

---

TEZĂ DE DOCTORAT

# Recoltarea, evaluarea și conservarea materialului seminal provenit din surse extragonadale la armăsar

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

---

Doctorand **Mirela Alexandra Tripon (Rus)**

---

Conducător de doctorat

**Prof. Univ. Dr. Dr.H.C. Ioan Ștefan Groza**

---



Moartea subită sau castrarea de urgență a unui armăsar valoros reprezenta în trecut pierderea definitivă a caracteristicilor sale genetice. În prezent avem posibilitatea de a recolta spermatozoizi viabili de la armăsar post-mortem și de a folosi materialul seminal cu scopul de a obține descendenți și astfel de a perpetua linii genetice superioare care altfel s-ar pierde. Mai mult, prima gestație prin inseminare artificială la această specie a fost obținută din material seminal epididimal în anul 1957.

Recoltarea materialului seminal epididimal după castrare sau moarte subită se practică cu succes la multe specii de animale domestice și sălbatice, contribuind chiar la lupta pentru menținerea efectivelor unor specii pe cale de dispariție. La cabaline, importanța rezultă și din impactul economic pe care pierderea unui armăsar valoros o poate avea prin zădărnicierea eforturilor de selecție genetică întinse uneori pe parcursul a zeci de generații. De asemenea, valoarea emoțională a cailor și includerea acestei specii în categoria animalelor companion reprezintă argumente suplimentare.

Funcțiile epididimului nu sunt pe deplin elucidate la armăsar, dar acestea pot fi deduse din câteva studii efectuate precum și din corelații cu alte specii. Epididimul poate fi divizat în trei porțiuni: porțiunea inițială ductul epididimal, două-trei zone de maturare în capul și corpul epididimului și o zonă de stocare în coada epididimului. Fluidele care provin din testicol sunt resorbite în prima porțiune a ductelor eferente și porțiunea proximală a capului epididimului fiind înlocuite de secreția proprie a epiteliului epididimal. Aceste secreții diferă pe traiectul epididimului. Spermatozoizii care părăsesc testicolul sunt infertili, însă cei de la nivelul cozii epididimului au capacitate de fertilizare. Maturarea spermatozoidelor este dependentă de expunerea la secrețiile epididimale, cu compoziție diferită în funcție de regiune. Prezența testosteronului este necesară pentru sinteza unor proteine epididimale cu rol în maturarea spermatozoidelor, cu precădere în capul și corpul epididimului. Maturarea spermatozoidelor se referă la capacitatea de fertilizare, dobândirea mobilității progresive precum și unele caracteristici de structură membranară și metabolism. Simpla stagnare a spermatozoidelor în diferite segmente ale epididimului nu este suficientă pentru maturare (Sostaric, 2008). Spermatozoizii de la nivelul capului și corpului epididimului sunt imobili, pe când cei de la nivelul cozii epididimului sunt mobili. Caracteristicile de mobilitate ale spermatozoidelor de la nivelul cozii epididimului sunt similare cu cele ale spermatozoidelor din ejaculat. Totuși, spermatozoizii de la nivelul cozii epididimului sunt rezistenți la șoc termic, spre deosebire de cei din ejaculat (Contri, 2012). Aceasta se datorează cel mai probabil expunerii spermatozoidelor la secreția glandelor anexe ale aparatului reproducător. Aceasta semnifică faptul că spermatozoizii de la nivelul cozii epididimului pot fi utilizați pentru inseminare. Stocarea spermatozoidelor maturi se face la nivelul cozii

epididimului, dar și la nivelul canalelor deferente și al ampulelor canalelor deferente. Per total, la nivelul cozii epididimului unui armăsar matur se află proximativ 54 bilioane de spermatozoizi maturi, aproximativ 61% din numărul total de spermatozoizi. Numărul de spermatozoizi de la nivelul epididimului este influențat de vârstă (Bruemmer, 2006). Deplasarea spermatozoizilor prin capul și corpul epididimului are loc prin mișcările peristaltice ale musculaturii netede. La nivelul cozii epididimului nu există contracții peristaltice, decât atunci când musculatura este stimulată să se contracte. Așadar, timpul necesar deplasării spermatozoizilor prin capul și corpul epididimului nu este influențat de ejaculare și durează în medie 4,1 zile. De aceea, fertilitatea nu este influențată de ejaculările frecvente din punctul de vedere al maturării spermatozoizilor ci se datorează concentrației lor. Perioada de timp petrecută de spermatozoizi la nivelul cozii epididimului este influențată de ejaculare și este maximal la armăsarii în repaos sexual. Eliminările de spermatozoizi se fac regulat în lipsa ejaculării, pe la nivelul uretrei. În cazul unor armăsari apare stocarea de cantități mari de spermatozoizi la nivelul cozii epididimului, precum și în ductele eferente și ampule. În acest caz, spermatozoizii menținuți la acest nivel mai mult de 7-10 zile suferă modificări semnificative cu impact asupra fertilității (Sullivan, 2005).

Aproximativ 90 bilioane de spermatozoizi se află la nivelul ductelor eferente la armăsarul matur și aproximativ 60 bilioane la armăsarii tineri. Majoritatea sunt stocați la nivelul cozii epididimului, dar până la 7% se află la nivelul ductului deferent și a ampulelor ductului deferent. Pasajul spermatozoizilor pe la nivelul epididimului are loc în 8-11 zile dintre care 4 zile constant la nivelul capului și corpului și o perioadă variabilă la nivelul cozii, influențată de frecvența ejaculării. Fagocitoza spermatozoizilor are loc extrem de rar la nivelul epididimului, așadar spermatozoizii trebuie să părăsească epididimul direct proporțional cu producția lor, aproximativ 5 bilioane spermatozoizi pe zi (Sostaric, 2008). Contracțiile ritmice ale musculaturii netede de la nivelul canalelor deferente și cozii epididimului conduc spermatozoizii la nivelul uretrei. Fenomenul de spermioastă sau ampule blocate apare la acei armăsari la care musculatura netedă de la acest nivel prezintă o disfuncție intrinsecă de contractibilitate. Se manifestă clinic prin azoospermie – în cazul blocării complete- sau infertilitate. Spermatozoizii sunt imobili până la nivelul cozii epididimului și sunt transportați pe la nivelul epididimului prin contracția musculaturii netede, secreția de prostaglandină F2alfa, de ocitocină și implicit estrogeni (Zhou, 2019). Spermatozoizii sunt stocați la nivelul cozii epididimului, canalelor deferente și a ampulelor canalelor deferente. La nivelul ampulelor și la nivelul canalelor deferente există numărul aproximativ de spermatozoizi regăsiți în ejaculat. În timpul pasajului epididimal spermatozoizii suferă câteva modificări cum sunt: remodelarea lipidelor, proteinelor și glicocalixului de suprafață, reorganizarea moleculelor acrozomale, stabilizarea

---

cromatinei nucleare, dezvoltarea căilor de semnalare, și modificarea metabolismului celular.

Mobilitatea este unul dintre cei mai importanți parametri pentru determinarea viabilității materialului seminal, dar nu se corelează direct cu capacitatea de fecundare (Amann, 1993). La părăsirea epiteliului seminifer spermatozoizii sunt imotili și se deplasează prin intermediul contracțiilor peristaltice ale ductelor seminifere. În timpul pasajului pe la nivelul epididimului au loc procese de maturare, inclusiv obținerea mobilității (Johnson, 1978).

La mamifere sunt descrise două tipuri fiziologice de mobilitate (Turner, 2006). Mobilitatea activă se caracterizează prin mișcări flagelare simetrice cu amplitudine joasă și rezultă într-o mișcare de înaintare în linie dreaptă. Aceasta este caracteristică spermatozoizilor după ejaculare și este necesară pentru înaintarea acestora până la nivelul oviductului. Este un parametru important de fertilitate întrucât fără aceasta spermatozoizii nu pot să ajungă la nivel oviductal în mod natural. Mobilitatea hiperactivă imprimă flagelului mișcări asimetrice cu amplitudine mare în mediu lichid. Aceasta imprimă spermatozoidului o mișcare circulară sau în opt. Rolul acesteia este detașarea de epiteliul tubar, înaintarea spre ovocit și penetrarea cumulus și zona pellucida (Mc Kinnon et.colab., pp 1292).

Recoltarea materialului seminal de la nivelul cozii epididimului reprezintă ultima sursă de material genetic în caz de castrare de necesitate sau moarte subită a unui armăsar cu valoare genetică crescută. Primele gestații din material seminal congelat au fost obținute la această specie cu material seminal provenit de la nivelul epididimului (Barker, 1957). Rata de succes rămâne însă mai mică, iar metoda ideală de recoltare, procesare și conservare nu este pe deplin elucidată. La nivelul cozii epididimului și a canalului deferent se află până la  $50 \times 10^9$  spermatozoizi (Amann, 1979). De aceea atunci când scopul castrării este recoltarea de material seminal de la acest nivel este necesar să se recolteze cât mai mult din canalul deferent și coada epididimului și să se oblitereze ambele capete pentru a evita pierderile de material seminal. Există două metode de recoltare, una prin lavajul retrograd (Bruemmer, 2006) iar a doua prin metoda flotației (Cary, 2004). Pentru a lava retrograd canalul deferent se cateterizează și se instilează pe la acest nivel mediu de congelare sau soluții saline tamponate, balansate cum este soluția Tirode. Aceasta se injectează la nivelul canalului deferent și proba obținută se recoltează într-un pahar steril. Utilizând această metodă se elimină necesitatea centrifugării probelor. Tehnica flotației se referă la menținerea cozii epididimului și canalului deferent într-un vas pre-umplut cu mediu de diluție, timp de 10 minute agitând vasul ușor. Canalul deferent și coada epididimului se incizează în 10-15 locații. Necesitatea de a adăuga plasmă seminală la final este controversată (Mc Kinnon, 1273).

Istoric, materialul seminal se evalua subiectiv sub microscopul optic, care permite identificarea unor caracteristici morfologice și evaluarea mobilității – procentul de spermatozoizi motili, mobilitatea progresivă, viteza și longevitatea în timpul stocării. De asemenea, se evalua concentrația, volumul, prezența urinei sau a sângelui, bacteriilor. Mai recent, evaluarea materialului seminal de armăsar se face de manieră obiectivă, cu echipamente specifice și personal instruit (Morar et. Al., 2005; Morar et. Al., 2006).

Totuși, testele clasice de mobilitate și morfologie rămân baza evaluării materialului seminal. Materialul seminal poate fi evaluat și diluat, atât timp cât se utilizează diluanți care nu încarcă mediul și se ține cont de faptul că factorii de mediu au un impact asupra parametrilor de mobilitate – căldura sau frigul excesive, ecogelul, lumina, antisepticele, osmolaritatea, pH-ul. Evaluarea subiectivă a mobilității poate să fie făcută de un utilizator experimentat, dar metodele obiective sunt preferabile. Printre acestea se află spectrofotometria, videomicrografia, fotomicrografia, etc. De departe însă cel mai frecvent utilizate sunt sistemele computerizate (CASA), mult mai accesibile și ușor de utilizat. Acestea însă au dezavantajul că nu pot evalua capacitatea de fertilizare, care depinde de foarte mulți parametri. Morfologia se evaluează sub microscopul optic la magnificație 1000x. Morfologia precum și caracteristicile celulelor germinale și somatice pot fi evaluate pe frotiuri colorate Wright, Giemsa sau cu eozină. Se recomandă evaluarea a minim 100 de spermatozoizi și notarea defectelor întâlnite. Acestea se clasifică ca primare, secundare sau terțiare. Cele primare se consideră ca fiind defecte genetice și au sursă testiculară. Cele secundare au originea în ductele excurente iar cele terțiare se datorează manipulării și/sau depozitării defectuoase după ejaculare. Defectele de morfologie se corelează pozitiv cu mobilitatea spermatozoidelor, atât pozitiv cât și negativ. Așadar, un număr mic de spermatozoizi cu defecte de morfologie împreună cu o mobilitate scăzută sunt indicatori ai manipulării defectuoase post ejaculare (Morar et. Al., 2006). Materialul seminal mai poate fi evaluat utilizând unii markeri biochimici specifici sau nespecifici.

În contextul unei creșteri a valorii materiale și sentimentale a cabalinelor, a evoluției tehnologice și a cercetării limitate asupra recoltării de material seminal post-mortem scopurile acestei lucrări au fost următoarele:

- Evaluarea efectelor unor factori asupra concentrației și parametrilor kinematici ai spermatozoidelor epididimali de armăsar:
  - anestezia totală și anestezia locală;
  - metoda de recoltare;
  - metoda de procesare după recoltare: centrifugarea și refrigerarea;
  - factori externi: vârsta, sezonabilitatea, diluanții pentru material seminal.

- Studiul canalelor deferente și al ampulelor canalelor deferente (post-mortem) la armăsar.
- Descrierea tehnicii de aspirație a spermatozoizilor situați la nivelul ampulelor canalelor deferente intraoperator (dezvoltată în cadrul colectivului).
- Raportarea caracteristicilor spermatozoizilor ampulari în comparație cu cei epididimali.

**Prima parte (I)** este structurată în două capitole. Capitolul I.1 cuprinde date despre anatomia, fiziologia, endocrinologia și patologia aparatului genital al armăsarului precum și un studiu extensiv asupra caracteristicilor spermatozoizilor de armăsar. Capitolul I.2 descrie metodele de recoltare, evaluare și conservare ale materialului seminal de armăsar.

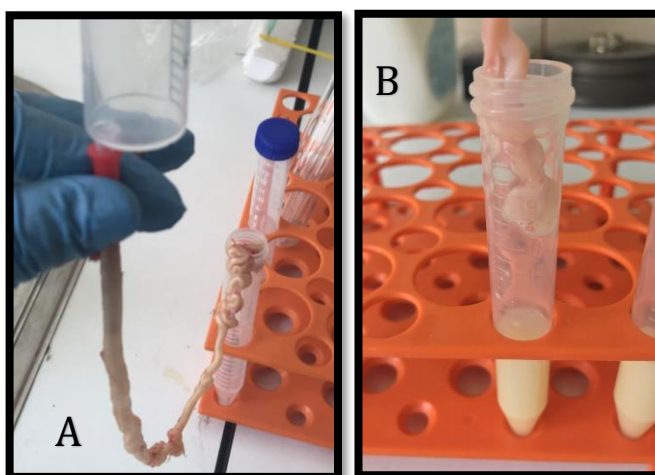
**Partea a doua (II)** este alcătuită din șase capitole dintre care primul cuprinde ipotezele de lucru și scopul, al doilea cuprinde prezentarea materialelor și metodelor de lucru, urmat de două capitole axate pe: recoltarea, conservarea și evaluarea materialului seminal provenit de la nivelul epididimului de armăsar (Capitolul II.5) și recoltarea, evaluarea și conservarea materialului seminal provenit de la nivelul ampulelor canalelor deferente (Capitolul II.6). La final sunt prezentate concluziile generale ale studiului, recomandările, elementele de originalitate și bibliografia care cuprinde 350 de titluri.

**Capitolul II.5** a avut ca principale obiective evaluarea factorilor care influențează concentrația și parametri kinematici ai spermatozoizilor epididimali de armăsar după cum urmează:

- anestezia locală și generală
- metoda de recoltare
- centrifugarea, refrigerarea
- vârsta, sezonalitatea, mediile de diluție.

În vederea îndeplinirii primului obiectiv am alcătuit două loturi de armăsari prezentați pentru orhidectomie dintre care primul lot a fost anesteziat utilizând un protocol total intravenos (TIVA n=96) și al doilea lot a fost anesteziat utilizând un protocol parțial intravenos (PIVA n=36). Din lotul TIVA am extras un număr de 10 armăsari cărora le-am injectat lidocaină intratesticular înainte de orhidectomie. După castrare testiculele au fost transportate în condiții de refrigerare până la laboratorul echipat pentru extragerea și evaluarea spermatozoizilor epididimali. Probele au fost evaluate utilizând un sistem computerizat CASA (SCA® 103 Production, MICROPTIC). Pentru fiecare probă au fost înregistrați computerizat următorii parametri:

Concentrație, PM- mobilitate progresivă; TM- mobilitate totală; VCL- viteză curbilinie; VSL - viteză liniară; VAP - viteza medie; LIN - linearitate; STR - deplasare liniară. Protocolul anestezic Tiva conduce la medii semnificativ mai mari decât protocolul anestezic Piva pentru variabilele Mobilitate progresivă ( $p=0,001$ ), Mobilitate totală ( $p=0,002$ ), Viteză curbilinie ( $p=0,017$ ), Viteză liniară ( $p=0,007$ ) și Viteză medie ( $p=0,010$ ). În ceea ce privește anestezia locală cu lidocaină parametri TM, VCL și VAP nu au demonstrat diferențe semnificative statistic în timp ce valorile PM și LIN au înregistrat valori diferite cu semnificație statistică doar atunci când s-a utilizat diluant pe bază de gălbenuș de ou.



**Fig. 1. A.** Lumenul canalului deferent este cateterizat cu un ac cu vârful bont pentru lavaj retrograd **B.** Aspectul probei de material seminal epididimal imediat după recoltarea prin lavaj retrograd.

În vederea îndeplinirii celui de-al doilea obiectiv am recoltat un număr de 146 de probe de material seminal utilizând fie metoda lavajului retrograd cu aer ( $n=29$ )(Fig.1 A,B), lavaj retrograd cu mediu de diluție ( $n=88$ ) sau metoda flotației ( $n=17$ ). Diferențe semnificative (la un prag  $p<0,01$ ) au apărut între mediile înregistrate în cazul variabilelor Concentrație, Volum, Mobilitate progresivă, Mobilitate totală, Viteză curbilinie, Viteză liniară și Viteză medie. În cazul variabilei Concentrație, media este mult mai mică decât mediile pentru celelalte două protocoale. În cazul variabilei Volum media pentru protocolul Flush mediu este mult mai mică decât mediile pentru celelalte două protocoale. În ceea ce privește variabila Mobilitate progresivă, media pentru protocolul Flotație este mai mare decât mediile pentru celelalte două protocoale. Mediile variabilei Mobilitate totală diferă semnificativ, media pentru Flotație fiind mai mare decât celelalte două medii. Pentru variabila Viteză curbilinie

media pentru Flotație este mult mai mare decât celelalte două medii. Media variabilei Viteză liniară pentru protocolul Flotație este mai mare. În cazul variabilei Viteză medie media pentru Flotație este mai mare decât celelalte două medii.

Pentru îndeplinirea celui de-al treilea obiectiv am efectuat două loturi de probe centrifugate (n=47) timp de 10 minute la 600G și respectiv probe necentrifugate (n=95). De asemenea am utilizat două protocoale diferite de refrigerare: primul se referă la refrigerarea testiculelor timp de 24, 48 sau 72 de ore înainte de recoltarea spermatozoizilor epididimali iar al doilea la refrigerarea timp de 24,48 sau 72 de ore a probelor epididimale recoltate, urmate de evaluarea concentrației și a parametrilor kinematici.

Pentru niciuna dintre variabile nu apar diferențe semnificative (la pragul  $p=0,05$ ) între media probelor centrifugate și media probelor necentrifugate.

Diferențe semnificative (la un prag  $p<0,01$ ) apar între mediile înregistrate la momente diferite de recoltare pentru variabilele Mobilitate progresivă, Mobilitate totală, Viteză curbilinie, Viteză liniară și Viteză medie. În cazul tuturor acestor variabile media la momentul 24 este mai mare decât celelalte două medii și pentru fiecare pereche de momente mediile diferă semnificativ între cele două momente ( $p<0,001$ ). Adică, diferă semnificativ mediile între momentele 24 și 48, 24 și 72 și 48 și 72. Pentru toate variabilele dependente la care mediile diferă semnificativ între intervalele de refrigerare și între momentele de recoltare, pentru fiecare interval de refrigerare (24, 48 și 72), media cea mai mare apare la recoltarea la 24 de ore și media cea mai mică la recoltarea la 72 de ore.

De asemena, diferențe semnificative (la un prag  $p<0,01$ ) apar între mediile înregistrate la perioade diferite de refrigerare pentru variabilele Mobilitate progresivă, Mobilitate totală, Viteză curbilinie, Viteză liniară și Viteză medie. În cazul tuturor acestor variabile media la momentul 24 este mai mare decât celelalte două medii.

În vederea îndeplinirii celui de-al patrulea obiectiv am alcătuit câte două loturi pentru fiecare parametru evaluat: efectul vârstei - armăsarii cu vârsta sub 5 ani (n=84) și armăsarii cu vârsta peste 5 ani (n= 58), efectul sezonality - Octombrie- Februarie (n=73) - extrasezon și Martie-Septembrie (n=42) - sezon, efectul diluantului: Gent, Minitube (n=73) și Equi Plus (n=69).

Între intervalele de vârstă 0-5 ani și 5+ ani mediile diferă semnificativ numai pentru variabila Concentrație ( $p<0,001$ ). Între cele două sezoane mediile diferă semnificativ numai pentru variabilele Mobilitate totală ( $p=0,005$ ) și Linearitate ( $p=0,041$ ).



Pentru niciuna dintre variabile nu apar diferențe semnificative (la pragul  $p=0,05$ ) între media probelor pentru care s-a folosit diluantul Gent și media probelor la care s-a utilizat diluantul Equi.

Concluziile acestui studiu sunt prezentate succint în tabelul 1.

**Tabel 1/Table 1**

**Rezultate generale - Variabilele dependente ale căror medii diferă semnificativ între ele în funcție de valorile variabilelor independente**

**General results - dependent variables whose mean significantly differ between them depending on the values of the independent variables**

Variabila dependentă	Variabila independentă							
	Refrigerare	Protocol anestezic	Protocol de recoltare	Centrifugare	Diluanți	Vârștă	Sezon	Moment de recoltare
Concentrație (M/ml)			X			X		
Volu (mL)			X					
Mobilitate progresivă (%)	X	X	X					X
Mobilitate totală (%)	X	X	X				X	X
Viteză curbilinie (mm/s)	X	X	X					X
Viteză liniară (mm/s)	X	X	X					X
Viteză medie (mm/s)	X	X	X					X
Linearitate (%)							X	
Direcție (%)								

*Observație.* Pentru fiecare variabilă independentă s-a notat X atunci când mediile variabilei dependente diferă semnificativ în funcție de valorile variabilei independente.

*Observation.* For each independent variable, X was denoted when the averages of the dependent variable differ significantly depending on the values of the independent variable.

**Capitolul II.6** a avut ca principale obiective următoarele:

- măsurarea canalelor deferente și a ampulelor canalelor deferente pe piese provenite de la armăsari decedați;
- descrierea unei tehnici chirurgicale de recoltare a materialului seminal ampular în timpul intervenției de orhidectomie;
- evaluarea materialului seminal provenit din ampule și canalele deferente;
- evaluarea comparativă a materialului seminal ampular cu cel epididimal.

În vederea îndeplinirii obiectivelor acestui studiu am realizat o primă etapă pe piese provenite de la cadavre de armăsari pe care am efectuat măsurarea canalelor deferente, a ampulelor canalelor deferente și am efectuat cateterizarea ampulelor în scopul aspirării conținutului ampular. În etapa a doua am recoltat material seminal ampular (Fig. 2) de la 10 armăsari în timpul intervenției chirurgicale de orhidectomie și am comparat parametric kinematici luând ca lot martor probele epididimale provenind de la același armăsar.

Lungimea medie a ductului deferent măsurată de la emergența de la nivelul cozii epididimului și incluzând ampula canalului deferent a fost de  $69.9 \pm 1.4$  cm. Lungimea și lățimea ampulei canalului deferent măsurată pe exterior a fost în medie de  $17.6 \pm 1.8$  cm și respectiv  $3.9 \pm 0.3$  cm. Lungimea și lățimea medie a lumenului ampular a fost  $16.5 \pm 1.7$  cm respectiv  $3.4 \pm 1.3$  mm.

Au fost aspirate cu succes 14 ampule deferențiale dintre cele 20 în timpul orhidectomiei electivă. La doi dintre armăsari conținutul aspirat a fost urină, fapt demonstrat prin aspectul macroscopic dar și datorită concentrației de creatinină (Crea = 20.7 mg/dl). La unul dintre armăsari s-au aspirat câte 3 ml de conținut din ambele ampule. Substanța recoltată a fost reprezentată de o masă densă de spermatozoizi neviabili, detritusuri celulare, celule epiteliale iar diagnosticul de stază ampulară a fost stabilit.

Concentrația medie a spermatozozilor ampulari (AS) per armăsar a fost de  $752.8 \pm 370.2 \times 10^6$  (de la  $353 \times 10^6$  până la  $1338.4 \times 10^6$ ) iar numărul mediu de spermatozoizi epididimali (ES) a fost de  $12695.2 \pm 5609 \times 10^6$  (de la  $5342 \times 10^6$  până la  $21245 \times 10^6$ ). Între parametri PM, VCL, VSL, VAP, LIN și STR nu au existat diferențe semnificative statistic între cele două loturi AS și ES ( $p \leq 0.05$ ). TM a fost semnificativ redusă în lotul AS ( $p = 0.04$ ).



**Fig. 2.** Recoltarea materialului seminal de la nivelul ampulei canalului deferent în timpul orihidectomiei. Canalul deferent este cateterizat retrograd până la nivelul ampulei de unde se aspiră materialul seminal stocat.

**Capitolul II.7** prezintă concluziile și recomandările generale ale studiului:

1. Anestezia general utilizată în timpul castrării are un impact negativ asupra calității materialului seminal epididimal de armăsar;
2. Anestezia locală cu lidocaină nu are un impact negativ asupra materialului seminal epididimal;
3. Cea mai bună tehnică de recoltare a materialului seminal de la nivelul cozii epididimului este reprezentată de insuflarea retrogradă cu aer;
4. Centrifugarea nu ameliorează parametri de mobilitate, așa cum se întâmplă în cazul materialului seminal provenit din ejaculat;
5. Recoltarea materialului seminal în primele 24 de ore menține superioară calitatea spermatozoizilor epididimali;
6. Refrigerarea este o tehnică viabilă de conservare a materialului seminal epididimal;

7. Vârsta armăsarului influențează concentrația materialului seminal epididimal dar nu și parametri de mobilitate;
8. Sezonul de recoltare influențează parametri de mobilitate dar nu și concentrația;
9. Diluanții pentru material seminal pe bază de lapte sunt similari cu cei pe bază de gălbenuș de ou în ceea ce privește parametri de mobilitate;
10. Recoltarea materialului seminal de la nivelul ampulelor canalelor deferente crește cu aproximativ 6% volumul total de spermatozoizi recoltați;
11. Mobilitatea spermatozoizilor ampulari este similară cu a celor epididimali;

## BIBLIOGRAFIA

1. AMANN RP, THOMPSON DL, SQUIRES EL, PICKETT BW., 1979, Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *J Reprod Fertil Suppl*;27:1-6.
2. AMANN RP, GRAHAM JK. , 1993, Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine Reproduction. Media, PA: Williams &Wilkins*; pp. 715-45.
3. BARKER JAV, GANDIER JCC., 1957, Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med*;21:45-51.
4. BRUEMMER JE., 2006, Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Vet Clin North Am Equine Pract. Dec*;22(3):677-82.
5. CARY JA, SCOTT M, FARNSWORTH K, HAYNA J, DUOOS L, FAHNING ML., 2004, A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J*; 45:35-41.
6. CONTRI A, GLORIA A, ROBBE D, DE AMICIS I, CARLUCCIO A., 2012, Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology. Jan 1*;77(1):166-73.
7. JOHNSON L, AMANN RP, PICKETT BW., 1978, Scanning electron and light microscopy of the equine seminiferous tubule. *Fertil Steril* 1978;29:208-15.
8. MCKINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, WARNER DD., 2011, Equine Reproduction. Second edition. Volume 1. Blackwell Publishing.
9. MORAR I., GROZA I., BOGDAN L., SIMONA CIUPE, CĂȚANĂ R., 2005, Researches concerning the evaluation of stallion semen for cryopreservation, *Buletinul USAMV, Cluj-Napoca, 62- 2005*.
10. MORAR I., GROZA I., CĂȚANĂ R., BOGDAN L., 2006, Cercetări referitoare la evoluția mobilității și viabilității spermatozoizilor de armăsar după decongelare. *Buletin Usamv Iași*
11. SOSTARIC E, AALBERTS M, GADELLA BM, STOUT TA., 2008, The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 2008 Sep;107(3-4):237-48.
12. TURNER RM., 2006, Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006;18: 25-38.
13. ZHOU R, WU J, LIU B, JIANG Y, CHEN W, LI J, HE Q, HE Z., 2019, The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Jul;76(14):2681-2695.