8,83±11,78                        | 38,95±9,11                        | 22,17±17,18                       |
| STR<br>(VSL/VAP) | 0,68±0,19                         | 0,41±0,34                         | 0,90±0,07                         | 0,87±0,09                         |
| WOB<br>(VAP/VCL) | 0,46±0,07                         | 0,24±0,19                         | 0,62±0,10                         | 0,69±0,15                         |
| LIN<br>(VSL/VCL) | 0,31±0,10                         | 0,14±0,13                         | 0,56±0,10                         | 0,60±0,16                         |

Analiza sezonieră a proporției subpopulațiilor de spermatozoizi poate ajuta la o mai bună definire a calității materialului seminal pe parcursul anului și poate avea un impact economic semnificativ, deoarece o evaluare mai completă a materialului seminal va conduce la îmbunătățirea producției de doze de înșămânțare artificială la animale (Martí și col., 2012).

Sezonul a arătat o influență clară asupra distribuției subpopulațiilor de spermatozoizi din materialul seminal de vier în cadrul acestui studiu (figura 8.3.).

Anotimpul de primăvară a fost caracterizat printr-o distribuție aproximativ uniformă, cu ponderea cam mai mare oferită de subgrupul 1 (28,3%) și cea mai mică de subgrupul 3 (22,2%). La limita superioară s-au remarcat subgrupurile 1 și 4, cu proporții aproximativ egale. Acest aspect este ușor surprinzător, ținând cont că cele două subgrupuri se situează la extreme opuse pentru aproape toți parametrii cinetici analizați.



**Figura 8.3.** Ponderea sezonieră a subpopulațiilor de spermatozoizi în sperma de vier

**Figure 8.3.** The share of each motile sperm subpopulation in boar semen according to the season

În timpul verii s-a observat o reducere în ponderea subgrupului 3, care a atins doar 16,5% și a subgrupului 1, care a ajuns la 23%, cu o diferență în minus de peste 5% față de iarnă (figura 8.3). În același timp, ponderea subgrupurilor 2 și 4 a crescut considerabil. Astfel, a scăzut procentul spermatozoidelor care s-au deplasat cu viteză și liniaritate superioare precum și a celor ce s-au deplasat cu o viteză mare și cu liniaritate inferioară, crescând procentul spermatozoidelor caracterizați de o liniaritate și viteză reduse precum și a celor caracterizați de o viteză mică dar liniaritate superioară. Cea mai mare pondere în sezonul estival a fost oferită de spermatozoizii lenți, dar liniari (31,4%). Reducerea numerică a spermatozoidelor din subgrupul 3 ar putea fi cauzată de temperaturile ridicate specifice verii. Într-un studiu anterior, s-a evidențiat că stressul caloric reduce proporția spermatozoidelor rapizi și liniari din sperma de iepuroi, crescând-o pe cea a spermatozoidelor mai lenți și cu o traiectorie mai puțin liniară (Maya-Soriano și col. 2015).

Anotimpul de toamnă nu a prezentat diferențe majore referitoare la distribuția subpopulațiilor mobile de spermatozoizi în comparație cu anotimpul precedent. Spermatozoizii rapizi și liniari au fost din nou cei mai puțini, cu doar 14,7%. Se remarcă o creștere a subgrupului 1, care tinde să egaleze în dimensiuni subgrupurile 2 și 4. Astfel, toamna s-a caracterizat printr-un procent redus de

spermatozoizi rapizi și liniari și proporții aproximativ egale a tuturor celorlalte categorii.

Sezonul rece a oferit o creștere substanțială a procentului de spermatozoizi având viteză de deplasare și coeficient de liniaritate ridicate (subgrupul 3) precum și o scădere considerabilă a procentului de spermatozoizi lenți și neliniari (subgrupul 2). În același timp a crescut numărul de spermatozoizi încadrați în subgrupul 1 (rapizi, non-liniari), atingând ponderea maximă în cadrul anotimpului (32,7%). Nu trebuie omisă reducerea subgrupului 4, care a înregistrat cea mai mică proporție (19%). Într-un alt studiu, creșterea proporției de spermatozoizi rapizi dar non-liniari a fost asociată cu adăugarea de progesteron în mediul de diluție și cu declanșarea reacției acrozomiale (Ramío și col., 2008).

La o analiză concomitentă a tuturor sezoanelor se poate observa că subpopulația spermatozoizilor rapizi și liniari, care teoretic prezintă cele mai mari șanse de a ajunge la locul fecundării în timp util a fost cel mai bine reprezentată în timpul iernii și cel mai slab în timpul toamnei și verii. Pe de altă parte, subgrupul spermatozoizilor lenți și non-liniari, care teoretic au șanse reduse de a ajunge în oviduct a fost mai numeros pe perioada toamnei și verii și mai puțin numeros în timpul primăverii și iernii. Reducerea proporției de spermatozoizi rapizi și liniari a fost asociată într-un alt studiu cu tulburările provocate de crioconservare (Dorado și col., 2011).

Așadar, dincolo de efectul asupra indicatorilor clasici de calitate ai materialului seminal, aspect deja acceptat pe larg, se pare că sezonul de recoltare influențează și distribuția subpopulațiilor de spermatozoizi. Dinamica sezonieră a subpopulațiilor de spermatozoizi a fost evidențiată și pentru sperma de berbec (Martí și col., 2012), țap (Abdelwahab și col., 2006) sau căprior (Martínez-Pastor și col., 2005). În literatura de specialitate nu au putut fi găsite însă alte studii privind modificările sezoniere ale subgrupurilor de spermatozoizi mobili din sperma diluată de vier.

Faptul că sezonul de recoltare modifică distribuția spermatozoizilor în cadrul subpopulațiilor mobile poate modifica percepția asupra variațiilor sezoniere ale parametrilor cinetici pentru sperma de vier. Într-un capitol anterior (capitolul 7) s-a arătat că anotimpul are un impact semnificativ asupra valorilor medii ale unor parametri precum viteza de deplasare sau liniaritatea/rectilinitatea traiectoriei spermatozoizilor. Astfel, modificările sezoniere ale parametrilor amintiți ar putea fi cauzate de modificarea numărului de spermatozoizi care se încadrează într-o subpopulație sau într-alta și nu de o scădere/creștere a valorilor pentru toți spermatozoizii ejaculați.

### **8.3. CONCLUZII PARȚIALE**

1. Materialul seminal analizat a fost caracterizat de prezența a patru subpopulații distincte de spermatozoizi, definite prin viteze de deplasare și uniformitate a traiectoriei diferite: subpopulația 1, cu viteză mare și liniaritate mică; subpopulația 2, cu viteză și liniaritate reduse; subpopulația 3, cu viteză și liniaritate superioare; subpopulația 4 cu viteză mică dar liniaritate ridicată.

2. Anotimpul de recoltare a avut o influență clară asupra distribuției de spermatozoizi în materialul seminal analizat.

3. Cu excepția sezonului rece, subpopulația spermatozozilor rapizi și liniari a fost cea mai slab reprezentată.

4. Cea mai mare variabilitate inter-sezonieră a fost oferită de subgrupul spermatozozilor lenți și cu traiectorie liniară.

5. Modificările sezoniere ale parametrilor amintiți ar putea fi cauzate de modificarea numărului de spermatozoizi care se încadrează într-o subpopulație sau într-alta și nu de o scădere/creștere a valorilor pentru toți spermatozoizii ejaculați.

**CAPITOLUL IX. FERTILITATEA SCROAFELOR ÎN RAPORT CU  
VALOAREA BIOLOGICĂ A MATERIALULUI SEMINAL  
CHAPTER IX. FERTILITY OF SOWS IN RELATION TO RAW SEMEN  
PARAMETERS**

Însămânțarea artificială la suine este utilizată în zilele noastre la scară largă de către fermieri, deoarece procedurile de colectare a materialului seminal, conservarea și transportul acestuia de la centrele de colectare la ferme s-au îmbunătățit semnificativ în ultimii 20 de ani, transformând însămânțarea artificială într-un proces eficient din punct de vedere al timpului de lucru precum și al utilizării vierilor la reproducție. Biotehnologiile de însămânțare artificială la scroafe îndepărtează dezavantajele montei naturale, contribuind la distribuirea mai eficace a resurselor genetice precum și la identificarea masculilor subfertili sau infertili.

Succesul procedurilor de însămânțare artificială la animale și inclusiv la scroafe depinde de o serie de factori, cum ar fi: calitatea materialului seminal, abilitatea personalului din fermă de a detecta estrul și îndemânarea în timpul însămânțării propriu-zise (Holt și col., 1997). Puterea de fertilizare a spermatozoizilor poate avea un impact economic major în cazul utilizării tehnicilor de însămânțare artificială (Gadea, 2005), iar înțelegerea corelațiilor dintre unele caracteristici ale spermatozoizilor, mai ales cele cinetice, poate ajuta la creșterea eficienței în ceea ce privește producția de material seminal (Didion, 2008).

În mod interesant, relația dintre mobilitatea spermatozoizilor și fertilitate este controversată, probabil din cauza condițiilor diferite în care s-au realizat diverse studii. Mobilitatea reprezintă unul dintre cei mai importanți parametri în cadrul examinării materialului seminal și ajută la eliminarea ejaculatelor de calitate inferioară (Gadea și col., 1998), însă unii autori atrag atenția că indicatorii calitativi uzuali ai materialului seminal nu oferă suficiente informații pentru a prezice fertilitatea unui vier (Pinart și Pigmulé, 2013).

Conform lui Parkinson (2001), dar și lui Gadea (2005), evaluarea unor parametri spermatici generali, cum ar fi volumul ejaculatului, concentrația, mobilitatea progresivă, viabilitatea și morfologia acrozomului reprezintă un instrument util în detectarea ejaculatelor cu o calitate necorespunzătoare pentru folosirea la însămânțarea artificială.

Scopul acestui studiu a fost de a estima efectul unor parametri ai materialului seminal de vier (volumul ejaculatului, concentrația la ejaculare, numărul total de

spermatozoizi/ejaculat, mobilitatea totală, mobilitatea progresivă) asupra celor mai importanți indicatori ai fertilității la scroafe: rata fătărilor și prolificitatea.

### **9.1. MATERIAL ȘI METODĂ**

#### **Unitatea și animalele**

Cercetările s-au efectuat într-o unitate comercială situată în nord-estul României, a cărei activitate o reprezintă creșterea și reproducția suinelor.

Perioada luată în calcul a fost de 12 de luni, cuprinsă între 27 martie 2013 și 26 martie 2014, perioadă ce corespunde fătărilor obținute după însămânțarea artificială cu material seminal recoltat între 1 decembrie 2012 și 30 noiembrie 2013. Studiul a inclus recoltarea materialului seminal de vier și examinarea lui, însămânțarea scroafelor cu materialul seminal ce a îndeplinit standardele de calitate și a fost conservat la temperatura de 17°C timp de maximum 3 zile și monitorizarea unor parametri ai fertilității: rata fătărilor, numărul total de purcei/parturiție, numărul de purcei vii/parturiție și numărul de purcei morți/parturiție. Deoarece în ferma în care s-a desfășurat studiul se practică heterospermia, fapt ce face imposibilă monitorizarea capacității de fertilizare a fiecărui ejaculat în parte, evaluarea indicilor de fertilitate s-a efectuat global, la nivelul întregii ferme, ținând cont de faptul că unitatea respectivă de reproducție suină reprezintă un sistem închis, în care scroafele sunt însămânțate doar cu material seminal produs în centrul propriu de recoltare și procesare.

Ejaculatele au provenit de la un număr de 31 de vieri din rasa Pietrain, cu vârste cuprinse între 8 luni și 2,5 ani.

#### **Recoltarea, examinarea și procesarea materialului seminal**

Recoltarea materialului seminal s-a realizat prin metoda masturbației, cu mânășă dublă (Bogdan, 1999, Ciornei, 2012), pe manechin, cu un interval de cel puțin 7 zile între două recoltări succesive de la același vier.

După recoltare, toate ejaculatele au fost preluate în laborator, pentru examinare. Examinarea materialului seminal a cuprins determinarea următorilor indicatori:

- Culoare, miros, aspect – prin examen organoleptic;
- Volum – cu ajutorul paharului gradat;
- Mobilitate totală (etapă inițială) – Cu ajutorul microscopului optic;
- Concentrație – cu ajutorul fotometrului ACCUCCEL (IMV Technologies, Franța) (figura 9.1);

- Mobilitate totală (a doua etapă), mobilitate progresivă, număr total de spermatozoizi din ejaculat, număr total de spermatozoizi mobili din ejaculat, număr total de spermatozoizi progresivi din ejaculat – cu ajutorul sistemului CASA (modelul CEROS II, IMV Technologies, Franța) (figura 9.2.).



**Figura 9.1.** Fotometrul ACCUCELL utilizat la determinarea concentrației materialului seminal

**Figure 9.1.** ACCUCELL photometer used for calculating sperm concentration during study



**Figura 9.2.** Sistemul CASA utilizat la examinarea calitativă a materialului seminal

**Figure 9.2.** CASA system used for sperm examination during study

Mobilitatea totală s-a determinat în două etape. În prima etapă s-a utilizat metoda clasică, folosind microscopul optic, efectuată pentru a putea îndepărta imediat ejaculatele cu mobilitate totală mai mică de 60%. A doua etapă a utilizat sistemul CASA și a fost efectuată pentru a determina valoarea exactă a mobilității totale, precum și alți parametri seminali.

Ejaculatele ce au îndeplinit standardul de calitate au fost diluate cu diluantul MR-A (Kubus SA, Las Rozas-Madrid, Spania), după care au fost ambalate automat (figura 9.3.) în doze de înșămânțare artificială (figura 9.4.), menținute la 17°C până la utilizare.



**Figura 9.3.** Ambalarea automată a dozelor de IA

**Figure 9.3.** Automatic packing of swine AI doses



**Figura 9.4.** Doză de IA pentru scroafe

**Figure 9.4.** Swine AI dose

Doar ejaculatele cu cel puțin 60% mobilitate totală au fost înregistrate și procesate, celelalte fiind eliminate.

Datele obținute în urma examinării au fost procesate cu ajutorul programul Microsoft Office (Excel) și a programului de interpretare statistică IBM SPSS® Statistics, versiunea 21 (IBM® Corporation, Chicago, IL, SUA).

### Însămânțarea artificială

Pentru operațiunea de însămânțare artificială a scroafelor s-a folosit metoda endocervicală (clasică) care presupune depunerea materialului seminal la nivelul cervixului (Ciornei, 2012) (fig. 9.5.)



**Figura 9.5.** Însămânțarea artificială a scroafelor: introducerea cateterului de însămânțare (A) și depunerea materialului seminal (B)

**Figure 9.5.** Artificial insemination of sows: cathether intromission (A) and semen inoculation (B)

Însămânțarea s-a efectuat prin utilizarea a două sau trei doze de însămânțare (în funcție de persistența reflexului de imobilitate față de om), la interval de 12 ore.

## 9.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul acestui studiu, s-au luat în considerare rata fătărilor, numărul total de purcei/parturiție, numărul de purcei vii/parturiție și numărul de purcei morți/parturiție la scroafele ce au fătat în perioada 27 martie 2013 – 26 martie 2014, ceea ce corespunde însămânțărilor artificiale cu materialul seminal recoltat în perioada decembrie 2012 – noiembrie 2013 (tabelul 9.1.).

**Tabelul 9.1./Table 9.1.**

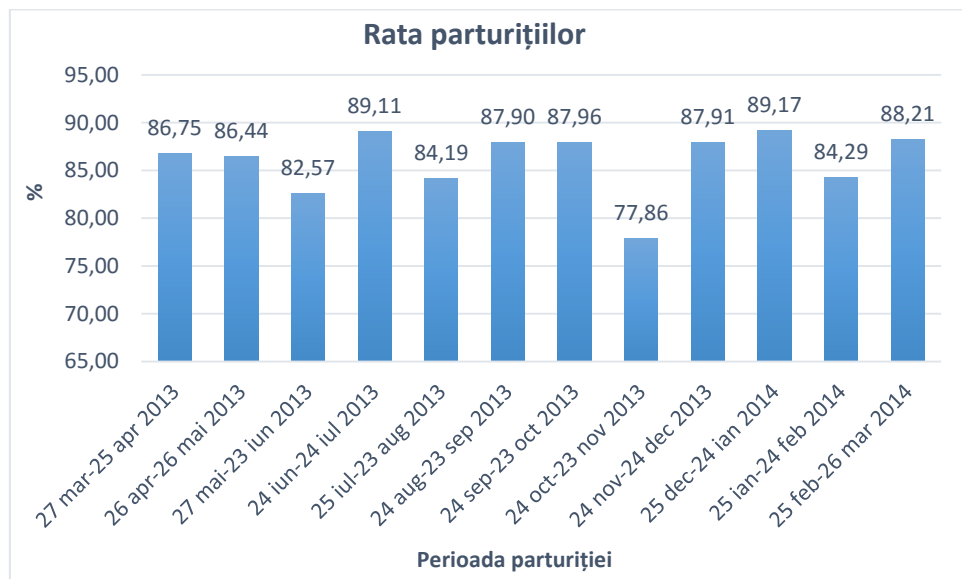
Intervalul fătărilor la scroafe, în concordanță cu intervalul recoltărilor materialului seminal și al însămânțărilor artificiale  
The period of sow farrowing, according to the time of artificial insemination

| Perioada însămânțării | Perioada fătării   |
|-----------------------|--------------------|
| Decembrie 2012        | 27 mar-25 apr 2013 |
| Ianuarie 2013         | 26 apr-26 mai 2013 |
| Februarie 2013        | 27 mai-23 iun 2013 |
| Martie 2013           | 24 iun-24 iul 2013 |
| Aprilie 2013          | 25 iul-23 aug 2013 |
| Mai. 2013             | 24 aug-23 sep 2013 |
| Iunie 2013            | 24 sep-23 oct 2013 |
| Iulie 2013            | 24 oct-23 nov 2013 |
| August 2013           | 24 nov-24 dec 2013 |
| Septembrie 2013       | 25 dec-24 ian 2014 |
| Octombrie 2013        | 25 ian-24 feb 2014 |
| Noiembrie 2013        | 25 feb-26 mar 2014 |

Din totalul celor 6 970 însămânțări artificiale efectuate, au rezultat 5 981 parturiții, cu un număr total de 79 021 purcei, din care 73 762 purcei vii și 5 259 purcei morți.

### 9.2.1. Evoluția ratei parturițiilor și corelațiile cu parametrii seminali

Rata parturițiilor a variat între 77,86% în perioada 24 octombrie 2013-23 noiembrie 2013 și respectiv 89,17% în perioada 25 decembrie 2013-24 ianuarie 2014 (figura 9.6.). Astfel, cea mai mică rată a parturițiilor a corespuns însămânțărilor cu material seminal recoltat în luna iulie, în timp ce rata cea mai mare a fost obținută după însămânțări cu material seminal recoltat în luna septembrie 2013.



**Figura 9.6.** Evoluția lunară a ratei parturițiilor la scroafe

**Figure 9.6.** Monthly variation of farrowing rate in sows

Cea mai mică rată a parturițiilor a fost obținută după însămânțare cu material seminal din luna în care s-au înregistrat cele mai mici valori pentru mobilitatea totală a spermatozoizilor și valori apropiate de minim pentru mobilitatea progresivă (tabelul 9.2.), ceea ce este în concordanță cu afirmațiile unor autori, conform cărora utilizarea unor ejaculate cu mobilitate redusă duce la obținerea unor indici reduși de fertilitate (Flowers, 1997). În mod surprinzător însă, cea mai mare rată a parturițiilor a fost obținută de asemenea după însămânțări cu material seminal din ejaculate cu mobilitate redusă dar și cu un volum mai mic (tabelul 9.2.).

**Tabelul 9.2./Table 9.2.**

Mediile lunare pentru principalii parametri seminali ai ejaculatelor utilizate la  
însămânțarea scroafelor

Monthly mean values for the main parameters of ejaculates used for AI in  
SOWS

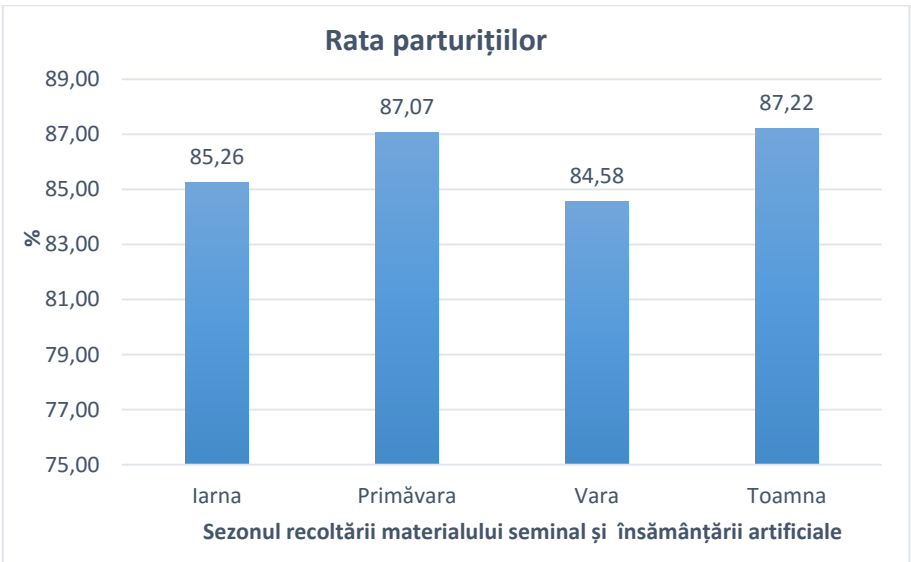
| Perioada<br>recoltării și<br>însămânțării | Volum<br>(ml) | Conc.<br>( $\times 10^6$ /ml) | TS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | TMot<br>(%) | TMS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) | PMot<br>(%) | TPS/Ej.<br>( $\times 10^9$ ) |
|-------------------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------------------------|
| dec.12                                    | 167,68        | 449,27                        | 72,84                       | 86,76       | 63,20                        | 58,32       | 42,69                        |
| ian.13                                    | 170,69        | 488,25                        | 77,91                       | 89,50       | 69,80                        | 63,58       | 49,54                        |
| feb.13                                    | 157,22        | 467,49                        | 71,70                       | 87,67       | 62,94                        | 63,22       | 45,18                        |
| mar.13                                    | 177,58        | 491,65                        | 85,29                       | 86,26       | 73,36                        | 61,32       | 52,02                        |
| apr.13                                    | 197,96        | 454,48                        | 85,99                       | 84,35       | 72,90                        | 49,00       | 42,58                        |
| mai.13                                    | 205,91        | 462,10                        | 92,36                       | 84,97       | 78,57                        | 55,39       | 51,66                        |
| iun.13                                    | 222,48        | 499,62                        | 107,58                      | 82,59       | 89,10                        | 54,48       | 58,99                        |
| iul.13                                    | 222,24        | 419,59                        | 89,49                       | 80,66       | 72,76                        | 49,24       | 44,79                        |
| aug.13                                    | 211,86        | 456,14                        | 93,21                       | 84,11       | 78,90                        | 59,17       | 56,20                        |
| sept.13                                   | 149,50        | 537,61                        | 75,12                       | 80,90       | 61,86                        | 52,40       | 40,36                        |
| oct.13                                    | 152,50        | 589,22                        | 87,40                       | 83,50       | 73,71                        | 51,14       | 43,35                        |
| nov.13                                    | 167,50        | 600,40                        | 95,08                       | 86,55       | 82,29                        | 53,36       | 50,29                        |

Conc.: concentrație în spermatozoizi; TS/Ej.: număr total de spermatozoizi din ejaculat; TMot: mobilitate totală; TMS/Ej.: număr total de spermatozoizi cu orice tip de mobilitate din ejaculat; PMot: mobilitate progresivă; TPS/Ej.: număr total de spermatozoizi cu mobilitate progresivă din ejaculat.

La o analiză sezonieră, se poate observa că rata parturițiilor a înregistrat valori mai mari după însămânțarea cu spermă recoltată în timpul toamnei (87,22%) (figura 9.7.), cu diferențe semnificative față de valorile obținute cu ejaculate din timpul verii și iernii ( $p < 0,05$ ), dar nesemnificative față de cele cu ejaculate din timpul primăverii ( $p > 0,05$ ). Pe de altă parte, cea mai mică rata a parturițiilor au oferit-o ejaculatele din timpul verii (84,58%), cu diferențe semnificative față de toate celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ).

Interesant este că cea mai ridicată rată a parturițiilor a fost oferită de sezonul în care ejaculatele au avut în medie cel mai mic volum (tabelul 7.10 din cap 7.2), cea mai mare concentrație (tabelul 7.11 din cap 7.2), cel mai mic procent al mobilității progresive (tabelul 7.13 din cap 7.2) și cel mai mic număr de spermatozoizi cu mobilitate progresivă (tabelul 7.14 din cap 7.2). Pe de altă

parte, sezonul în care ejaculatele au avut în medie cea mai redusă mobilitate totală (vara) a corespuns celei mai mici rate a parturițiilor.



**Figura 9.7.** Rata parturițiilor în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale

**Figure 9.7.** Farrowing rate according to the season of semen collection and AI

De asemenea, se remarcă faptul că la cele două extreme în ceea ce privește rata parturițiilor se află două sezoane ce nu au înregistrat diferențe semnificative cu privire la principalul parametru calitativ al spermei, mai exact mobilitatea spermatozoizilor (tabelul 7.13. din cap 7.2). Acest aspect reflectă corelația slabă între mobilitatea totală a spermatozoizilor și rata fătărilor, fapt indicat de altfel și de analiza Pearson (tabelul 9.3.).

**Tabelul 9.3./Table 9.3.**

Corelații între rata parturițiilor la scroafe și parametrii materialului seminal brut  
Correlations between farrowing rate in sows and the main parameters of raw semen

|                    | Volum   | Conc.  | TS/Ej. | TMot | TMS/Ej. | PMot   | TPS/Ej. |
|--------------------|---------|--------|--------|------|---------|--------|---------|
| Rata Parturițiilor | -0,13** | 0,16** | 0,04   | 0,09 | 0,06    | 0,16** | 0,13**  |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

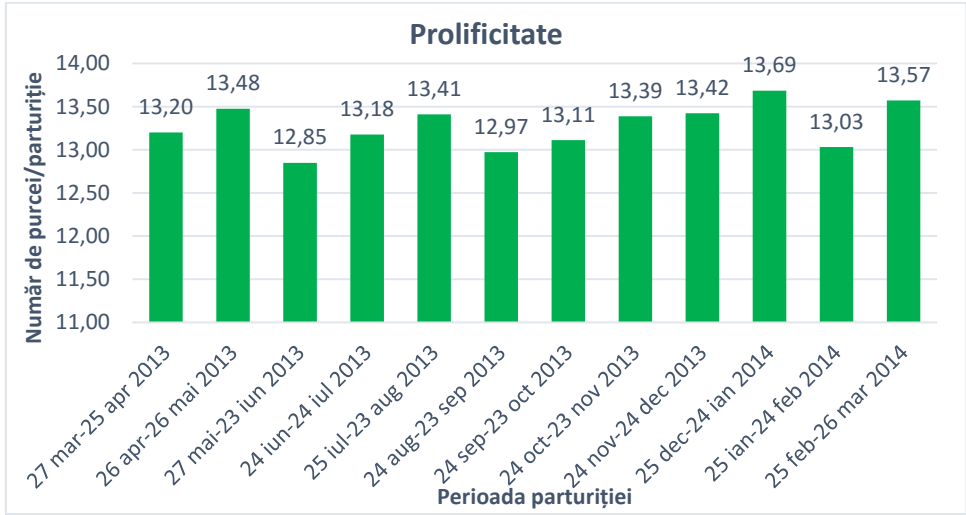
\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Analiza Pearson a identificat trei corelații semnificative între rata parturițiilor și parametrii ejaculatului, mai exact negativă cu volumul și pozitive cu mobilitatea progresivă și concentrația. Rezultatele sugerează că un volum ridicat al ejaculatului poate reflecta o calitate mai scăzută a acestuia, în timp ce ejaculatele mai concentrate și cu o mobilitate progresivă superioară ajută la obținerea unui număr mai mare de parturiții. Rezultatele sunt în concordanță cu cele ale lui Park (2013) care a observat că la valori mari ale volumului ejaculat, rata fătărilor a scăzut semnificativ. Nu trebuie neglijate totuși valorile efective reduse ale corelațiilor ( $r = -0,13$ ;  $r = 0,16$  și  $r = 0,13$ ) ceea ce indică valoarea predictivă scăzută a parametrilor amintiți. De exemplu, în ceea ce privește mobilitatea, spermatozoizii pot fi lipsiți de capacitatea fecundantă deși sunt mobili, aspect menționat și de alți autori (Johnson și col., 2000). Deși mobilitatea reprezintă în continuare principalul criteriu de evaluare calitativă în centrele de producție a materialului seminal de vier, mai multe studii semnaleză absența corelațiilor între acest parametru și fertilitate la suine (Quintero-Moreno și col., 2004; Sancho și col., 2006). În aceste condiții, mobilitatea spermatozoizilor reprezintă mai degrabă un parametru ce elimină ejaculatele cu potențial redus de fertilizare (dacă se află sub o anumită valoare), fără a putea însă asigura selectarea doar a ejaculatelor de calitate foarte bună.

### **9.2.2. Evoluția prolificității și corelațiile cu parametrii seminali**

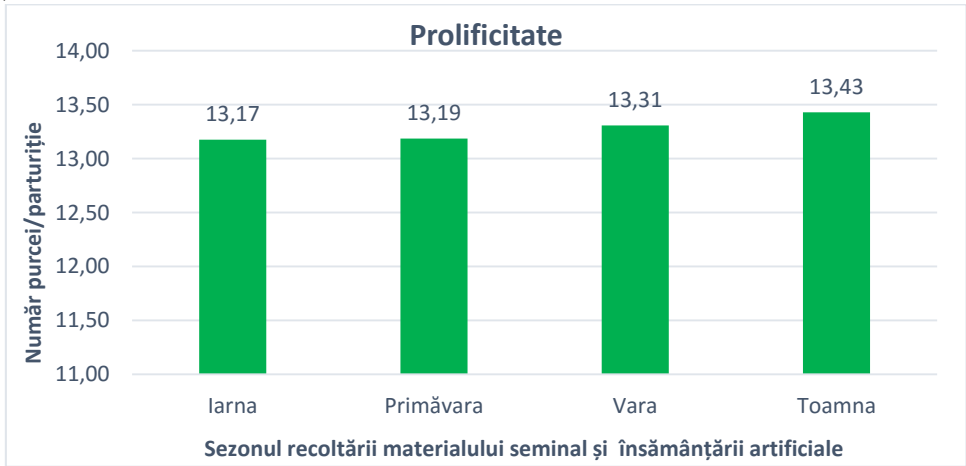
Prolificitatea a variat între 12,85 purcei/parturiție în perioada 27 mai-23 iunie 2013 și respectiv 13,69 purcei/parturiție în perioada 25 decembrie 2013-24 ianuarie 2014 (figura 9.8.). Astfel, cea mai mică prolificitate a corespuns înșămânțărilor cu material seminal recoltat în luna februarie, în timp ce prolificitatea cea mai mare a fost obținută după înșămânțări cu material seminal recoltat în luna septembrie.

De remarcat că cea mai bună prolificitate a coincis ca perioadă cu cea mai bună rată a fătărilor și, ca și aceasta, a fost obținută după înșămânțări cu material seminal din ejaculate cu mobilitate redusă dar și cu un volum mai mic (tabelul 9.2.). Pe de altă parte, cea mai mică prolificitate a fost obținută după înșămânțare cu material seminal din luna în care s-au înregistrat cele mai mici valori pentru numărul total de spermatozoizi (tabelul 9.2.).



**Figura 9.8.** Evoluția lunară a prolificității la scroafe  
**Figure 9.8.** Monthly variation of litter size in sows

Analiza sezonieră relevă faptul că ejaculatele recoltate toamna au oferit cea mai mare prolificitate (figura 9.9.), cu diferențe semnificative față de celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ). La polul opus se află ejaculatele recoltate iarna, cu diferențe semnificative față de ejaculatele din timpul verii și toamnei ( $p < 0,05$ ), nu însă și față de cele din timpul primăverii.



**Figura 9.9.** Prolificitatea în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale  
**Figure 9.9.** Litter size according to the season of semen collection and AI

Sezonul în care ejaculatele au avut în medie cel mai mic volum, cea mai mare concentrație, cel mai redus procent al mobilității progresive și cel mai mic

număr de spermatozoizi cu mișcări progresive, a oferit din nou cea mai bună fertilitate, de această dată prin prisma numărului de purcei/parturiție. Spre deosebire de rata fătărilor însă, cea mai slabă prolificitate a fost obținută cu ejaculatele din timpul iernii, sezon în care s-au înregistrat cel mai mic număr de spermatozoizi/ejaculat și cel mai mic număr de spermatozoizi mobili din ejaculat.

La o primă vedere s-ar putea afirma că există o corelație negativă între volumul ejaculatului și prolificitatea pe care acesta o va produce, aspect sugerat de altfel și de un alt studiu (Park, 2013), însă, conform analizei Pearson, această corelație este nesemnificativă (tabelul 9.4.).

**Tabelul 9.4./Table 9.4.**

Corelații între prolificitatea la scroafe și parametrii materialului seminal brut  
Correlations between litter size in sows and the main parameters of raw semen

|               | Volum | Conc. | TS/Ej. | TMot  | TMS/Ej. | PMot   | TPS/Ej. |
|---------------|-------|-------|--------|-------|---------|--------|---------|
| Prolificitate | -0,02 | 0,06  | -0,02  | -0,07 | -0,03   | -0,12* | -0,06   |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

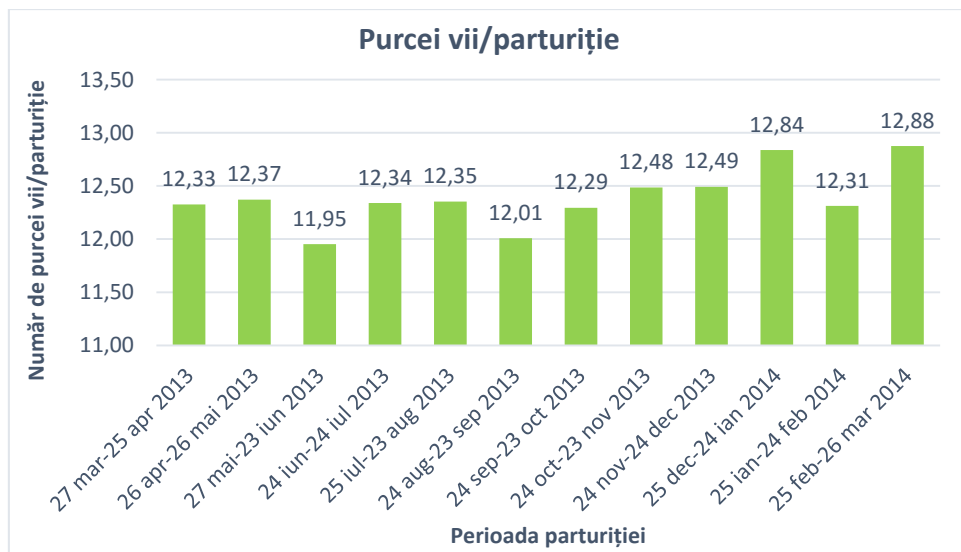
Analiza Pearson a depistat o singură corelație semnificativă a prolificității cu parametrii materialului seminal brut, mai exact una slab negativă cu procentul mobilității progresive. Rezultatul este unul surprinzător, deoarece sugerează că un număr mai mare de spermatozoizi cu mișcări evidente de înaintare va duce la fertilizarea unui număr mai mic de ovocite, ceea ce contrazice unul dintre principiile de bază ale fertilității materialului seminal, conform căruia un număr mare de spermatozoizi mobili este absolut necesar fecundării (Runceanu și col., 2007). Mobilitatea progresivă a spermatozoidelor este indicatorul unui metabolism nealterat și a unei membrane întregre, iar estimarea sa prezintă astfel o importanță fundamentală în controlul calitativ al spermei (Johnson și col., 2000). Pe de altă parte, nu trebuie omisă valoarea mică a corelației ( $r=0,12$ ) obținute în acest studiu.

O explicație posibilă a lipsei corelațiilor pozitive între procentele mobilității și indicii de fertilitate ar fi că efectele pozitive ale unui procent mai mare de spermatozoizi mobili sunt vizibile numai până la un anumit prag, peste care acest parametru nu mai influențează indicii de fertilitate ai scroafelor. De exemplu, Park (2013) demonstrează că o creștere a mobilității totale de la 30% la 70% aduce cu sine îmbunătățiri semnificative ale ratei fătărilor, însă pe de altă parte unele studii arată că dacă procentul mobilității este mai mare de 60%, nu mai există corelații între acest parametru și rata de penetrare in-vitro, rata

parturițiilor și prolificitate (Flowers, 1997). În același timp, unii autori menționează că întreg examenul general al materialului seminal nu are capacitatea de a prezice puterea acestuia de a fertiliza, fiind capabil doar să detecteze ejaculatele cu o calitate slabă evidentă (Gadea și col., 2004; Gadea, 2005). De asemenea, Didion (2008) susține că deși înțelegerea corelațiilor între parametrii cinetici ai spermei și capacitatea de fecundare ar îmbunătăți eficiența unităților de producție, totuși o perspectivă realistă vizează mai degrabă identificarea vierilor și ejaculatelor cu fertilitate foarte scăzută decât pe a celor cu fertilitate foarte bună.

### 9.2.3. Evoluția numărului de purcei vii/parturiție și corelațiile cu parametrii seminali

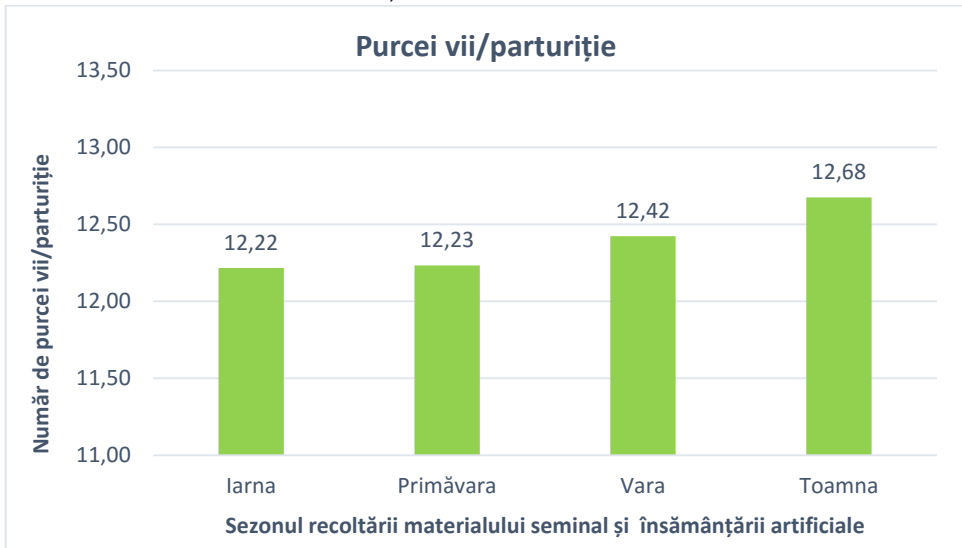
Numărul de purcei vii/parturiție a variat între 11,95 în perioada 27 mai-23 iunie și respectiv 12,88 în perioada 25 februarie-26 martie (figura 9.10). După cum era de așteptat, perioadele cu prolificitate superioară/inferioară au corespuns cu perioadele cu valori superioare/inferioare pentru numărul de purcei vii/parturiție, cei doi parametri aflându-se în strânsă legătură. De remarcat totuși că cel mai mare număr de purcei vii/parturiție a fost obținut după însămânțare cu spermă din ejaculate cu cea mai mare concentrație în spermatozoizi (recoltate în noiembrie 2013).



**Figura 9.10** Evoluția lunară a numărului de purcei vii/parturiție la scroafe

**Figure 9.10.** Monthly variation of the number of live piglets/parturition in SOWS

Analiza sezonieră a acestui parametru a relevat un comportament identic al acestui parametru cu cel al prolificității: valori superioare oferite de ejaculatele din timpul toamnei (figura 9.11.), cu diferențe semnificativ  $p < 0,05$  față de celelalte sezoane, în timp ce la polul opus s-au situat ejaculatele obținute în timpul iernii și primăverii, fără diferențe semnificative între ele. Ejaculatele din timpul verii s-au situat pe o poziție intermediară.



**Figura 9.11.** Numărul de purcei vii/parturiție în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale

**Figure 9.11.** The number of live piglets/parturition in sows according to the season of semen collection and AI

În ceea ce privește corelațiile acestui indicator de fertilitate cu parametrii seminali, analiza Pearson a detectat o corelație pozitivă cu valoarea concentrației ejaculatului în spermatozoizi ( $r=0,16$ ;  $p < 0,01$ ) (tabelul 9.5.). Aceasta este în concordanță cu aspectul remarcat mai sus, și anume că ejaculatele recoltate în luna noiembrie 2013, luna în care s-a înregistrat cea mai mare valoare medie a concentrației, au dus la obținerea celui mai mare număr de purcei vii/fătare. O concentrație mai ridicată într-un ejaculat indică o cantitate mai mică de plasmă seminală ce revine fiecărui spermatozoid și efectuarea unei diluții la un raport mai ridicat în cadrul prelucrării. Astfel, corelația detectată ar putea sugera că mediul sintetic de diluție utilizat la prelucrarea materialului seminal protejează capacitatea de fertilizare a spermatozozilor mai bine decât o face mediul natural, în speță plasma seminală. Acest aspect este surprinzător, fiind bine cunoscut că plasma seminală conține o serie de proteine implicate în unele etape esențiale ce precedă fertilizarea, printre care capacitatea,

constituirea de rezervei de spermatozoizi în oviduct, transportul spermatozoizilor în tractusul genital femel, interacțiunea și fuziunea gameților (Setchell, 2014). De asemenea, unii autori au arătat că incubarea spermatozoizilor după congelare în 50% plasmă seminală le îmbunătățește capacitatea fecundantă (Garcia și col., 2010). Pe de altă parte, efectele negative ale prezenței plasmei seminale în cantitate ridicată în doza de IA asupra fertilității au fost menționate și în alte studii (Johnson și col., 2000), iar alți autori au arătat că spermatozoizii rezistă mai bine conservării prin congelare dacă se recoltează doar fracțiunea bogată în spermatozoizi, așadar mai concentrată, decât dacă se recoltează întreg ejaculatul (Alkmin și col., 2014). Din plasma seminală, se pare că secreția glandelor veziculare prezintă efecte adverse asupra spermatozoizilor, afectându-le mobilitatea și viabilitatea (Gorog și col., 2013).

**Tabelul 9.5./Table 9.5.**

Corelații între numărul de purcei vii/parturiție la scroafe și parametrii materialului seminal brut

Correlations between the number of live piglets/parturition in sows and the main parameters of raw semen

|                                | Volum | Conc.  | TS/Ej. | TMot   | TMS/Ej. | PMot    | TPS/Ej. |
|--------------------------------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Număr de purcei vii/parturiție | -0,07 | 0,16** | 0,03   | -0,12* | 0,00    | -0,14** | -0,05   |

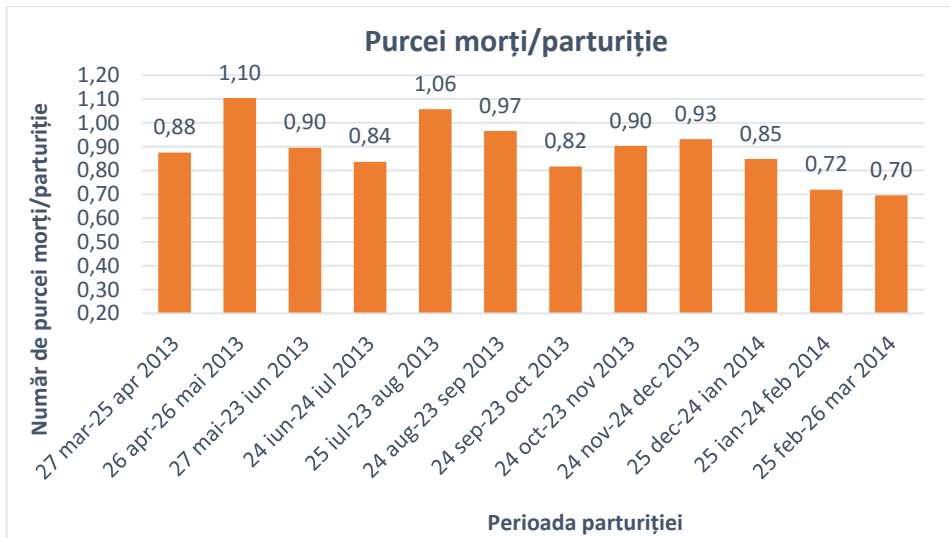
\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Sunt dificil de explicat corelațiile negative detectate între numărul de purcei vii/parturiție și mobilitatea spermatozoizilor, atât cea totală cât și cea progresivă (tabelul 9.5.), aspect ce contrazice rezultatele altor studii (Gorog și col., 2013). Teoretic, un procent mai mare de spermatozoizi mobili reflectă o calitate mai bună a ejaculatului, cu un număr mai mare de spermatozoizi ce pot atinge situsul fecundării. În literatura de specialitate mai există raportări ale unor corelații ciudate oferite de procentul mobilității, de exemplu pozitive cu numărul de purcei morți/parturiție (Park, 2013), însă nu au mai fost depistate mențiuni ale unei corelații negative cu numărul de purcei vii/parturiție. Nu trebuie neglijate valorile mici ale corelațiilor ( $r = -0,12$  pentru TMot și respectiv  $r = -0,14$  pentru PMot), însă rezultatul rămâne unul surprinzător și dificil de explicat.

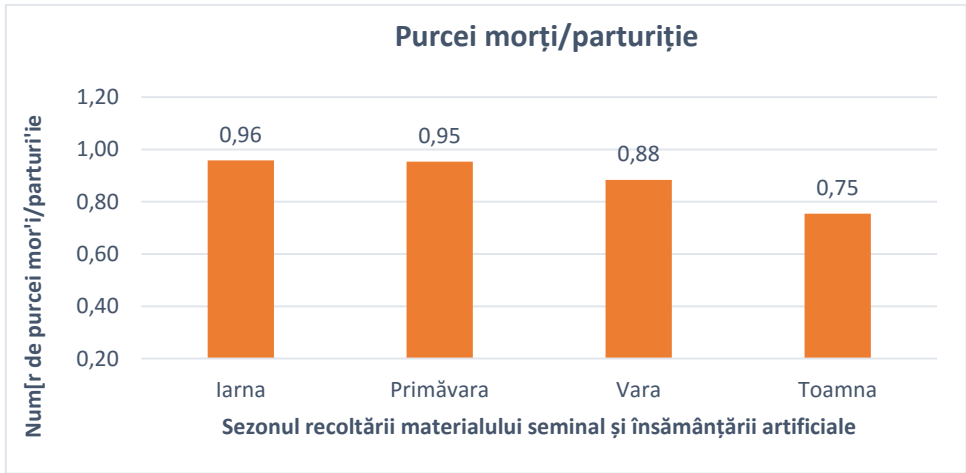
#### 9.2.4. Evoluția numărului de purcei morți/parturiție și corelațiile cu parametrii seminali

Deși nedorită, fătarea de produși de concepție morți reprezintă un aspect obișnuit la suine, mai ales în condițiile creșterii intensive. Parametru ce reflectă incapacitatea unor produși de concepție de a supraviețui în timpul gestației, numărul de purcei morți/parturiție a cunoscut în acest studiu valori maxime în perioada 26 aprilie-26 mai 2013 (1,1) și valori minime în perioada 25 februarie-26 martie 2014 (0,7) (figura 9.12.). Interesant este că perioada de minim a acestui parametru a coincis cu perioada de maxim a numărului de purcei vii/parturiție, însă perioada sa de maxim nu a coincis cu perioada de minim a numărului de purcei vii/parturiție, semn că între cei doi parametri nu există o corelație strictă.



**Figura 9.12.** Evoluția lunară a numărului de purcei morți/parturiție la scroafe  
**Figure 9.12.** Monthly variation of the number of stillborn/parturition in sows

Din punct de vedere sezonier, cele mai mari valori au fost obținute după utilizarea ejaculatele recoltate iarna și primăvara (figura 9.13.), fără diferențe semnificative între cele două sezoane ( $p > 0,05$ ), iar la polul opus s-au situat ejaculatele recoltate în timpul toamnei, cu diferențe semnificative față de celelalte sezoane ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.13.** Numărul de purcei vii/parturiție la scroafe în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale

**Figure 9.13.** The number of stillborn/parturition in sows according to the season of semen collection and AI

Se remarcă un comportament invers față de cel al numărului de purcei vii/parturiție, ceea ce ar putea sugera o corelație negativă între cei doi parametri. Într-adevăr, analiza Pearson a detectat o corelație moderată, negativă (tabelul 9.7.). În mod logic, cu cât numărul purceilor care mor crește, cu atât numărul purceilor care rămân în viață scade. Nu trebuie omis însă că ambii parametri sunt reglați de către prolificitate, care prin variațiile sale poate face ca uneori atât numărul de purcei vii cât și cel de purcei morți să aibă valori mari (sau mici) în același timp. Așa se explică de ce corelația este moderată și nu puternică.

În ceea ce privește corelațiile cu parametrii seminali, s-au detectat una slab pozitivă cu volumul ejaculatului și una slab negativă cu valoarea concentrației (tabelul 9.6.).

**Tabelul 9.6./Table 9.6.**

Corelații între numărul de purcei morți/parturiție la scroafe și parametrii materialului seminal brut

Correlations between the number of stillborn/parturition in sows and the main parameters of raw semen

|                                  | Volum | Conc.   | TS/Ej. | TMot | TMS/Ej. | PMot | TPS/Ej. |
|----------------------------------|-------|---------|--------|------|---------|------|---------|
| Număr de purcei morți/parturiție | 0,11* | -0,22** | -0,10  | 0,10 | -0,07   | 0,06 | -0,03   |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

Acest studiu a evidențiat și o serie de corelații între principalii indicatori ai fertilității la scroafe. Pe lângă cea discutată puțin mai sus, analiza Pearson a detectat și o corelație puternică, pozitivă, între numărul de purcei vii/parturiție și prolificitate (tabelul 9.7.), aspect care era de altfel de așteptat. Se mai observă și o corelație pozitivă, dar slabă a prolificității cu numărul de purcei morți pe parturiție. De asemenea, rata parturițiilor a corelat pozitiv cu numărul de purcei vii/parturiție și negativ cu numărul de purcei morți pe parturiție. Nu a fost depistată o corelație între rata parturițiilor și prolificitate, ceea ce sugerează că un ejaculat cu o capacitate foarte bună de fecundare, ce are șanse foarte mari de a fertiliza, nu asigură neapărat și un număr mai mare de produși de concepție. Acest aspect este de altfel ușor de explicat, ținând cont că prolificitatea este dependentă în primul rând de numărul de ovocite eliberate de femelă.

**Tabelul 9.7./Table 9.7.**

Corelații între principalii indicatori ai fertilității la scroafe  
Correlations among the main indicators of sow fertility

|                            | Rata<br>Parturițiilor | Prolificitate | Purcei<br>vii/parturiție | Purcei<br>morți/parturiție |
|----------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|----------------------------|
| Rata Parturițiilor         | 1                     | 0,10          | 0,17**                   | -0,17**                    |
| Prolificitate              | 0,10                  | 1             | ,89**                    | 0,17**                     |
| Purcei vii/parturiție      | 0,17**                | 0,89**        | 1                        | -0,31**                    |
| Purcei<br>morți/parturiție | -0,17**               | 0,17**        | -0,31**                  | 1                          |

\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.05 (2-tailed)

\*\*. Corelația este semnificativă la pragul 0.01 (2-tailed)

### 9.3. CONCLUZII PARȚIALE

Prin analiza rezultatelor obținute, se pot nota următoarele concluzii:

1. În acest studiu s-au obținut, procentual, mai multe fătări după însămânțările din timpul toamnei și primăverii, fără diferențe semnificative între cele două sezoane.

2. Au fost observate doar unele corelații slabe între parametrii materialului seminal brut și principalii indicatori de fertilitate ai scroafei.

3. Rezultatele întăresc concluziile unor alte studii recente, conform cărora examenul general al spermei nu poate fi folosit ca un instrument pentru a prezice capacitatea de fecundare a unui ejaculat. El ajută la eliminarea unor ejaculate de o calitate în mod cert scăzută, însă nu poate garanta selectarea doar a ejaculatelor de calitate superioară. Astfel, succesul însămânțării

artificiale depinde într-o mare măsură și de alți parametri seminali, ce nu sunt determinați uzual precum și de unii factori de fertilitate ai femelelor.

4. Dintre corelațiile detectate, se remarcă cele ale concentrației ejaculatului, mai exact corelație slab pozitivă cu rata parturițiilor, slab pozitivă cu numărul de purcei vii/parturiție și slab negativă cu numărul de purcei morți/parturiție. Acestea sugerează că o concentrație mai mică a ejaculatului, respectiv o cantitate mai mare de plasmă seminală ce revine fiecărui spermatozoid poate avea urmări nefavorabile asupra capacității sale fecundante.

5. Mobilitatea spermatozoizilor are un impact major asupra fecundării, însă selectarea pentru IA doar a ejaculatelor cu mobilitate ridicată a redus variabilitatea rezultatelor și impactul acestui parametru asupra indicilor de fertilitate, în condițiile date. În acest studiu, ejaculatele au avut minim 60% mobilitate totală. Studiul nu exclude corelațiile între indicatorii de fertilitate la scroafe și mobilitatea spermatozoizilor sub această valoare.

6. Valoarea prolificității și numărul mediu de purcei vii/parturiție se află în strânsă legătură, fiind corelate puternic pozitiv. Pe de altă parte, numărul de purcei morți/parturiție este corelat doar slab pozitiv cu prolificitatea. Astfel, fățarea unui număr total de purcei mai mare crește foarte mult probabilitatea obținerii unui număr mai mare de purcei vii, dar nu neapărat și riscul de a obține mai mulți purcei morți.

7. Ejaculatele cu o capacitate fecundantă foarte bună, cu o probabilitate mare de a induce gestația nu asigură și obținerea unui număr mai mare de produși de concepție, aspect sugerat de lipsa corelațiilor între rata parturițiilor și prolificitate.

8. Deși ejaculatele recoltate în timpul verii au oferit o rată a fățărilor mai scăzută, diferențele față de ejaculatele din timpul iernii nu au fost semnificative. De asemenea, materialul seminal recoltat vara a determinat o prolificitate foarte bună, superioară prolificității determinate de materialul seminal din timpul iernii și primăverii. Aceste aspecte conduc către concluzia că standardizarea condițiilor de întreținere reprezintă o posibilă soluție pentru combaterea „infertilității de sezon” descrisă anterior la suine.

## CAPITOLUL X. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Rezultatele oferite de sistemul CASA la examinarea materialului seminal diluat de vier sunt influențate într-o măsură apreciabilă de tipul de cameră folosit la analiză.

2. În acest studiu camerele Leja și Minitube au oferit valori foarte apropiate, în timp ce camera MofA a oferit valori semnificativ mai mici. Sunt necesare studii suplimentare asupra camerei de analiză MofA, pentru a confirma sau infirma efectul negativ exercitat asupra parametrilor cinetici ai materialului seminal și pentru a determina dacă acesta se datorează unor factori chimici sau mecanici. De asemenea, se recomandă efectuarea unui studiu și pe material seminal provenit de la alte specii, fiind cunoscută sensibilitatea mai mare a spermatozoizilor de vier.

3. A fost observată o subestimare semnificativă între concentrația determinată cu ajutorul CASA și cea obținută cu metodele de referință.

4. Diluantul pe termen lung folosit în cadrul acestor cercetări (Sinus DiluPorc™) pare să furnizeze rezultate puțin mai bune în cazul depozitării materialului seminal pentru o perioadă mai îndelungată comparativ cu diluantul pe termen scurt (BTS®); totuși se pare că ambii diluanți studiați sunt eficienți în vederea conservării în stare lichidă până la șapte zile, la 17°C, fără diferențe majore în ceea ce privește parametrii cinetici.

5. Din păcate parametrii determinați în cadrul examenului general al spermei brute prezintă o valoare de predicție redusă asupra parametrilor spermei prelucrate și conservate timp de trei zile la 17°C. Doar corelații slabe sau moderate au fost identificate, care au însă o valoare prea mică pentru a sta la baza unei concluzii certe. Cele mai multe dintre corelațiile observate ar putea sugera că o densitate mai mare a materialului seminal brut și o rată mai intensă a producției de spermatozoizi vor determina spermatozoizii să se deplaseze mai repede dar și mai neregulat după conservare.

6. Deși ambele tipuri de recipiente utilizate în acest studiu pentru conservarea materialului seminal de vier s-au dovedit eficiente, menținând principalii parametrii cinetici între valori acceptabile, se pare că tubul umplut și închis automat protejează mai bine mobilitatea spermatozoizilor.

7. În cazul cazării în condiții uzuale de microclimat, s-a observat o variație sezonieră clară, pentru toți parametrii evaluați. Volumul ejaculatului a fost superior în timpul toamnei, concentrația în spermatozoizi a ejaculatului a fost superioară în timpul iernii, numărul total de spermatozoizi/ejaculat a prezentat valori mai mari în timpul toamnei, iar mobilitatea spermatozoizilor și procentul

de spermatozoizi morfologic normali au fost mai bune în timpul iernii și primăverii și mai slabe în timpul verii, confirmând rezultatele majorității studiilor precedente pe acest subiect.

8. De asemenea, în cazul în care condițiile de microclimat suferă oscilații în timpul anului, sezonul de recoltare influențează și parametrii materialului seminal de vier examinat după trei zile de conservare la 17°C. Această influență a fost evidentă pentru toți cei 10 parametri examinați. În timpul iernii s-au înregistrat valori mai mari pentru mobilitatea totală și progresivă, pentru viteza de deplasare a spermatozozilor dar și pentru amplitudinea de deplasare laterală a capului și frecvența de intersectare a capului cu traiectoria medie. Similitudini majore au fost observate între valorile din timpul iernii și primăverii și de asemenea între valorile din timpul verii și toamnei, sugerând o dependență a acestor parametri de caracterul fotoperioadei, respectiv crescătoare sau descrescătoare.

9. La vierii cazați în condiții standardizate, influența sezonului asupra principalilor parametri seminali de vier a fost mai puțin vizibilă comparativ cu alte studii pe această temă. Deși au putut fi observate unele variații ale valorilor de la un sezon la altul, acestea au fost mai reduse, și ar fi putut fi cauzate de alți factori ce afectează spermatogeneza, cum ar fi vârsta vierilor sau infecțiile subclinice. De asemenea, în timp ce majoritatea autorilor afirmă că în timpul verii cantitatea spermei este redusă, în acest studiu au fost obținute valori mai mari pentru volum și numărul total de spermatozoizi/ejaculat. Aceste aspecte sugerează că standardizarea și optimizarea microclimatului în fermă poate reduce stresul caloric asupra spermatogenezei din timpul verii, oferind astfel o soluție împotriva infertilității de sezon la suine. Studii suplimentare sunt necesare pentru a observa dacă acest sistem de cazare este eficient și în ceea ce privește parametrii speciali ai materialului seminal.

10. Materialul seminal analizat a fost caracterizat de prezența a patru subpopulații distincte de spermatozoizi, definite prin viteze de deplasare și uniformitate a traiectoriei diferite: subpopulația 1, cu viteză mare și liniaritate mică; subpopulația 2, cu viteză și liniaritate reduse; subpopulația 3, cu viteză și liniaritate superioare; subpopulația 4 cu viteză mică dar liniaritate ridicată.

11. Anotimpul de recoltare a avut o influență clară asupra distribuției de spermatozoizi în materialul seminal analizat.

12. Modificările sezoniere ale parametrilor amintiți ar putea fi cauzate de modificarea numărului de spermatozoizi care se încadrează într-o subpopulație sau într-alta și nu de o scădere/creștere a valorilor pentru toți spermatozozii ejaculați.

13. Au fost observate doar unele corelații slabe între parametrii materialului seminal brut și principalii indicatori de fertilitate ai scroafei.

14. Rezultatele întăresc concluziile unor alte studii recente, conform cărora examenul general al spermei nu poate fi folosit ca un instrument pentru a prezice capacitatea de fecundare a unui ejaculat. El ajută la eliminarea unor ejaculate de o calitate în mod cert scăzută, însă nu poate garanta selectarea doar a ejaculatelor de calitate superioară.

15. Dintre corelațiile detectate, se remarcă cele ale concentrației ejaculatului, mai exact corelație slab pozitivă cu rata parturițiilor, slab pozitivă cu numărul de purcei vii/parturiție și slab negativă cu numărul de purcei morți/parturiție. Acestea sugerează că o concentrație mai mică a ejaculatului, respectiv o cantitate mai mare de plasmă seminală ce revine fiecărui spermatozoid poate avea urmări nefavorabile asupra capacității sale fecundante.

16. Mobilitatea spermatozoizilor are un impact major asupra fecundării, însă selectarea pentru IA doar a ejaculatelor cu mobilitate ridicată a redus variabilitatea rezultatelor și impactul acestui parametru asupra indicilor de fertilitate, în condițiile date. În acest studiu, ejaculatele au avut minim 60% mobilitate totală. Studiul nu exclude corelațiile între indicatorii de fertilitate la scroafe și mobilitatea spermatozoizilor sub această valoare.

17. Deși ejaculatele recoltate în timpul verii au oferit o rată a fătărilor mai scăzută, diferențele față de ejaculatele din timpul iernii nu au fost semnificative. De asemenea, materialul seminal recoltat vara a determinat o prolificitate foarte bună, superioară prolificității determinate de materialul seminal din timpul iernii și primăverii. Aceste aspecte conduc către concluzia că standardizarea condițiilor de întreținere reprezintă o posibilă soluție pentru combaterea „infertilității de sezon” descrisă anterior la suine.



## CHAPTER X. GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. The results offered by CASA are greatly influenced by the type of chamber used when analyzing extended boar sperm.

2. Within this study, the Leja and Minitube chambers offered close values, while the MofA chamber showed significant lower results in terms of kinetic parameters. Additional studies are recommended on this type of analyzing chamber in order to confirm or refute this negative effect on boar sperm and if confirmed, to determine if the cause is of chemical or mechanical nature. A study on sperm from other species is also recommended.

3. A significant underestimation of sperm concentration calculated by CASA in extended boar semen was observed, regardless of the analyzing chamber type.

4. The long-term extender used within this study (Sinus DiluPorc™) offered slightly better results compared to the short-term extender (BTS®) when boar semen was stored for a longer period; however, both extenders maintained the semen quality within acceptable values for seven days in terms of kinetic parameters, without significant differences;

5. Unfortunately, the seminal parameters evaluated within general examination of raw semen have a low predictive value on the capacity of the ejaculate to maintain its quality during storage. Only weak and moderate correlations were detected, which is not enough to draw a certain conclusion. Most of the detected correlations suggest however that the higher sperm concentration in raw semen and a higher spermatogenesis rate would result in a faster but also less linear sperm movement after storage.

6. Both types of containers used within the study showed efficiency in maintaining semen quality during storage; however, the automatically filled tube showed better protection for sperm motility compared to manually filled bottle.

7. In case of housing in normal conditions, the boars showed a clear seasonal effect for all the selected seminal parameters. The ejaculate volume was superior during autumn, sperm concentration was higher during winter, total number of sperm showed higher values during autumn while sperm motility and the percentage of sperm with normal morphology were better during winter and spring, and poor during summer thus confirming the results of the most previous studies on the subject.

8. Also, when the microclimate shows great fluctuations along the year, the season influences the kinetic parameters of extended and stored semen as well. During winter, higher values for total and progressive motility as well as for

sperm velocity, amplitude of lateral head displacement and beat cross frequency were recorded. Great similarities were observed between the values recorded during winter and those during spring but also between the values obtained during summer and those during autumn, thus suggesting a dependence of the kinetic parameters on the type of photoperiod.

9. In boars housed in standardized conditions, the influence of the season on the main seminal parameters was less visible. Although some variations from a season to another could be observed, they were to a lesser extent and could be caused by other factors affecting the spermatogenesis such as boar age or subclinical infections. Also, while the majority of authors state that summer offers lower quantity of semen, during this study it showed the highest values for ejaculate volume and total number of sperm. This suggests that the standardization and optimization of microclimate in the farm reduces the heat stress specific to summer thus offering a solution against the seasonal infertility in boars. Additional studies are recommended in order to observe if this housing system is efficient in terms of some special semen parameters as well.

10. The examined semen was characterized by the presence of four distinct motile sperm subpopulations, defined by specific sperm velocity and linearity: subpopulation 1, with high velocity but low linearity; subpopulation 2, with low velocity and linearity; subpopulation 3, with high velocity and linearity; subpopulation 4 with low velocity but high linearity.

11. The season of semen collection showed a clear influence on the distribution of motile sperm subpopulation within boar extended semen.

12. The seasonal changes in the seminal parameters could be caused by the changes in the number of sperm included within specific subpopulations and not by increases/decreases in values of all ejaculated sperm.

13. Only weak correlations were observed between the parameters of raw semen and the fertility in sows.

14. The results are consistent with the conclusions of previous studies, according to which the general exam of boar semen can not be used as a tool to predict the fertilizing capacity of an ejaculate. It is helpful in eliminating the ejaculates with clear low quality, but can not guarantee the selection of only high quality ejaculates.

15. Of the detected correlations, we noticed those of sperm concentration, more exactly weak positive with farrowing rate, weak positive with live piglets/parturition and weak negative with dead piglets/parturition; this could suggest that a lower sperm concentration of the ejaculate and thus a higher quantity of seminal plasma per spermatozoon could have negative consequences for its fertilizing capacity.

16. Sperm motility has a major impact on the fertilization, but the selection for artificial insemination only of ejaculates with high motility reduced the variability of results and the effect of this parameter on the fertility. Within this study, the ejaculates showed at least 60% total motility. The results do not deny the correlations between the fertility indicators in sows and sperm motility below 60%.

17. Although the ejaculates collected during summer offered a lower farrowing rate, the differences when compared to the values offered by the winter were not significant. Also, the semen collected during summer offered a higher litter size when compared to that obtained with ejaculates from winter and spring. All these lead to the conclusion that the standardization of the microclimate represents a possible solution against the „seasonal infertility” in swine.

18.

## BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Abdelwahab D., Rivera M.M., Rodríguez-Gil J.E., Rigau T., 2006 - *Seasonality effects on sperm motility kinematic parameters of Murciano-Granadina bucks*. Reprod Domest Anim 41(Suppl 2):103.
2. Akers R. M. and Denbow D. M., 2013 - *Anatomy and Physiology of Domestic Animals*, second edition. Wiley-Blackwell. Pp 557-590.
3. Alkmin D.V., Perez-Patiño Cristina, Barranco Isabel, Parrilla Inmaculada, Vazquez J.M., Martinez E.A., Rodriguez-Martinez H., Roca J., 2014 - *Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate*. Cryobiology, Volume 69 (2):203-210
4. Almeida F.L., Leal M.C., França L.R., 2006 - *Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (Sus scrofa scrofa)*. Biol Reprod 75:792–799.
5. Althouse G., 2006 - *Artificial Insemination in Swine: Boar Stud Management*. in: Youngquist Robert S., Threlfall Walter (Eds.), Current Therapy in Large Animal Theriogenology Vol. 2- Saunders Elsevier. Pp 731-738.
6. Althouse G., 2014 - *Applied Andrology in Swine*, in: Peter J. Chenoweth and Steven P. Lorton (Eds.). Animal Andrology: Theories and Applications. CAB International. Pp 404-417.
7. Amann R.P., Waberski D., 2014 - *Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments*. Theriogenology 81, 5–17.
8. Andersson, H., 2000 - *Photoperiodism in Pigs: Studies on Timing of Male Puberty and Melatonin*. Swedish University Agricultural Science, Uppsala, Sweden, 46 (Thesis).
9. Anzar M., Kroetsch T., Buhr M.M., 2009 - *Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen*. J Androl 30(6):661–668.
10. Ardelean V., 2002 - *Fiziologia reproducției animalelor*. Editura MIRTON Timișoara.
11. Armon L, Eisenbach M., 2011 - Behavioral mechanism during human sperm chemotaxis: involvement of hyperactivation. PLoS One, 6(12):e28359.
12. Auvigne V, Leneuve P, Jehannin C, Peltoniemi O, Salle E., 2010 - Seasonal infertility in sows: a five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod. Theriogenology, 74:60–6.
13. Barrabes Aneas S., Gary B.G., Bouvier B.P., 2008 - Collectis® automated boar collection technology. Theriogenology, 70:1368–1373.
14. Berndtson W.E., 2014 - Sperm production and its Harvest, in: Peter J. Chenoweth and Steven P. Lorton (Eds.), Animal Andrology: theories and applications. CAB International. Pp 11-33.
15. Bianchi I., Calderam K., Maschio E.F., Madeira E.M. , Da Rosa Ulguim R., Corcini C.D., Bongalhardo D.C., Correa E.K., Lucia T. Jr., Deschamps J.C., 2008 - Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. Theriogenology 69:632-638.
16. Birk A, Labouriau R, Christensen P, 2009 - Dynamics of the induced acrosome reaction in boar sperm evaluated by flow cytometry. Animal Reproduction Science 115:124–136.

17. Bogdan A.T., 1999 - *Tratat de reproducție și înșămânțări artificiale la suine*. Editura Tehnică Agricolă, București, pp 118-120.
18. Bollwein H., Petschow K., Weber F., Leiding C., Stolla R., 2004 - *The incidence of agglutination and its influence on sperm quality and fertility of boar semen*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 117(7-8):327-33.
19. Bonet S., Garcia Estela, Sepúlveda Lilian, 2013 - *The Boar Reproductive System*, in: Sergi Bonet, Isabel Casas, William V. Holt and Marc Yeste (Eds.), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 109-202.
20. Brinsko, S., Rowan, K., Varner, D., Blanchard, T., 2000 - *Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa*. Theriogenology 53, 1641–1655.
21. Broekhuyse M.L.W.J., Šoštarić E., Feitsma H., Gadella B.M., 2011 - *Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination* Theriogenology 76:1473–1486
22. Broekhuyse M.L.W.J., Sostarić E., Feitsma H., Gadella B.M., 2012 - *Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility*. J. ANIM SCI, 90:779-789.
23. Budworth P.R., Amann R.P., Chapman P.L., 1988 - *Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility*. J Androl, 9:41–54.
24. Bussalleu Eva and Torner Eva, 2013 - *Quality Improvement of Boar Seminal Doses*, in: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M (Eds), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 520-529.
25. Calamera J., Buffone M., Ollero M., Alvarez J., Doncel G.F., 2003 - *Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples*. Mol. Reprod. Dev. 66, 422–430.
26. Camus A., Camugli S., Lévêque C., Schmitt E., Staub C., 2011 - *Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration?* Theriogenology 75(3):577–583.
27. Cernescu H., 2004 - *Ginecologie veterinară*. Ed. Cecma Part., Timișoara. Pp 44-47.
28. Chanapiwat P., Olanratmanee E.-O., Kaeoket K., Tummaruk P., 2014 - *Conception Rate and Litter Size in Multiparous Sows after Intrauterine Insemination Using Frozen-Thawed Boar Semen in a Commercial Swine Herd in Thailand*. J Vet Med Sci. 76(10): 1347–1351.
29. Chang H., Suarez S.S., 2010 - *Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm*. Biol. Reprod. 83, 507–513.
30. Cheon Y.M., Kim H.K., Yang C.B., Yi Y.J., Park C.S., 2002 - *Effect of Season Influencing Semen Characteristics, Frozen-Thawed Sperm Viability and Testosterone Concentration in Duroc Boars*. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2002. Vol 15, No. 4 : 500-503.
31. Ciereszko A., Ottobrej.S., Glogowski J., 2000 - *Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars*. Anim.Reprod. Sci. 64,89–96.
32. Ciornei Ș.G. 2012 - *Materialul seminal de vier și biotehnologii de reproducție la suine*. Editura "Ion Ionescu de la Brad", Iași. pp 44-48 și 136-163.

33. Cochran P.E., 2010 - *Laboratory Manual for Comparative Veterinary Anatomy & Physiology, 2nd Edition* (Veterinary Technology). Delmar Cengage Learning. Pp 278-297.
34. Contri A., Valorz C., Faustini M., Wegher L., Carluccio A., 2010 - *Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa*. *Theriogenology*, 74:424–35.
35. Cotea C., 2004 - *Biologie celulară, embriologie generală, histologie generală, ediția a II-a*. Editura Tehnopress, Iași. Pp 181-189.
36. Davis D.O., Katz D.F., 1993 - *Computer-aided sperm analysis: technology at a crossroads*. *Fertil Steril*, 59:953–5.
37. de Paz, P., Mata-Campuzano, M., Tizado, E.J., Alvarez, M., Alvarez-Rodríguez, M., Herraes, P., Anel, L., 2011 - *The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used*. *Theriogenology* 76, 1313–1325.
38. Didion B.A., 2008 - *Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples*. *Theriogenology*, 70 (8), pp 1374–1376.
39. Dorado J., Alcaráz L., Duarte N., Portero J.M., Acha D., Hidalgo M., 2011 - *Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient*. *Animal Reproduction Science* 125 (2011) 211– 218.
40. Dorado, J., Acha, D., Ortiz, I., Gálvez, M. J., Carrasco, J. J., Díaz, B., Gómez-Arrones V., Calero-Carretero R., Hidalgo, M., 2013 - *Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (Equus asinus)*. *Anim Reprod Sci*, 143(1-4), 64-71.
41. Dorado, J., Molina, I., Muñoz-Serrano, A., Hidalgo, M., 2010 - *Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats*. *Theriogenology*, 74(5), 795-804.
42. Drugociu D, 2009 - *Boliile obstetricale-ginecologice la animale*. Ediția a II-a. Editura „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, pp 17-33 și 140-141.
43. Dubé C., Beaulieu M., Reyes-Moreno C., Guillemette C., Bailey J.L., 2004. *Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation*. *Theriogenology*; 62:874–86.
44. Ehlers J., Behrb M., Bollwein H., Beyerbach M., Waberski D., 2011 - *Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application* *Theriogenology* 76 448–454
45. Eriksson B.M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H., 2002 - *Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container*. *Theriogenology* 58(6):1065-1079
46. Ferraz, M. A., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A. I., Tamargo, C., Hidalgo C.O., R. Muiño, Mogas, T., 2014 - *Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls*. *Theriogenology*, 81(8), 1067-1072.
47. Flores E., Fernández-Novell J.M., Peña A., Rodríguez-Gil J.E., 2009 - *The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the motile sperm subpopulations structure and mitochondrial activity in boar spermatozoa*. *Theriogenology* 72:784–797.
48. Flores E., Cifuentes D., Fernández-Novell J.M., Medrano A., Bonet S., Briz M.D., Pinart E., Pena A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2008 - *Freeze-thawing induces*

*alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm.* Theriogenology 69: 1083–1094.

49. Flores E., Fernández-Novell J.M., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2010 - *Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network.* Theriogenology 74: 354–363

50. Flowers W.L. 1997 - *Artificial insemination in swine.* In: Youngquist RS. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. Pp 678-683.

51. Flowers W.L., 2008 - *Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars.* Theriogenology 70:1297–1303.

52. Flowers W.L., 1997 - *Management of boars for efficient semen production. Control of pig reproduction V.* J Reprod Fertil:67–78.

53. Frandson Rowen D., Wilke W. Lee, Fails Anna Dee, 2009 - *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 7<sup>th</sup> Edition. Wiley-Blackwell. Pp 401-412.

54. Fraser L., Strzezek J., 2005 - *Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay.* Reproduction in Domestic Animals 40: 530-536.

55. Fraser L, Strzezek R, Strzezek J 2007a - *Fertilizing capacity of boar semen frozen in an extender supplemented with ostrich egg yolk lipoprotein fractions – A pilot study.* Polish Journal of Veterinary Sciences 10 131-135.

56. Fraser L., Dziekonska A., Strzezek R., Strzezek J., 2007b - *Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing. Its effects on post-thaw sperm characteristics.* Theriogenology 67 994-1003.

57. Gadea J., 2002 - *Sperm under the microscope.* Pig Int., 32, 24–27.

58. Gadea J., Matas C., Lucas X., 1998 - *Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay.* Animal Reproduction Science, 56:95–108.

59. Gadea J., 2005 - *Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility.* Theriogenology, 63:431–44.

60. Gadea J., Sellés E., Marco M.A., 2004 - *The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions.* Reprod Domest Anim. 39(5):303-8.

61. García Herreros M., Aparicio I.M., Nuñez I., García-Marín L.J., Gil M.C., Peña F.J., 2005 - *Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions.* Theriogenology 63 795–805.

62. Garcia J.C., Dominguez J.C., Pena F.J., Alegre B., Gonzalez R., Castro M.J., Habing G.G., Kirkwood R.N., 2010 - *Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility.* Animal Reproduction Science 119: 160–165

63. Gloria A., Carluccio A., Contri A., Wegher L., Valorz C., Robbe D., 2013 - *The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa.* Andrology 1(6):879-85.

64. Glossop Christianne, 2001 – *Infertility in the sow and gilt.* Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics, by Noakes DE, Parkinson TJ and England GCW. W.B. Saunders. Pag. 621-638.

65. Gorog I., Cernescu H., Korodi G., Zarcu S., Chirilă D., 2013 - *Corelații între parametrii de mobilitate ai materialului seminal de vier și rezultatele inseminării artificiale*. Rev.Rom.Med.Vet. 23(1): 93-96.
66. Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M., Rath D., 2008 - *New aspects of boar semen freezing strategies*. Theriogenology 70 1225-1233.
67. Groza I., Morar I., 2004 – *Andrologie veterinară*. Ed.Gryphon, Brașov.
68. Gutiérrez-Pérez O., Juárez-Mosqueda M., Uribe Carvajal S., Trujillo Ortega Me., 2009 - *Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity*. Cryobiology 58: 287–292
69. Hansen C., Vermeiden T., Vermeiden J.P.W., Simmet C., Day B.C., Feitsma H., 2006 - *Comparison of FACS Count AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen*. Theriogenology 66, 2188–2194.
70. Henning H., Petrunkina A.M., Harrison R.A.P., Waberski D, 2014 - *Cluster analysis reveals a binary effect of storage on boar sperm motility function*. Reprod Fertil Dev 26(5), 623–632.
71. Hirai M., Boersma A., Hoeflich A., Wolf E., Foll J., Aumuller T.R., Braun J., 2001 - *Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Sus scrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors*. J Androl, 22:104–10
72. Hirano Y., Shibahara H., Suzuki T., Takamizawa S., Yamaguchi C., Tsunoda H., 2001 - *Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro*. J Assist Reprod Genet, 18(4):213-8.
73. Hoflack G., Opsomer G., Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., De Kruif A., 2007 - *Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls*. Reprod Domest Anim, 42:153–61.
74. Holt C., Holt W.V., Moore H.D.M., Reed H.C.B., Curnoc R.M., 1997 - *Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials*. J Androl; 18: 312-323.
75. Holt W.V., 1996 - *Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility*. Reprod Domest Anim 31:17–24.
76. Hu S., Zhang X., Han C., Wei S., Xie D., Du R., Hu J., 2015 - *Effects of Three Different Diluents on Quality of Boar Semen Stored at 17°C*. Journal of Northeast Agricultural University. Vol. 22 (2). 36-46.
77. Huang YH, Lo LL, Liu SH, Yang TS, 2010 - *Age-related changes in semen quality characteristics and expectations of reproductive longevity in Duroc boars*. Anim Sci J 81:432–437.
78. Ibănescu I., Drugociu D., Roșca P., Sfartz I.. 2014 - *Factors influencing sperm motility in boar*. Lucrări Științifice USAMV Iași – seria Medicină Veterinară, volumul 57:116-126.
79. Janett F., Fuschini E., Keo S., Hässig M., Thun R., 2005 - *Seasonal changes of semen quality in the boar*. Reprod. Dom. Anim. 40: 356.
80. Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C., 2000 - *Storage of boar semen*. Anim Reprod Sci ; 62: 143-172.
81. Katila T., Combes G.B., Varner D.D., Blanchard T.L., 1997 - *Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen*. Theriogenology, 48(7):1085–1092.

82. Knecht D., Środoń S., Szulc K., Duziński K., 2013 - *The effect of photoperiod on selected parameters of boar semen*. Livestock Science 157: 364–371.
83. Knecht D., Środoń S., Duziński K., 2014 - *The influence of boar breed and season on semen parameters*. South African Journal of Animal Science 2014, 44(1):1-9.
84. Kozirowska-Gilun M., Kozirowski M., Strzezek J., Fraser L., 2011 - *Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract*. Reprod Biol 11: 37-47.
85. Kraeling R.R. and Webel S.K., 2015 - *Current strategies for reproductive management of gilts and sows in North America*. J Anim Sci Biotechnol 6(1):3.
86. Kraemer M., Fillion C., Martin-Pont B., Auger J., 1998 - *Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system*. Hum. Reprod., 13, 611–619
87. Krause W., 1995 - *Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction*. Hum Reprod, 10:60–66.
88. Kunavongkrit A., Suriyasomboon A., Lundeheim N., Heard T.W., Einarsson S., 2005 - *Management and sperm production of boars under differing environmental conditions*. Theriogenology 63, 657–667.
89. Kuster C. E. and Althouse G. C., 2006 - *Reproductive Physiology and Endocrinology of Boars*, in: Youngquist Robert S., Threlfall Walter (Eds.), Current Therapy in Large Animal Theriogenology Vol. 2- Saunders Elsevier. Pp 717 – 721.
90. Lavara R., Moce E., Lavara F., Pilar M., De Castro V., Vicente J.S., 2005 - *Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm insemination in rabbits?* Theriogenology, 64:1130–41.
91. Lawrence J. A., Turman E. J., Rich T., Sharp A., Hillier J. C., 1970 - *A study of seasonal changes in boar semen*. Oklahoma Agricultural Experiment Station No. M.P. 84 pp. 77-83
92. Lenz R.W., Kjelland M.E., Vonderhaar K., Swannack T.M., Moreno J.F., 2011 - *A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer*. J Anim Sci. 89(2), 383-8.
93. Li Z., Zhu J.-Q., Yang W.-X., 2010 - *Acrosome reaction in Octopus tankahkeei induced by calcium ionophore A23187 and a possible role of the acrosomal screw*. Micron, 41(1), 39-46.
94. Lopes G., Simões A., Ferreira P., Martins-Bessa A., Rocha A., 2009 - *Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers*. Animal Reproduction Science 112, 158–163.
95. López Rodríguez A., Rijsselaere T., Bijttebier J., Vyt P., Van Soom A., Maes D., 2011 - *Effectiveness of the sperm quality analyzer (SQA-Vp) for porcine semen analysis*. Theriogenology 75 972–977
96. Lorton S.P., 2014 - *Evaluation of semen in the Andrology Laboratory*, in: Peter J. Chenoweth and Steven P. Lorton (Eds.), Animal Andrology: theories and applications. CAB International. Pp 100-143.
97. Maciel A.C., Castro F.S., Pires Neves A., Mattos R.C., Fiala Rechsteiner S., 2012 - *Preliminary results using a new container for cooled stallion semen transport*. 6th ISSR Abstracts/Journal of Equine Veterinary Science 32:475-518.

98. Martí, J. I., Aparicio, I. M., Leal, C. L., García-Herreros, M., 2012 - *Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association with sperm quality parameters in ram ejaculates*. *Theriogenology*, 78(3), 528-541.
99. Martinez E.A., Vázquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parrilla I., Vázquez J.L., Dan B.N., 2001 - *Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows*. *Reprod* 122:289–296
100. Martínez-Pastor F., Díaz-Corujo A.R., Anel E., Herraes P., Anel L., De Paz P., 2005 - *Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm*. *Theriogenology* 64:958–74.
101. Martínez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Herraes, P., Anel, L., de Paz, P., 2005 - *Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process*. *Biol Reprod*, 72(2), 316-327.
102. Martín-Hidalgo D., Barón F.J., Robina A., Bragado M.J., Hurtado De Llera A., García-Marín L.J., Gil M.C., 2013 - *Inter- and intra-breed comparative study of sperm motility and viability in Iberian and Duroc boar semen during long-term storage in MR-A and XCell extenders*. *Animal Reproduction Science*; 139:109– 114
103. Maya-Soriano M.J., Taberner E., Sabés-Alsina M., Ramon J., Rafel O., Tusell L., Piles M., López-Béjar M., 2015 - *Daily exposure to summer temperatures affects the motile subpopulation structure of epididymal sperm cells but not male fertility in an in vivo rabbit model*. *Theriogenology* 84 (2015) 384–389.
104. McPherson F.J., Nielsen S.G., Chenoweth P.J., 2014 - *Semen effects on insemination outcomes in sows*. *Animal Reproduction Science* 151, 28–33.
105. Melo C.M., Alvarenga M.A., Zahn F.S., I. Martin, Orlandi C., Trínque C.L.A., Dell'Aqua J.A. Jr., Papa F.O., 2006 - *Effect of the transport container and cryoprotectant on freezability of equine semen previously cooled for 24 h*. *Animal Reproduction Science* 94:78–81.
106. Miró J, Lobo V, Quintero-Moreno A, Medrano A, Peña A, Rigau T., 2005 - *Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen*. *Theriogenology* 63:1706–16.
107. Miró, J., Taberner, E., Rivera, M., Peña, A., Medrano, A., Rigau, T., & Peñalba, A., 2009 - *Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen*. *Theriogenology*, 72(8), 1017-1022.
108. Montserrat Rivera M., Quintero-Moreno A., Barrera X., Jesús Palomo M., Rigau Teresa, Rodríguez-Gil J.E., 2005 - *Natural Mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis*. *Theriogenology* 64:934–946.
109. Mortimer D., Shu M.A., Tan R., 1986 - *Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis*. *Human Reprod*, 1(5):299 –303.
110. Muiño, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., 2009 - *Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls*. *Theriogenology* 72, 860–868.
111. Muiño R., Rivera M.M., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., Peña A.I., 2008 - *Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen*. *Anim Reprod Sci*, 109(1-4), 50-64.
112. Murase T., Imaeda N., Yamada H., Miyazawa K., 2007 - *Seasonal changes in semen characteristics, Composition of Seminal Plasma and Frequency of Acrosome*

*Reaction Induced by Calcium and Calcium Ionophore A23187 in Large White Boars.* J. Reprod. Dev; 53: 853-865

113. Neculai-Văleanu Andra-Sabina, 2015 - *Cercetări comparative privind valoarea biologică a spermei de taur din rasele pentru carne și lapte.* Teză de doctorat. Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Iași. Pp 51-72.

114. Noakes D.E., Parkinson T.J., England G.C.W. (Eds.), 2001 - *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8<sup>th</sup> edition.* An imprint of Saunders Elsevier. Pp 671-694.

115. Palacín I., Vicente-Fiel S., Santolaria P., Yániz J.L., 2013 - *Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram.* Small Ruminant Research 112 128–135

116. Park C.S., Yi Y.J., 2002 - *Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons.* Anim Reprod Sci 73:53–61.

117. Park S., 2013 - *Effects of sow, boar, and semen traits on sow reproduction.* Doctoral thesis, University of Nebraska-Lincoln.

118. Parkinson T., 2009a - *Normal reproduction in male animals*, in: D.E Noakes, T.J. Parkinson and G.C.W. England (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 9th Edition. An imprint of Saunders Elsevier. Pp 681-704.

119. Parkinson T., 2009b - *Fertility, subfertility and infertility in male animals*, in: D.E Noakes, T.J. Parkinson and G.C.W. England (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 9th Edition. An imprint of Saunders Elsevier. Pp 705-764.

120. Parkinson T., 2009c - *Artificial insemination*, in: D.E Noakes, T.J. Parkinson and G.C.W. England (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 9th Edition. An imprint of Saunders Elsevier. Pp 765-806.

121. Parkinson T.J., 2001 – *Fertility and infertility in Male Animals.* *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, by Noakes DE, Parkinson TJ and England GCW. W.B. Saunders. Pag. 695-751.

122. Peltoniemi O., Kemp B., 2009 - *Infertility and subfertility in the gilt and sow*, in: in: D.E Noakes, T.J. Parkinson and G.C.W. England (Eds.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 9th Edition. An imprint of Saunders Elsevier. Pp 632-645.

123. Peltoniemi O.A.T, Tast A., Love R.J., 2000 - *Factors effecting reproduction in the pig: seasonal effects and restricted feeding of the pregnant gilt and sow.* *Animal Reproduction Science*, 60–61:173–184.

124. Peltoniemi O.A., Virolainen J.V., 2006 - *Seasonality of reproduction in gilts and sows.* *Soc Reprod Fertil* 62 (Suppl):205–18.

125. Peña F.J., Rodríguez-Martínez H., Tapia J.A., Ortega Ferrussola C., González Fernández L, Macías García B, 2009 - *Mitochondria in mammalian sperm physiology and Pathology: a review.* *Reprod Domestic Anim* 44: 345–349.

126. Peña A.I., Barrio M., Becerra J.J., Quintela L.A., Herradón P.G., 2012 - *Motile sperm subpopulations in frozen-thawed dog semen: changes after incubation in capacitating conditions and relationship with sperm survival after osmotic stress.* *Anim Reprod Sci*, 133(3-4), 214-223.

127. Pérez-Llano B., Yenes-García P., García-Casado P., 2003 - *Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C.* *Theriogenology* 60, 1401–1407.

128. Pérez-Llano B., Sala R., Reguera G., García-Casado P., 2009 - *Changes in subpopulations of boar sperm defined according to viability and plasma and acrosome membrane status observed during storage at 15 degrees C*. Theriogenology, 71(2), 311-317.
129. Pinart Elisabeth and Puigmulé Marta, 2013 - *Factors Affecting Boar Reproduction, Testis Function, and Sperm Quality*, in: Sergi Bonet, Isabel Casas, William V. Holt and Marc Yeste (Eds.), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 109-202.
130. Pinart Elisabeth, Yeste Marc, Prieto-Martínez Noelia, Reixach Josep, Bonet Sergi, 2015 - *Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter?* Theriogenology 83 (9), 1428-1437.
131. Pinto, C., Paccamonti, D., Eilts, B., 1999 - *Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen*. Theriogenology 52, 609–616.
132. Prathalingam N., Holt W., Revell S., Jones S., Watson P., 2006 - *The Precision and Accuracy of Six Different Methods to Determine Sperm Concentration*. J Androl., 27(2):257-62.
133. Prieto-Martínez N, Bussalleu E, Garcia-Bonavila E, Bonet S, Yeste M., 2014 - *Effects of Enterobacter cloacae on boar sperm quality during liquid storage at 17°C*. Anim Reprod Sci. 148(1-2):72-82
134. Ptaszynska Monika (ed.), 2009 - *Compendium of Animal Reproduction, 10<sup>th</sup> Edition*. Intervet International bv, pp 12-14.
135. Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE., 2004 - *Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis*. Theriogenology 61(4):673–90.
136. Quintero-Moreno A., Miró J., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2003 - *Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates*. Theriogenology 58:1973–90.
137. Rajkovic Andreja, Uyttendaele M., Deley W., Van Soom A., Rijsselaere T., Debevere J., 2006 - *Dynamics of boar semen motility inhibition as a semi-quantitative measurement of Bacillus cereus emetic toxin (Cereulide)*. Journal of Microbiological Methods 65 : 525–534
138. Ramió L., Rivera M.M., Ramírez A., Concha I.I., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J. E., 2008 - *Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to "in vitro" capacitation and further "in vitro" acrosome reaction*. Theriogenology, 69(4), 501-512.
139. Rath D., Bathgate R., Rodriguez-Martinez H., Roca J., Strzezek J. Waberski D., 2009 - *Recent advances in boar semen cryopreservation*, in: Rodriguez-Martinez H., Vallet J.L. Ziecik A.J. (Eds.), *Control of Pig Reproduction VIII*. Nottingham University Press, pp 51-66.
140. Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A., 2003 - *Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer*. Theriogenology 60, 1553-1568.
141. Rivera M., Quintero-Moreno A., Barrera X., Palomo M.J., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2005 - *Natural mediterranean photoperiod does not affect the main parameters of boar-semen quality analysis*. Theriogenology 64:934–946.
142. Rivera M.M., Quintero-Moreno A., Barrera X., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2006 - *Effects of constant, 9- and 16-h light cycles on sperm quality, semen storage*

ability and motile sperm subpopulations structure of boar semen. *Reprod Domest Anim* 41:386–93.

143. Roca J., Parrilla I., Rodriguez-Martinez H., Gil M.A., Cuello C., Vazquez J.M., Martinez E.A., 2011 - *Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry*. *Reprod. Domest. Anim.* 46 (Suppl. 2), 79–83

144. Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vázquez JM, Martínez EA, 2006 - *Factors influencing boar sperm cryosurvival*. *J Anim Sci.*;84: 2692–2699.

145. Roca J., Carvajal G., Lucas X., Vazquez J.M., Martinez, E.A. 2003 - *Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa*. *Theriogenology* 60:77-87.

146. Rodríguez-Gil J.E. și Estrada Efrén, 2013 - *Artificial Insemination in Boar Reproduction*, in: Sergi Bonet, Isabel Casas, William V. Holt and Marc Yeste (Eds.), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 589-607.

147. Rodríguez-Gil J.E., 2013 - *Biological Aspects of the Mature Boar Spermatozoon*, in: Sergi Bonet, Isabel Casas, William V. Holt and Marc Yeste (Eds.), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 49-64.

148. Roșca P., 2004 - *Reproducția animalelor domestice*. Editura Tehnopress. Pp 9-72; 122-141

149. Runceanu L., Cotea C., 2001 - *Reproducție, obstetrică și ginecologie veterinară*. Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași.

150. Runceanu L., Cotea C., Drugociu D., Roșca P., 2007 - *Reproducție, obstetrică și ginecologie veterinară*. Ediția II –a, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași. Pp 35-60; 97-132; 164-176.

151. Runceanu L., Drugociu D., Roșca P., Anton C., 2002 - *Reproducție, Obstetrică și Andrologie Clinică*. Casa de Editură Venus, Iași.

152. Sancho S, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Kadar E, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Coll MG, Bonet S, 2004 - *Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods*. *Theriogenology* 62:1271–1282.

153. Sancho S., Rodríguez-Gil J.E., Pinart E., Briz M., Garcia-Gil N., Badia E., Bassols J., Pruneda A., Bussalleu E., Yeste M., Casas I., Palomo M.J., Ramió L., Bonet S., 2006 - *Effects of exposing boars to different artificial light regimens on semen plasma markers and "in vivo" fertilizing capacity*. *Theriogenology* 65:317–331.

154. Sancho Sílvia and Vilagran Ingrid, 2013 - *The Boar Ejaculate: Sperm Function and Seminal Plasma Analyses*, in: Sergi Bonet, Isabel Casas, William V. Holt and Marc Yeste (Eds.), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 471-516.

155. Saravia F., Hernández M., Wallgren M., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H., 2007 - *Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of boar ejaculate*. *International Journal of Andrology* 30 485-499.

156. Satake N., Elliott R.M.A., Watson P.F., Holt W.V., 2006 - *Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct*. *J Exp Biol* 209:1560–72.

157. Schmidt H., Kamp G., 2004 - *Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis*. Reproduction Research 128, 171-179.
158. Schnurrbusch U., Wolf G., Schneider F., Gottschalk J., 2002 - *Jahreszeitlicher Verlauf der Konzentrationen von FSH, LH, Prolaktin, Testosteron und Östradiol-17 $\beta$  sowie spermatologischer Parameter beim Eber*. Tierärztl. Prax., 30, 244-251.
159. Schulze M., Ruediger K., Mueller K., Jung M., Well C., Reissmann M., 2013 - *Development of an in vitro index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates*. Anim Reprod Sci., 140(1-2), 70–76.
160. Setchell B.P., 2014 - *Semen and its constituents*, in: Peter J. Chenoweth and Steven P. Lorton (Eds.), Animal Andrology: theories and applications. CAB International. Pp 3-10.
161. Silva C.G., Cunha E.R., Blume G.R., Malaquias J.V., Bão S.N., Martins C.F., 2015 - *Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose*. Cryobiology, 70: 90-94.
162. Smital J., 2010 - *Comparison of environmental variations in boar semen characteristics of six breeds and their crossbreds over an eight-year period*. Research in pig breeding, 4 (1): 26-32.
163. Șonea A., 2003 – *Biotehnici și biotehnologii de reproducție*. În: Constantin N (Ed.), Tratat de Medicină Veterinară, Ed. Tehnică, București, pp 540-683.
164. Sonderman J.P., Luebbe J.J., 2008 - *Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars*. Theriogenology 70:1380–1383.
165. Sumransap P., Tummaruk P., Kunavongkrit A., 2007 - *Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination*. Reproduction in Domestic Animals, 42 (2): 113–117
166. Sun T.T., Chung C.M., Chan H.C., 2011 - *Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYDSP8*. Protein Cell 2 92–98.
167. Suriyasomboon A., Lundeheim N., Kunavongkrit A., Einarsson S., 2005 - *Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars under different housing systems in Thailand*. Livestock Production Science 89:19–31.
168. Suriyasomboon A., Lundeheim N., Kunavongkrit A., Einarsson S., 2005 - *Effect of temperature and humidity on sperm morphology in Duroc boars under different housing systems in Thailand*. The Journal of Veterinary Medical Science, 67:777-785.
169. Sutkeviciene N., Andersson M.A., Zilinskas H., Anderson M., 2005 - *Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress*. Theriogenology, 63:739–47
170. Tardif S., Laforest J.P., Cormier N., Bailey J.L., 1999 - *The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo*. Theriogenology, 52:447–59.
171. Tast A., Halli O., Ahlstrom S., Andersson H., Love R.J., Peltoniemi O.A.T., 2001 - *Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt*. J.PinealRes. 30:43–49.
172. Tejerina F., Buranaamnuay K., Saravia F., Wallgren M., Rodriguez-Martinez H., 2008 - *Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments*. Theriogenology 69:1129–1138.

173. Thurston L.M., Siggins K., Mileham A.J., Watson P.F., Holt W.V., 2002 - *Identification of amplified restriction fragment length polymorphism makers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation*. Biology of Reproduction 66 545-554.
174. Tomlinson M., Turner J., Powell G., Sakkas D., 2001 - *One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods?* Hum. Reprod. 16 (1): 121-124.
175. Turba M.E., Fantinati P., Bernardini C., Gentilini F., Bacci M.L., Forni M., 2007 - *Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs*. Anim Reprod Sci 99:72–81.
176. Ubeda J.L., Ausejo R., Dahmani Y., Falceto MV., Usan A., Malo C., Perez-Martinez F.C., 2013 - *Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality*. Theriogenology 80(6):565-70
177. Versteegen J., Iguer-Ouada M, Onclin K, 2002 - *Computer assisted semen analyzers in andrology and veterinary practice*. Theriogenology;57:149-79
178. Vicente-Fiel S., Palacín I., Santolaria, P., Yániz, J.L., 2013 - *A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F)*. Anim Reprod Sci, 139(1-4), 182-189.
179. Vyt P., Maes D., Dejonckheere E., Castryck F., Van Soom A., 2004a - *Comparative study on five different commercial extenders for boar semen*. Reprod Domest Anim 39, 8–12.
180. Vyt P., Maes D., Rijsselaere T., Dejonckheere E., Castryck F., Van Soom A., 2004b - *Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods*. Reprod Domest Anim. 39(6):447-53.
181. Vyt P., Maes D., Sys S.U., Rijsselaere T., Van Soom A, 2007 - *Air contact influences the pH of extended porcine semen*. Reprod Dom Anim, 42:218 –20.
182. Vyt, P., Maes D., Quinten C., Rijsselaere T., Deley W., Aerts M., de Kruif A., van Soom A.. 2008 - *Detailed motility examination of porcine semen and its predictive value towards reproductive performance in sows*. Vlaams Diergeneeskd. Tijdschr. 77:291–298.
183. Waterhouse K.E., De Angelis P.M., Haugan T., Paulenz H., Hofmo P.O., Farstad W., 2004 - *Effects of in vitro storage time and semen extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry*. Theriogenology, 62:1638–51.
184. Webb G.W., Arns M.J., Harris M.A., Dekat C.L., 2005 - *Comparison of Two Containers Used for Shipment of Stallion Semen*. The Professional Animal Scientist, 21(2):133–137.
185. Wolf J., Smítal J., 2009 - *Quantification of factors affecting semen traits in AI boars from animal model analyses*. J Anim Sci, 87:1620–7.
186. Yang S.-M., Wang T., Wen D.-G., Hou J.-Q., Li H.-B., 2016 - *Protective effect of Rhodiola rosea polysaccharides on cryopreserved boar sperm*. Carbohydrate Polymers 135:44–47.
187. Yániz J.L., Palacín I., Vicente-Fiel S., Sánchez-Nadal J.A., Santolaria P., 2015 - *Sperm population structure in high and low field fertility rams*. Anim. Rep. Sci., 156: 128-134.
188. Yeste M., Briz M., Pinart E., Sancho S., Garcia-Gil N., Badia E., Bassols J., Pruneda A., Bussalleu E., Casas J., Bonet S., 2008 - *Boar spermatozoa and*

prostaglandin F2alpha. *Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F2alpha to the short-term extender over cooling time.* Anim Reprod Sci 108(1–2):180–195.

189. Yeste M., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Bonet S., 2010 - *A diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase.* Theriogenology 73:577–586.

190. Yeste M., 2013 - *Boar Spermatozoa within the Oviductal Environment (I): Sperm Reservoir.* in: Sergi Bonet, Isabel Casas, William V. Holt and Marc Yeste (Eds.), *Boar Reproduction - Fundamentals and New Biotechnological Trends.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 257-346.

191. Yi Y.J., Cheon Y.M., Park C.S., 2002 - *Effect of N-acetyl- D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibrium time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm.* Animal Reproduction Science 69: 91-97.

192. Zeng C., Peng W., Ding L., Lian H. Zhang Y., Fang D., Tang K., 2014 - *A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation.* Cryobiology 69:119–127.

[http://www.minitube.de/DE\\_eng/Products-Services/Porcine/CASA-System/AndroVision-R-CASA-Software-with-PC](http://www.minitube.de/DE_eng/Products-Services/Porcine/CASA-System/AndroVision-R-CASA-Software-with-PC)

<http://www.mibio.org/en/metrics-used>

<http://www.indoreinfertilityclinic.com/our-services/services/evaluation-male-partner/casa-computerized-sperm-analysis>

<http://www.hamiltonthorne.com/index.php/products/clinical-casa-products/ivos-ii-clinical>

<http://www.mtg-de.com/products/andrology/medealab-casa.html>

<http://www.genesdiffusion.com/porcin/gedis.aspx>

<http://www.genesdiffusion.com/porcin/collectis-mode-emploi.aspx>

<http://www.daswetter.com/historische-daten>

<http://www.wetteronline.de/wetterdaten>

<http://www.wetterkontor.de/de/wetter/deutschland/monatswerte-station>

<http://umweltdaten.nuernberg.de/wetterdaten/messstation-nuernberg-flugfeld/archiv>



## INDEX FIGURI / FIGURES INDEX

1. Figura. 1.1. Schema aparatului genital la vier în poziție fiziologică (după Cochran, 2010) / Figure 1.1. Genital tract in boar, physiological position (Cochran, 2010)
2. Figura 1.2. Glandele anexe la vier (după Ciornei, 2012) / Figure 1.2. Accessory sex glands in boar (Ciornei, 2012)
3. Figura 1.3. Spermatogeneza (după Noakes și col., 2001) / Figure 1.3. The spermatogenesis (Noakes et al., 2001)
4. Figura 1.4. Schema reglării neuro-endocrine a funcției sexuale la masculi (după Ptaszynska, 2009) / Figure 1.4. Neurohormonal regulation of sexual function in males (Ptaszynska, 2009)
5. Figura 2.1. Variația sezonieră a valorilor proteinelor totale (spațiu necolorat) și albuminei (spațiu hașurat) în plasma seminală la vier (după Murase și col., 2007) / Figure 2.1. Seasonal variations of total proteins (white) and albumins (grey) in boar seminal plasma (Murase et al., 2007)
6. Figura 3.1 Vier efectuând saltul pe manechin (după Ciornei, 2012) / Figure 3.1. Boar jumping on a dummy during semen collection (Ciornei, 2012)
7. Figura 3.2 Aplicarea de presiuni digitale asupra penisului de vier pentru recoltarea spermei (după Ciornei, 2012) / Figure 3.2. Applying manual pressure on the boar penis for semen collection (Ciornei, 2012)
8. Figura 3.3. Recoltarea materialului seminal de vier cu ajutorul dispozitivului Collectis®: aplicarea dispozitivului (a) și ejacularea fără asistență (b și c) / Figure 3.3. Boar semen collection using Collectis®: applying the device (a) and ejaculation without assistance (b and c)
9. Figura 3.4. Sistemul CASA IVOS II / Figure 3.4. CASA system IVOS II
10. Figura 3.5. Sistemul CASA cu software AndroVision® / Figure 3.5. CASA system with AndroVision® software
11. Figura 3.6. Vizualizarea probei de material seminal prin intermediul CASA / Figure 3.6. Semen sample visualization by CASA
12. Figura 3.7. Unii dintre principalii parametri cinetici evaluați prin CASA / Figure 3.7. Some seminal parameters calculated by CASA
13. Figura 3.8. Analiza morfologică și morfometrică ale spermatozoizilor folosind CASA / Figure 3.8. Analysis of sperm morphology and morphometry using CASA
14. Figura 3.9. Tipuri de recipiente utilizate în mod curent la ambalarea materialului seminal diluat în vederea conservării în stare lichidă: tub, pungă/ambalaj plat și flacon (după Althouse, 2006) / Figure 3.9. Container types

currently used for boar semen packing before storage in liquid state: tube, bag/flat pack and bottle (Althouse, 2006)

15. Figura 3.10. Sistemul de catetere utilizat pentru însămânțarea artificială intra-uterină la scroafe (după Rodríguez-Gil și Estrada, 2013) / Figure 3.10. Catheter used for intra-uterine artificial insemination in sow (după Rodríguez-Gil and Estrada, 2013)

16. Figura 3.11. Sonda-cateter Gedis / Figure 3.11. Gedis catheter

17. Figura 5.1. Tipurile de camere de analiză utilizate în cadrul studiului pentru examinarea materialului seminal de vier: Leja, MofA, și Minitube / Figure 5.1. The types of disposable sperm analytical chambers used in this study for boar sperm examination: Leja, MofA, and Minitube

18. Figura 5.2. Mobilitatea totală a spermatozoizilor în funcție de tipul de cameră și timpul scurs de la umplere / Figure 5.2. Total sperm motility according to the chamber type and time after filling

19. Figura 5.3. Mobilitatea progresivă a spermatozoizilor în funcție de tipul de cameră și timpul scurs de la umplere / Figure 5.3. Progressive sperm motility according to the chamber type and time after filling

20. Figura 6.1. Diluanții utilizați pentru diluarea materialului seminal, prezentare comercială / Figure 6.1. The extenders used for semen dilution during the study

21. Figura 6.2. Variația mobilității totale în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.2. The variation of total motility during preservation, according to the type of extender

22. Figura 6.3. Variația mobilității progresive în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.3. The variation of progressive motility during preservation, according to the type of extender

23. Figura 6.4. Variația vitezei medii în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.4. The variation of average path velocity during preservation, according to the type of extender

24. Figura 6.5. Variația vitezei curbilinii în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.5. The variation of curvilinear velocity during preservation, according to the type of extender

25. Figura 6.6. Variația vitezei în linie dreaptă în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.6. The variation of straight line velocity during preservation, according to the type of extender

26. Figura 6.7. Variația coeficientului de rectilinitate în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.7. The variation of straightness coefficient during preservation, according to the type of extender

27. Figura 6.8. Variația coeficientului de liniaritate în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.8. The variation of linearity coefficient during preservation, according to the type of extender

28. Figura 6.9. Variația coeficientului wobble în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.9. The variation of wobble coefficient during preservation, according to the type of extender

29. Figura 6.10. Variația amplitudinii de deplasare a capului în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.10. The variation of amplitude of lateral head displacement during preservation, according to the type of extender

30. Figura 6.11. Variația frecvenței de intersectare cu traiectoria medie în timpul conservării, în funcție de diluantul folosit / Figure 6.11. The variation of beat cross frequency during preservation, according to the type of extender

31. Figura 6.12. Recoltarea materialului seminal de vier prin metoda manuală / Figure 6.12. Boar semen collection by manual method

32. Figura 6.13. Recoltarea materialului seminal de vier cu ajutorul vaginului artificial / Figure 6.13. Boar semen collection by artificial vagina

33. Figura 6.14. Examinarea materialului seminal brut cu ajutorul dispozitivului SQA-Vp / Figure 6.14 Raw semen examination using SQA-Vp

34. Figura 6.15 Imagine oferită de programul SpermVision 3.7 în cadrul analizei computerizate a spermei de vier / Figure 6.15 Image showed by SpermVision 3.7 during computerized analysis of boar sperm

35. Figura 6.16. Recipientele utilizate pentru conservarea materialului seminal de vier în stare lichidă: flacon (A) și tub (B) / Figure 6.16. The types of containers used for preservation of liquid state boar sperm: bottle (A) and tube (B)

36. Figura 6.17. Variația mobilității totale în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.17. The variation of total sperm motility during preservation, according to the type of container

37. Figura 6.18. Variația mobilității progresive în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.18. The variation of progressive sperm motility during preservation, according to the type of container

38. Figura 6.19. Variația vitezei curbilinii în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.19. The variation of sperm curvilinear velocity during preservation, according to the type of container

39. Figura 6.20. Variația vitezei medii în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.20. The variation of average path velocity during preservation, according to the type of container

40. Figura 6.21. Variația vitezei în linie dreaptă în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.21. The variation of straight line velocity during preservation, according to the type of container

41. Figura 6.22. Variația coeficientului de rectilitate în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.22. The variation of straightness during preservation, according to the type of container

42. Figura 6.23. Variația coeficientului de liniaritate în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.23. The variation of linearity during preservation, according to the type of container

43. Figura 6.24. Variația coeficientului de oscilație a traiectoriei în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.24. The variation of wobble during preservation, according to the type of container

44. Figura 6.25. Variația amplitudinii de deplasare a capului în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.25. The variation of amplitude of lateral head displacement during preservation, according to the type of container

45. Figura 6.26. Variația frecvenței de intersectare cu traiectoria medie în timpul conservării, în funcție de recipientul folosit / Figure 6.26. The variation of beat cross frequency during preservation, according to the type of container

46. Figura 7.1. Influența sezonului asupra mobilității totale și progresive a spermatozoizilor / Figure 7.1. The influence of season on total and progressive motility

47. Figura 7.2. Influența sezonului asupra vitezei de deplasare a spermatozoizilor de vier din sperma conservată / Figure 7.2. The influence of season on boar sperm velocity in stored semen

48. Figura 7.3. Efectul sezonului asupra STR, LIN și WOB din sperma conservată de vier / Figure 7.3. The effect of season on STR, LIN and WOB in boar stored semen

49. Figura 7.4. Efectul sezonului asupra ALH din sperma conservată de vier / Figure 7.4. The effect of season on ALH in boar stored semen

50. Figura 7.5. Efectul sezonului asupra BCF din sperma conservată de vier / Figure 7.5. The effect of season on BCF in boar stored semen

51. Figura 8.1. Caracteristicile celor patru subpopulații de spermatozoizi identificate în sperma de vier, în ceea ce privește viteza medie și coeficientul de liniaritate (valori standardizate) / Figure 8.1. The characteristics of the four motile sperm subpopulations identified in boar semen, in terms of average path velocity and linearity (standardized values)

52. Figura 8.2. Traseele reprezentative pentru cele patru subpopulații de spermatozoizi identificate în sperma de vier / Figure 8.2. Representative motility tracks for sperm within the four motile subpopulation identified in boar semen

53. Figura 8.3. Ponderea sezonieră a subpopulațiilor de spermatozoizi în sperma de vier / Figure 8.3. The share of each motile sperm subpopulation in boar semen according to the season

54. Figura 9.1. Fotometrul ACCUCELL utilizat la determinarea concentrației materialului seminal / Figure 9.1. ACCUCELL photometer used for calculating sperm concentration during study

55. Figura 9.2. Sistemul CASA utilizat la examinarea calitativă a materialului seminal / Figure 9.2. CASA system used for sperm examination during study

56. Figura 9.3. Ambalarea automată a dozelor de IA / Figure 9.3. Automatic packing of swine AI doses

57. Figura 9.4. Doză de IA pentru scroafe / Figure 9.4. Swine AI dose

58. Figura 9.5. Însămânțarea artificială a scroafelor: introducerea cateterului de însămânțare (A) și depunerea materialului seminal (B) / Figure 9.5. Artificial insemination of sows: catheter intromission (A) and semen inoculation (B)

59. Figura 9.6. Evoluția lunară a ratei parturițiilor la scroafe / Figure 9.6. Monthly variation of farrowing rate in sows

60. Figura 9.7. Rata parturițiilor în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale / Figure 9.7. Farrowing rate according to the season of semen collection and AI

61. Figura 9.8. Evoluția lunară a prolificității la scroafe / Figure 9.8. Monthly variation of litter size in sows

62. Figura 9.9. Prolificitatea în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale / Figure 9.9. Litter size according to the season of semen collection and AI

63. Figura 9.10 Evoluția lunară a numărului de purcei vii/parturiție la scroafe / Figure 9.10. Monthly variation of the number of live piglets/parturition in sows

64. Figura 9.11. Numărul de purcei vii/parturiție în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale / Figure 9.11. The number of live piglets/parturition in sows according to the season of semen collection and AI

65. Figura 9.12. Evoluția lunară a numărului de purcei morți/parturiție la scroafe / Figure 9.12. Monthly variation of the number of stillborn/parturition in sows

66. Figura 9.13. Numărul de purcei vii/parturiție la scroafe în funcție de sezonul recoltării materialului seminal și însămânțării artificiale / Figure 9.13.

The number of stillborn/parturition in sows according to the season of semen collection and AI

## INDEX TABELE/ TABLES INDEX

1. Tabelul 2.1./Table 2.1. Valorile testosteronului seric și comparația între mobilitate și integritatea acrozomului la sperma brută și sperma decongelată, în funcție de sezon (după Cheon și col, 2002) / Serum testosterone values and comparison of sperm motility and acrosome integrity among seasons in raw and cryopreserved boar semen (Cheon et al., 2002)

2. Tabelul 2.2./Table 2.2. Variațiile sezoniere ale parametrilor spermatici la vier (după Janett și col., 2005) / Seasonal variations of main seminal parameters in boar (Janett et al., 2005)

3. Tabelul 2.3./Table 2.3. Rata fătărilor după însămânțarea artificială cu material seminal obținut în diverse perioade ale anului (după Murase și col., 2007) / Farrowing rate after artificial insemination with semen collected in various moments of the year (Murase et al., 2007)

4. Tabelul 2.4./Table 2.4. Variația parametrilor spermatici la vier în funcție de caracterul fotoperioadei (după Knecht și col., 2013) / The variation of seminal parameters in boar according to the type of photoperiod (Knecht et al., 2013)

5. Tabelul 5.1./Table 5.1. Valorile medii și deviația standard obținute în cadrul evaluării materialului seminal de vier, imediat după umplerea camerei de numărat – comparație între tipurile de cameră de analiză / Mean values and standard deviation obtained within the computer-assisted analysis of boar sperm, immediately after filling the chamber - comparison among the three types of disposable chambers

6. Tabelul 5.2./Table 5.2. Valorile medii și deviația standard obținute în cadrul evaluării materialului seminal de vier, la șase minute după umplerea camerei de numărat – comparație între tipurile de cameră de analiză / Mean values and standard deviation obtained within the computer-assisted analysis of boar sperm, at six minutes after filling the chamber - comparison among the three types of disposable chambers

7. Tabelul 5.3./Table 5.3. Valorile medii și deviația standard obținute în cadrul evaluării materialului seminal de vier, la 12 minute după umplerea camerei de numărat – comparație între tipurile de cameră de analiză / Mean values and standard deviation obtained within the computer-assisted analysis of boar sperm, at 12 minutes after filling the chamber - comparison among the three types of disposable chambers

8. Tabelul 5.4./Table 5.4. Valorile obținute pentru parametrul Concentrație, în funcție de metoda folosită. În cazul analizei computerizate, au fost utilizate trei tipuri diferite de cameră: Leja, MofA și Minitube / The values for sperm concentration, according to the method used for determination. In case of

computer-assisted sperm analysis, three different counting chambers were used: Leja, MofA and Minitube

9. Tabelul 5.5./Table 5.5. Corelații între cele trei tipuri de lame utilizate, în ceea ce privește calcularea concentrației în spermatozoizi a materialului seminal / Correlations among the three types of analyzing chambers used within the study as regards the calculated sperm concentration

10. Tabelul 6.1./Table 6.1. Valorile parametrilor seminali oferite de diluantul pe termen scurt și diluantul pe termen lung, după șapte zile de conservare / The values of seminal parameters for short-term and long-term extenders, as determined after seven days of storage

11. Tabelul 6.2./Table 6.2. Analiza Independent t-test a rezultatelor oferite de cei doi diluanți, după șapte zile de conservare (prezumția de variații egale) / Independent t-test analysis of the results offered by the two extenders, after seven days of storage (presumption of equal variations)

12. Tabelul 6.3./Table 6.3. Corelații între volumul ejaculatului și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between volume of ejaculate and seminal parameters after preservation

13. Tabelul 6.4./Table 6.4. Corelații între concentrația ejaculatului și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between concentration of raw semen and seminal parameters after preservation

14. Tabelul 6.5./Table 6.5. Corelații între mobilitatea totală a ejaculatului și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between total motility in raw semen and seminal parameters after preservation

15. Tabelul 6.6./Table 6.6. Corelații între numărul de spermatozoizi mobili/ml în sperma brută și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between the number of motile sperm/ml in raw semen and seminal parameters after preservation

16. Tabelul 6.7./Table 6.7. Corelații între proporția spermatozoidelor morfologic normali din ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between the percentage of morphologically normal spermatozoa in raw semen and seminal parameters after preservation

17. Tabelul 6.8./Table 6.8. Corelații între numărul total de spermatozoizi din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between the total number of spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

18. Tabelul 6.9./Table 6.9. Corelații între numărul total de spermatozoizi mobili din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between the total number of motile spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

19. Tabelul 6.10./Table 6.10. Corelații între numărul total de spermatozoizi morfologic normali din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between the total number of morphologically normal spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

20. Tabelul 6.11./Table 6.12. Corelații între numărul total de spermatozoizi mobili și morfologic normali din întregul ejaculat și parametrii seminali după prelucrare și conservare / Correlations between the total number of motile and morphologically normal spermatozoa within the entire ejaculate and seminal parameters after preservation

21. Tabelul 6.12./Table 6.12. Valorile parametrilor seminali în funcție de recipientul folosit, după cinci zile de conservare / The values of seminal parameters after five days of preservation, according to the type of container that was used

22. Tabelul 6.13./Table 6.13. Analiza Independent t-test a rezultatelor oferite de cele două tipuri de recipiente, după cinci zile de conservare (prezumția de variații egale) / The output of Independent t-test analyzing the values offered by the two types of containers, after five days of storage (equal variances assumed)

23. Tabelul 7.1./Table 7.1. Valorile medii sezoniere pentru principalii factori climatici înregistrați în regiunea și pe durata studiului / Seasonal mean values for the main climate factors recorded in the region and period of study

24. Tabelul 7.2./Table 7.2. Valorile parametrilor materialului seminal brut pe parcursul celor opt sezoane luate în studio / Mean values of raw semen parameters during the eight seasons considered for the study

25. Tabelul 7.3./Table 7.3. Valorile medii ale parametrilor cantitativi ai materialului seminal de vier în funcție de sezonul recoltării / Mean values of quantitative seminal parameters in boar according to the season of collection

26. Tabelul 7.4./Table 7.4. Valorile medii ale parametrilor calitativi ai materialului seminal de vier în funcție de sezonul recoltării / Mean values of qualitative seminal parameters in boar according to the season of collection

27. Tabelul 7.5./Table 7.5. Valorile medii ale parametrilor micști, cantitativi și calitativi, în funcție de sezonul recoltării / Mean values of mixed, quantitative and qualitative seminal parameters in boar according to the season of collection

28. Tabelul 7.6./Table 7.6. Valorile parametrilor cinetici ai materialului seminal de vier pe parcursul celor opt sezoane luate în studio / The values of boar sperm kinetic parameters during the eight seasons taken into study

29. Tabelul 7.7./Table 7.7. Variațiile sezoniere ale mobilității totale și progresive la spermatozoizii de vier din sperma diluată / Seasonal variations of total and progressive sperm motility in boar extended semen

30. Tabelul 7.8./Table 7.8. Efectul sezonului asupra vitezei de deplasare a spermatozoizilor / Seasonal mean values of boar sperm velocity

31. Tabelul 7.9./Table 7.9. Efectul sezonului asupra parametrilor de traiectorie ai spermatozoizilor de vier din sperma conservată / Seasonal mean values of boar sperm trajectory parameters in stored semen

32. Tabelul 7.10./Table 7.10. Valorile medii ale volumului ejaculatului la vierii cazați în condiții standardizate, în funcție de sezon / Mean values of ejaculate volume in boars held in standardized conditions, according to the season

33. Tabelul 7.11./Table 7.11. Valorile medii ale concentrației materialului seminal la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare / Mean values of sperm concentration in boars held in standardized conditions, according to the season

34. Tabelul 7.12./Table 7.12. Valorile medii ale numărului total de spermatozoizi/ejaculat la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare / Mean values of total number of sperm/ejaculate in boars held in standardized conditions, according to the season

35. Tabelul 7.13./Table 7.13. Valorile medii ale mobilității totale și progresive a spermatozoizilor la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare / Mean values of total and progressive sperm motility in boars held in standardized conditions, according to the season

36. Tabelul 7.14./Table 7.14. Valorile medii ale TMS/Ej. și TPS/Ej., la vierii întreținuți în condiții standardizate, în funcție de sezonul de recoltare / Mean values of TMS/Ej. și TPS/Ej., in boars held in standardized conditions, according to the season

37. Tabelul 8.1./Table 8.1. Dimensiunea fiecărei subpopulații în totalul spermatozoizilor luați în calcul / The size of each motile sperm subpopulation identified in boar semen

38. Tabelul 8.2./Table 8.2. Valorile medii și deviațiile standard caracteristice celor patru subpopulații de spermatozoizi identificate în sperma de vier, în ceea ce privește parametrii cinetici / Mean values and standard deviation showed by the four motile sperm subpopulations in boar semen in terms of the kinetic parameters

39. Tabelul 9.1./Table 9.1. Intervalul fătărilor la scroafe, în concordanță cu intervalul recoltărilor materialului seminal și al însămânțărilor artificiale / The period of sow farrowing, according to the time of artificial insemination

40. Tabelul 9.2./Table 9.2. Mediile lunare pentru principalii parametri seminali ai ejaculatelor utilizate la înșămânțarea scroafelor / Monthly mean values for the main parameters of ejaculates used for AI in sows

41. Tabelul 9.3./Table 9.3. Corelații între rata parturițiilor la scroafe și parametrii materialului seminal brut / Correlations between farrowing rate in sows and the main parameters of raw semen

42. Tabelul 9.4./Table 9.4. Corelații între prolificitatea la scroafe și parametrii materialului seminal brut / Correlations between litter size in sows and the main parameters of raw semen

43. Tabelul 9.5./Table 9.5. Corelații între numărul de purcei vii/parturiție la scroafe și parametrii materialului seminal brut / Correlations between the number of live piglets/parturition in sows and the main parameters of raw semen

44. Tabelul 9.6./Table 9.6. Corelații între numărul de purcei morți/parturiție la scroafe și parametrii materialului seminal brut / Correlations between the number of stillborn/parturition in sows and the main parameters of raw semen

45. Tabelul 9.7./Table 9.7. Corelații între principalii indicatori ai fertilității la scroafe / Correlations among the main indicators of sow fertility