

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE

DOMENIUL DE DOCTORAT BIOLOGIE

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND STUDIAREA FUNCȚIILOR
MEMBRANELOR CELULELOR SPERMATICE SUPUSE
DIFERITELOR TRATAMENTE CRIOBIOLOGICE**

Conducător de doctorat

Prof.univ.dr. **COPREAN DRAGOMIR**

Student-doctorand

DOBRIN NICOLAE

CONSTANȚA, 2016

CUPRINS

	pagina
INTRODUCERE	6
Partea I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	9
Capitolul 1. MEMBRANA PLASMATICĂ	9
1.1. Morfologia și structura membranei plasmatice	9
1.2. Fluiditatea membranei plasmatice	12
1.3. Structura membranei celulare spermatice	13
1.4. Dinamica organizării membranei celulare spermatice	15
1.5. Deteriorarea membranei plasmatice a celulei spermatice în procesul de crioconservare	18
Capitolul 2. METODE MODERNE DE EVALUARE A INTEGRITĂȚII MEMBRANEI PLASMATICE	25
2.1. Citometria în flux	25
2.1.1. Metode moderne de citometrie în flux utilizate pentru analiza funcțiilor celulelor spermatice	28
2.2. Microscopia electronica de transmisie (TEM) și morfologia celulei spermatice umane	33
PARTEA a II-A CERCETĂRI PERSONALE	37
Capitolul 1. MATERIALE ȘI METODE	37
1.1. Metode optice de analiză	37
1.1.1. Aprecierea motilității spermatozoizilor	37
1.1.2. Integritatea structurală a membranelor plasmatice (viabilitatea) – folosită pe teren exclusiv pentru experimentul 6	38
1.1.3. Integritatea funcțională a membranei plasmatice	39
1.2. Metode de citometrie în flux	39
1.2. 1. Determinarea viabilității celulelor spermatice prin citometrie în flux	39
1.2.2. Evaluarea funcției mitocondriale prin citometrie în flux cu Rodamină (R123)	42
1.3. Metode de microscopie electronică de transmisie	43
1.5. Iradierea cu laser	46
1.6. Analiza statistică a datelor experimentale	48

Capitolul 2. REZULTATE ȘI DISCUȚII	50
Experiment 1. Efectul variației temperaturii și timpului de decongelare asupra calității materialului seminal congelat-decongelat de berbec	50
Experiment 2. Variația temperaturii și timpului de decongelare asupra ultrastructurii celulei spermatice crioconservate de berbec	62
Experiment 3. Efectul variației temperaturii și timpului de decongelare asupra calității materialului seminal congelat-decongelat de țap	74
Experiment 4. Variația temperaturii și timpului de decongelare asupra ultrastructurii celulei spermatice crioconservate de țap	83
Experiment 5. Studiu asupra efectelor expunerii la diferite doze de energie generate de un laser cu He-Ne asupra calității materialului seminal congelat-decongelat de berbec și țap	93
Experiment 6. Testarea <i>in vivo</i> a spermei congelate supuse experimentelor de decongelare la temperaturi diferite și iradiate	102
Capitolul 3. CONCLUZII GENERALE	109
PRINCIPALELE CONTRIBUȚII PERSONALE	113
BIBLIOGRAFIE	114
ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ	143
Lucrări publicate în reviste cotate de Institutul pentru Informația Științifică (ISI)	143
Alte lucrări publicate	143
Lucrări publicate în rezumat în cadrul volumelor de conferințe, simpozioane naționale și internaționale	144
Participare la sesiuni științifice, simpozioane, conferințe naționale și internaționale	146
Participare la proiecte naționale și internaționale de cercetare științifică	147
Participare la stagii de pregătire profesională	147
Brevete de invenție	147

INTRODUCERE

Crioconservarea materialului seminal este o metodă utilizată pe scară largă la înșămânțările artificiale, deoarece facilitează diseminarea materialului genetic valoros chiar și pentru turme mici de animale, ceea ce duce la creșterea calității fondului genetic. Materialul seminal congelat ambalat în diferite forme (paiete, fiole de sticlă sau pastile) a devenit metoda universal acceptată de stocare și transfer genetic la ovine și caprine, procedură care depinde de menținerea activității funcționale a spermatozoizilor (viabilitatea și capacitatea de fertilizare). În procesul de congelare are loc oprirea oricărei activități biologice până la decongelare (Jondet, 1972). Etapa de decongelare readuce celula spermatică la temperatura corporală, cu reactivarea metabolismului, astfel că, decongelarea trebuie făcută cu grijă, pentru a evita deteriorarea ei (Bearden și colab., 2004). Până în prezent au fost efectuate numeroase studii pentru a determina temperatura și durata optimă de decongelare, crescând în felul acesta interesul privind cunoașterea vitezei de decongelare adecvate care poate da cel mai mare procent de spermatozoizi viabili după procesul de decongelare (Pace și colab., 1981; Dhami și Sahni, 1993). Bearden și colab. (2004) definesc procesul de decongelare a materialului seminal stocat în paiete ca fiind viteza de decongelare a acestuia la o anumită temperatură, într-un anumit interval de timp. Interacțiunea diversilor factori în procedurile de decongelare afectează motilitatea spermei după decongelare, cum ar fi tipul de diluant, concentrația de glicerol, modul de ambalare a materialului seminal, viteza de răcire, manipularea materialului seminal pe parcursul procedurii de crioconservare (Rodriguez și colab., 1975), precum și condițiile experimentale, cum ar fi dotările disponibile, aparatura și reactivii, ce variază de la o țară la alta ori chiar de la o zonă la alta (Vishwanath și Shannon, 2000; Thibier și Wagner, 2002). Astfel, metodele de congelare și decongelare ale materialului seminal ar trebui să fie examinate în funcție de fiecare specie și rasă (Hayashi și Isobe, 2005).

Chiar dacă distrugerile criogenice de bază pot fi morfologice și duc la disfuncția celulară, stresul fizic suferit de membrana spermatică în timpul procesului de congelare trebuie să fie considerat ca factor limitant în realizarea unei fecundități acceptabile (Pesch și Bergmann, 2006). Chiar dacă motilitatea spermei și evaluările morfologice pot fi folosite ca metode rapide de analiză a unei probe de material seminal decongelat, aceste teste nu pun în evidență modificările morfologice în cazul defectelor de mărime nanometrică (Crespilho și colab., 2006). Diferite zone ale membranei plasmatice a celulei spermatică

joacă roluri diferite în funcționarea și supraviețuirea celulei spermatice. Componentele structurale ale capului, piesei intermediare și flagelului răspund diferit la șocul termic și osmotic în timpul conservării prin refrigerare sau congelare (Nagy și colab., 1999). Folosirea microscopiei electronice de transmisie (TEM) ca metodă pentru evaluarea calitativă a materialului seminal, favorizează stabilirea unui diagnostic complementar precis al capacității fertilizante a acestuia.

Crioconservarea modifică capacitatea comportamentală și funcțională a spermatozoizilor, ceea ce duce la reducerea motilității și capacității acestora de a traversa cervixul, precum și la scăderea viabilității lor în tractul reproductiv femel (Salamon și Maxwell, 1995). Aceste modificări duc frecvent la obținerea unui nivel inacceptabil de scăzut al fertilității la oile și caprele inseminate cu spermă congelată (Gillan și colab., 1999). De aceea, se impune găsirea unor noi procedee menite să îmbunătățească calitatea spermatozoizilor crioconservați. Iradierea spermatozoizilor cu ajutorul unui laser cu Helium-Neon (He-Ne) este o metodă nouă prin care efectul foto-stimulativ al iradierii cu laser a diferitelor sisteme biologice este demonstrat (Lubart și Breitbart, 2000). De exemplu, la celulele somatice, iradierea stimulează eliberarea factorului de creștere al fibroblaștilor (Yu și colab., 1994) și accelerează mitoză acestora (Lubart și colab., 1992a), regenerează musculatura scheletică și repară țesutul osos (Bibikova și colab., 1994). Iradierea cu laser He-Ne poate îmbunătăți, de asemenea, potențialul fertilizant al spermei, prin accelerarea transportului Ca^{2+} prin membrana mitocondriilor spermatice precum și prin membrana plasmatică a celulelor spermatice iradiate (Lubart și colab., 1992b, 1997; Breitbart și colab., 1996; Ocana-Quero și colab., 1997; Cohen și colab., 1998). În mitocondriile izolate iradierea cu laser He-Ne induce o creștere a potențialului electrochimic și o sinteză suplimentară de ATP la nivelul mitocondriilor care produc mai multă energie și influențează pozitiv motilitatea spermei (Passarella și colab., 1984). De asemenea și alți autori au demonstrat că motilitatea celulelor depinde de creșterea disponibilității energiei metabolice (Ruiz-Pesini și colab., 2000; Corral-Baqués și colab., 2005, 2009). A fost demonstrat că iradierea cu laser a îmbunătățit calitatea spermei refrigerate la iepuri și curcani (Iaffaldano și colab., 2005; Iaffaldano și colab., 2010).

Literatura de specialitate oferă date puține și uneori contradictorii privind metodele de îmbunătățire a calității spermei de berbec și țap și mai ales foarte puțin susținute sub aspect morfologic, cunoscând faptul că, orice celulă care nu are membrana celulară integră este condamnată la moarte. În acest context s-au stabilit obiectivele de cercetare ale prezentei teze de doctorat.

Obiectivele cercetărilor au fost:

- determinarea procedurii optime de decongelare, în scopul de a cunoaște viteza de decongelare adecvată care poate da cel mai mare procent de spermatozoizi viabili după decongelare;
- evaluarea relației dintre această tehnică de decongelare și supraviețuirea în timpul incubării la 37 °C a celulelor spermatice decongelate;
- stabilirea modificărilor ultrastructurale după congelarea-decongelarea spermatozozilor de berbec la diferite viteze de decongelare (temperatură, timp) și corelațiile dintre acestea și parametrii citologici;
- investigarea ipotezei conform căreia iradierea cu laser, în diferite doze de energie de iradiere (3.96 și 6.12 J/cm²) poate îmbunătăți indicii spermatici și criobiologici ai spermei de berbec și țap după procesul de congelare-decongelare;
- testarea *in vivo* a spermei decongelate de berbec și țap, după îmbunătățirea calității prin decongelare ultrarapidă și iradiere cu laser.

Cuvinte cheie: membrană celulară spermatică, citometrie în flux, TEM, laser He-Ne, funcție mitocondrială, motilitate, viabilitate

Teza de doctorat cuprinde:

Partea generală este alcătuită din două capitole însumând 28 de pagini și 4 figuri.

Partea personală alcătuită din trei capitole însumând 111 de pagini, 336 referințe bibliografice, 91 figuri, 11 tabele și 4 grafice.

Notă: Tabelele și figurile inserate în rezumatul tezei de doctorat păstrează numerotarea originală din teză. Cuprinsul din rezumat este cel regăsit în cadrul tezei de doctorat.

Partea I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Capitolul 1. MEMBRANA PLASMATICĂ

Acest capitol este structurat în cinci subcapitole ce analizează aspecte ce țin de morfologia și structura membranei plasmatice, fluiditatea membranei plasmatice, structura membranei celulei spermatice, dinamica organizării membranei celulei spermatice și deteriorarea membranei plasmatice a celulei spermatice în procesul de crioconservare.

Capitolul 2. METODE MODERNE DE EVALUARE A INTEGRITĂȚII MEMBRANEI PLASMATICE

Acest capitol este structurat în două subcapitole ce au ca scop descrierea principalelor metode moderne de evaluare a integrității membranei plasmatice, și anume, citometria în flux și microscopia electronica de transmisie (TEM).

PARTEA A II-A CERCETĂRI PERSONALE

Capitolul 1. MATERIALE ȘI METODE

Cercetările științifice s-au realizat în cadrul Laboratorului de Reproducție și Biotehnologii din cadrul Institutul de Cercetare–Dezvoltare pentru Creșterea Ovinelor și Caprinelor Palas, Constanța, și în Laboratorul de Biologie Celulară al Facultății de Științe ale Naturii și Științe Agricole din cadrul Universității “Ovidius” din Constanța sub îndrumarea prof.univ.dr. Zamfirescu Stela și a prof.univ.dr. Dragomir Coprean.

În cadrul acestui capitol am descris principalele metode utilizate în cadrul experimentelor, divizate în:

- **metode optice de analiză:** aprecierea motilității spermatozoizilor, integritatea structurală a membranelor plasmatice, viabilitatea (folosită pe teren exclusiv pentru experimentul 6) și integritatea funcțională a membranei plasmatice;
- **metode de citometrie în flux:** determinarea viabilității celulelor spermatice prin citometrie în flux, evaluarea funcției mitocondriale prin citometrie în flux cu Rodamină (R123);

- **metode de microscopie electronică de transmisie:** metodă de evaluare morfologică a materialului seminal de berbec brevetată;
- **iradierea cu laser:** energizarea probelor cu ajutorul unui laser cu He-Ne;
- **analiza statistică a datelor experimentale:** utilizarea programului statistic SPSS IBM, versiunea 17.

Capitolul 2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Experiment 1. Efectul variației temperaturii și timpului de decongelare asupra calității materialului seminal congelat-decongelat de berbec

Obiective:

- determinarea procedurii optime de decongelare, în scopul de a cunoaște viteza de decongelare adecvată care poate da cel mai mare procent de spermatozoizi viabili după decongelarea materialului seminal de berbec;
- evaluarea relației dintre această tehnică de decongelare și supraviețuirea celulelor spermatice după decongelare pe timpul incubării la 37 °C.

Animale: s-au recoltat probe de spermă de la 5 berbeci adulți de rasă Merinos de Palas, cu fertilitate cunoscută. S-a prelucrat un număr total de 86 ejaculate. Materialul seminal a fost crioconservat în paiete fine de 0.25 ml. Decongelarea s-a făcut pe baie de apă.

Ca variante de decongelare au fost testate:

- decongelarea la 90°C, timp de 2 secunde
- decongelarea la 75°C, timp de 5 secunde
- decongelarea la 75°C, timp de 10 secunde
- decongelarea la 50°C, timp de 30 secunde
- decongelarea la 39°C, timp de 120 secunde

Rezultate și discuții

Obiectivul cercetărilor a fost acela de a determina experimental influența unor factori (timp și temperatură) de decongelare diferiți asupra unor parametri citologici ai celulei spermatice după decongelare, în scopul stabilirii unei variante optime care să afecteze cât mai puțin celula pe parcursul acestui proces.

În acest sens materialul seminal crioconservat a fost decongelat prin 5 variante și s-au analizat activitatea mitocondrială, viabilitatea celulară (prin citometrie în flux),

motilitatea și integritatea funcțională a membranei plasmatică (testul HOST). De asemenea, viabilitatea a fost studiată pe parcursul a trei ore după decongelare.

Se observă ca cele mai bune valori ale motilității (tabel 2) s-au obținut prin decongelarea paietelor la 50°C timp de 30 de secunde. Decongelarea la 39 °C timp de 120 de secunde a condus, de asemenea, la o valoare crescută a motilității, între cele 2 variante neexistând diferențe semnificative statistic. Creșterea temperaturii de decongelare conduce la scăderea motilității. Atât la 75°C, în cele 2 variante de timp, cât și la 90° C s-au înregistrat valori semnificativ mai mici comparativ cu primele 2 variante de decongelare ($p < 0,05$).

Tabel 2 Variația parametrilor calitativi ai materialului seminal decongelat prin diferite metode

Temperatura și timpul de decongelare	N (nr. de probe)	Caracteristicile materialului seminal			
		Motilitate (%)	Viabilitate (%)	Activitate mitocondrială (%)	HOST (%)
Decongelare la 39°C timp de 120"	12	39 ± 2.08^a	45.61 ± 1.83^a	37.03 ± 1.66^a	38.97 ± 1.84^a
Decongelare la 50°C timp de 30"	12	45 ± 2.24^a	52.47 ± 2.25^a	40.66 ± 2.36^a	46.35 ± 2.55^a
Decongelare la 75°C timp de 10"	12	20 ± 1.83^b	27.16 ± 1.86^b	22.07 ± 2^b	19.3 ± 2.07^b
Decongelare la 75°C timp de 5"	12	30 ± 1.83^c	34.48 ± 1.82^c	28.52 ± 1.81^b	31.97 ± 1.41^c
Decongelare la 90°C timp de 2"	12	10 ± 1.29^d	15.34 ± 1.32^d	7.1 ± 1.37^c	11.36 ± 1.36^d

^{a-d} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

Procentul de spermatozoizi viabili (tabelul 2) indică faptul că decongelarea la 50° C timp de 30 de secunde și la 39° C timp de 120 de secunde conduce la obținerea unor viabilități superior semnificative statistic ($p < 0.05$) față de cazul decongelării la 75° C și

90° C. Decongelarea la 75° C conduce la rezultate semnificativ crescute pentru un timp de 5 secunde față de 10 secunde.

Rezultate similare s-au obținut și pentru integritatea funcțională a membranelor (testul HOST). Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru temperaturile de 50° C, respectiv 39° C, valorile fiind semnificativ mai mari ($p < 0.05$) față de celelalte variante.

Citogramele biparametrice (talie celulară/densitate) (figurile 12, 13, 14, 15 și 16) evidențiază prezența a 4 subpopulații:

- subpopulația 1, marchează spermatozoizii morți, colorați în roșu cu iodură de propidiu;
- subpopulația 2, marchează spermatozoizii viabili, colorați în verde cu SYBR-14;
- subpopulația 3, colorată în albastru, include alte particule și nu a fost luată în calcul, deoarece nu reprezintă o populație spermatică;
- subpopulația 4, spermatozoizi care prezintă o dublă colorație cu ambii fluorocromi, apar mov și sunt considerați "muribunzi".

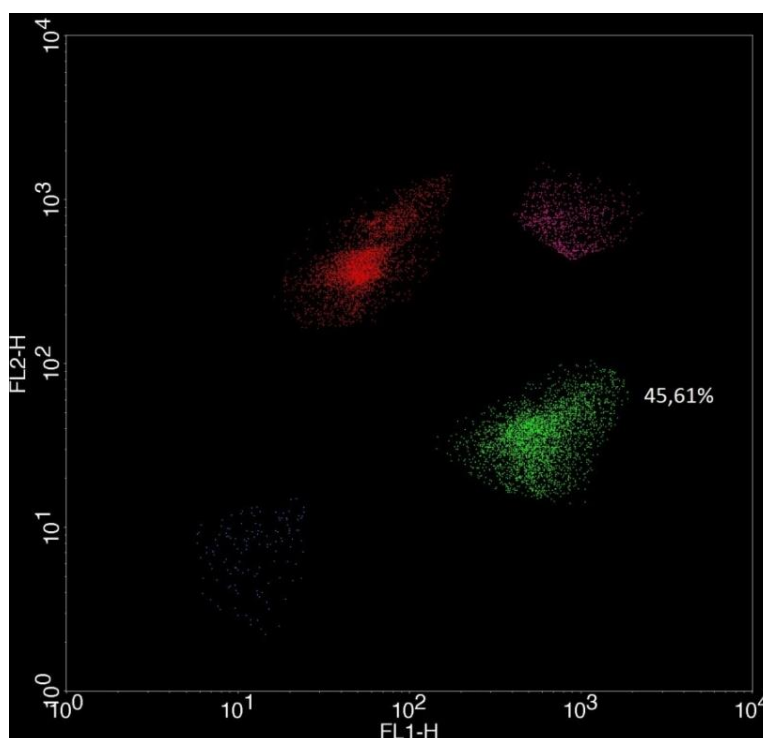


Figura 12 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot de identificare simultană a celulelor, unde fiecare celulă este reprezentată printr-un punct, iar un nor de celule prezintă caracteristici apropiate, la spermatozoizii decongelați la 39° C timp de 120 de secunde

În cazul studierii **activității mitocondriale** au fost analizate comparativ evaluările citometrice ale spermatozoizilor din cele 5 variante experimentale. Citogramele biparametrice (figurile 17, 18, 19, 20 și 21) evidențiază prezența a 4 subpopulații: subpopulația de spermatozoizii morți, care reprezintă spermatozoizii marcați cu iodură de propidiu; subpopulația 2, colorată cu Rodamină 123 și care reprezintă spermatozoizii cu activitate mitocondrială normală; subpopulația 3, care prezintă o dublă colorație, cu ambii fluorocromi; subpopulația 4, care include alte particule, aceasta nefiind luată în considerare la interpretarea rezultatelor.

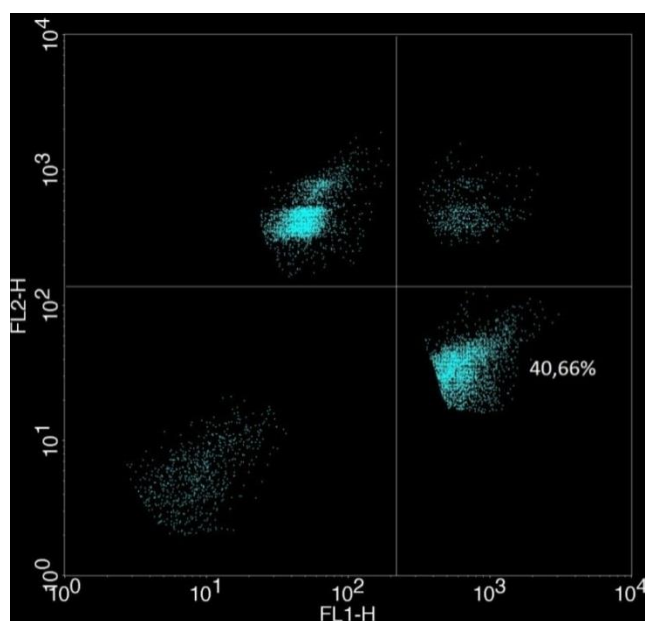


Figura 18 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor de identificare simultană a celulelor cu activitate mitocondrială normală (cadrantul din dreapta jos), celule moarte (cadrantul din stânga sus) și *muribunde* (dublu pozitive, cadrantul din dreapta sus) și a populației nonspermatice (cadrantul din stânga jos) la spermatozoizii decongelați la 50° C timp de 30 de secunde.

În ceea ce privește variația în timp a viabilității materialului seminal incubat pe baie de apă la 37° C se constată o scădere constantă de aproximativ 6 -7 procente pe parcursul celor trei ore de incubare pentru temperaturile de 39° C, respectiv 50° C (tabel 3). Pentru celelalte variante scăderea este mai pronunțată, până la 10 procente pe oră.

Tabel 3. Variația în timp a viabilității materialului seminal incubat pe baie de apă la 37° C (%)

Temperatura și timpul de decongelare	N (nr. de probe)	Viabilitatea materialului seminal incubat pe baie de apă la 37° C (%)		
		1 oră	2 ore	3 ore
Decongelare la 39° C timp de 120"	12	40.94 ± 1.8 ^a	33.04 ± 1.85 ^a	27.02 ± 1.94 ^a
Decongelare la 50° C timp de 30"	12	46.45 ± 2.65 ^a	41.73 ± 2.84 ^a	34.54 ± 2.91 ^a
Decongelare la 75° C timp de 10"	12	22.02 ± 1.94 ^b	11.95 ± 1.87 ^b	5.28 ± 1.78 ^b
Decongelare la 75° C timp de 5"	12	26.22 ± 1.37 ^c	17.14 ± 1.36 ^c	9.32 ± 1.3 ^c
Decongelare la 90° C timp de 2"	12	9.3 ± 1.39 ^d	2.07 ± 0.8 ^d	0 ^d

^{a-d} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

Rezultatele studiului de față au arătat că cel mai bun procent de supraviețuire îl oferă decongelarea la 39° C timp de 120 de secunde și cea la 50° C timp de 30 de secunde pentru o perioadă de 3 ore de incubare pe baie de apă la 37° C

Concluzii

Folosirea tehnicilor de citometrie în flux conduce la rezultate mult mai exacte datorită numărului mare de celule analizate.

Decongelarea paietelor fine cu material seminal de berbec la temperaturi de 50° C, respectiv 39° C conduce la obținerea unor valori semnificativ mai mari ale activității mitocondriale, viabilității, motilității și funcționalității membranelor plasmatice comparativ cu celelalte variante de decongelare.

Experiment 2. Variația temperaturii și timpului de decongelare asupra ultrastructurii celulei spermatice crioconservate de berbec

Obiectivul cercetărilor a fost stabilirea modificărilor ultrastructurale după congelarea-decongelarea spermatozoizilor de berbec la diferite condiții de decongelare (temperatură, timp) și corelațiile dintre aceste condiții și parametrii citologici.

Probele de material seminal congelate-decongelate din variantele experimentale au fost prelucrate și analizate din punct de vedere ultrastructural prin microscopie electronică de transmisie. Probele s-au prelucrat prin metode uzuale, respectiv prefixare în tampon cacodilat cu glutaraldehidă 2.7%, fixare în acid osmic, deshidratare în băi seriate de alcool și includere în rășini epoxidice. Secțiunile fine s-au colorat dublu cu acetat de uranil și acetat de plumb, după care s-au examinat la un Microscop Philips 320M.

Evaluarea secțiunilor

Celulele spermatice au fost evaluate sub aspectul integrității membranei plasmatice la toate nivelurile celulei. Au fost examinate secțiuni transversale și longitudinale la nivelul piesei principale și a piesei intermediare a flagelului și secțiuni sagitale prin capul spermatozoidului.

Rezultate și discuții

Rezultatele cercetărilor noastre privind integritatea membranei plasmatice la nivelul flagelului și a capului celulei spermatice și integritatea acrozomului sunt prezentate în tabelul 4.

Tabel 4. Integritatea membranei plasmatice și a acrozomului (% , medie $\pm$ es, n=10), după decongelare

Varianta	n	Membrana plasmatică		Acrozom
		Cap	Flagel	
1. Decongelare la 39° C timp de 120"	10	41.59 $\pm$ 2.56 ^a	44.25 $\pm$ 3.12 ^a	46.99 $\pm$ 2.39 ^a
2. Decongelare la 50° C timp de 30"	10	46.21 $\pm$ 1.79 ^a	53.12 $\pm$ 2.72 ^a	60.02 $\pm$ 4.52 ^a
3. Decongelare la 75° C timp de 10"	10	24.66 $\pm$ 1.23 ^b	28.03 $\pm$ 1.85 ^b	27.86 $\pm$ 1.42 ^b
4. Decongelare la 75° C timp de 5"	10	29.04 $\pm$ 2.19 ^c	34.16 $\pm$ 1.62 ^c	37.92 $\pm$ 3.23 ^c
5. Decongelare la 90° C timp de 2"	10	12.66 $\pm$ 0.78 ^d	15.25 $\pm$ 1.65 ^d	17.23 $\pm$ 0.83 ^d

^{a-d} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

1. Ultrastructura spermatozoizilor de berbec, congelați-decongelați la 39° C timp de 120 de secunde

În general toate secțiunile la nivelul capului prezintă membrane cu un aspect normal și un procent de 41.59% dintre celule prezintă membrane plasmatică integre la nivelul capului (Planșa 1).

Planșa 1

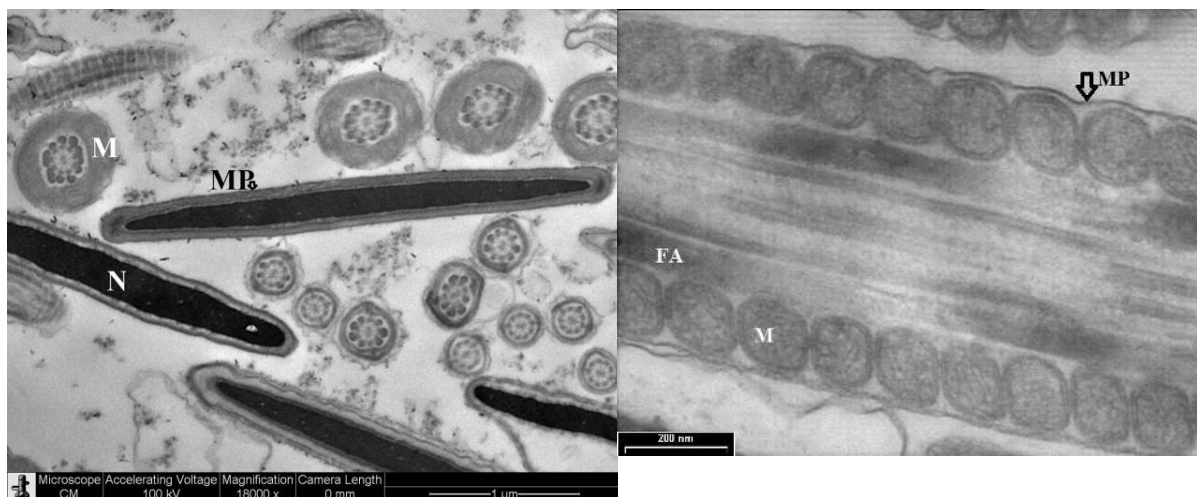


Figura 22 (originală). Secțiune sagitală la nivelul capului (x18000), acrozomul conține o matrice acrozomală cu aspect de joasă densitate, în care se observă “perforatorul”

Figura 25 (originală). Secțiune longitudinală prin piesa intermediară (x70000). Mitocondrii (M) normale cu criste vizibile și MP atașată strâns de suprafața lor (↓), filament axial (FA).

2. Ultrastructura spermatozoizilor de berbec, congelați-decongelați la 50° C

Se constată că, cele mai multe deteriorări membranare apar tot la nivelul capului ca și în cazul primei variante experimentale (decongelare la 39° C timp de 120 de secunde), deși diferențele față de deteriorările flagelului sunt destul de mici sau moderate. Membranele fenestrate apar la 46% dintre spermatozoizii decongelați la 50° C (planșele 2 și 3).

La nivelul piesei intermediare și principale, deteriorări apar la 49% dintre celule. Acrozomul prezintă o structură intactă la 60% dintre celule (figura 28).

Planșa 2 și Planșa 3

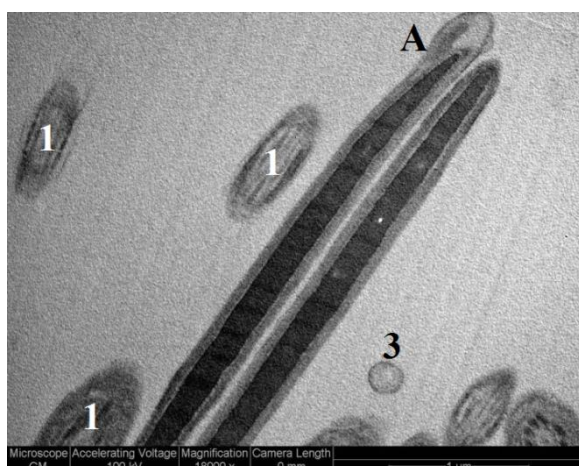


Figura 28 (originală). Celule spermatice de berbec, congelate- decongelate la 50° C (x18000). Piesa intermediară (1), piesa principală (2) și piesa terminală (3).

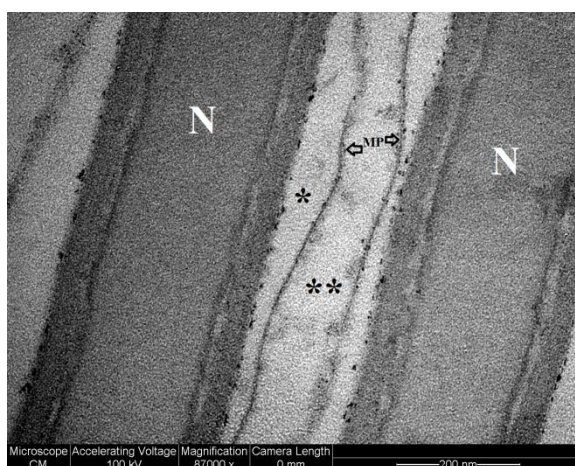


Figura 30 (originală). Ultrastructura membranelor intacte balonate (x87000). Nucleu (N), Piesa terminală (PT), Vârf coada (VC), Membrană plasmatică (MP), Spațiu intermembranar (*), Spațiu extracelular (**).

3. Ultrastructura spermatozoizilor congelați-decongelați la 75° C timp de 5 secunde și 10 secunde

Decongelarea la 75° C, atât pentru perioada de 5 secunde, cât și pentru 10 secunde, conduce la rezultate semnificativ mai mici față de decongelarea la 39° C respectiv 50° C. Rezultate mai bune s-au obținut în cazul decongelării timp de 5 secunde. (Planșa 4).

La nivelul flagelului, membrana plasmatică are un aspect zimțat, este ruptă și detașată parțial sau total (Planșa 4).

Planșa 4

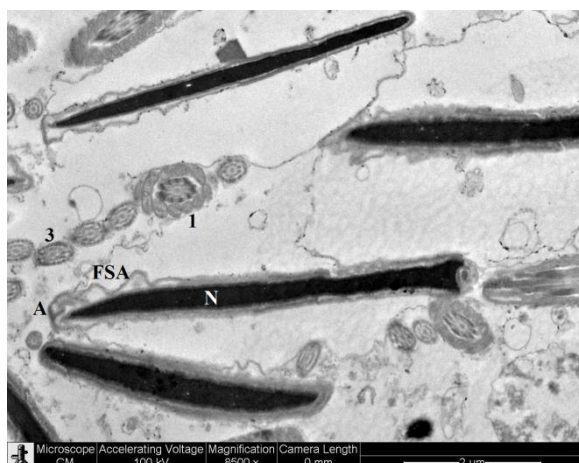


Figura 33 (originală). Celule spermatice de berbec, decongelate la 75° C timp de 5 secunde (x8500). Piesa intermediară (1) și piesa terminală (3).

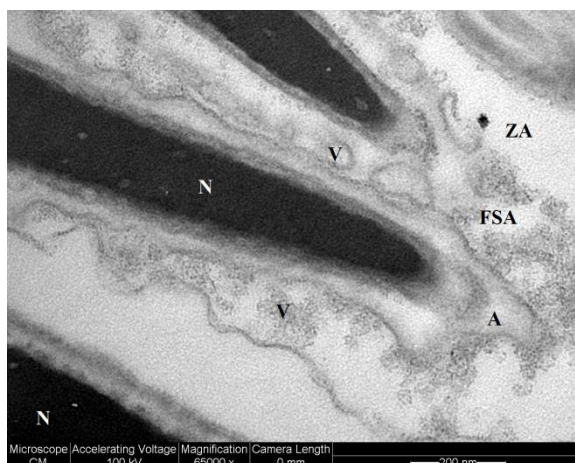


Figura 36 (originală). Secțiune longitudinală prin capul celulei spermatice de berbec în zona acrozomală (x65000). Vezicule (V), zone albe (ZA).

4. Ultrastructura spermatozoidelor congelați-decongelați la 90° C timp de 2 secunde

În cazul decongelării la 90° C s-au obținut rezultate semnificativ statistic mai mici comparativ cu restul variantelor. Numai 12.66% dintre celule prezintă membrane plasmatice integre la nivelul capului și 15.25% la nivelul flagelului (Planșa 5, figurile 37-42). Acrozomul are o structură intactă la numai 17.23% dintre celule.

Planșa 5

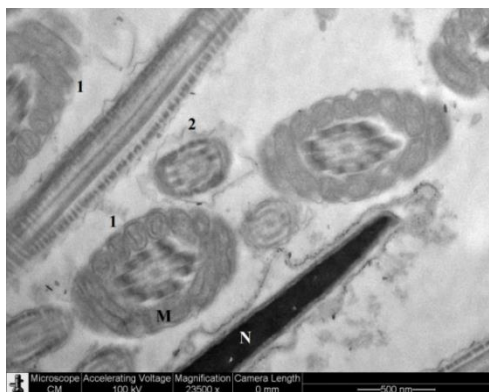


Figura 37 (originală). Celule spermice de berbec decongelate la 90° C timp de 2 secunde (x23500). Piesa intermediară (1) și piesa principală (2).

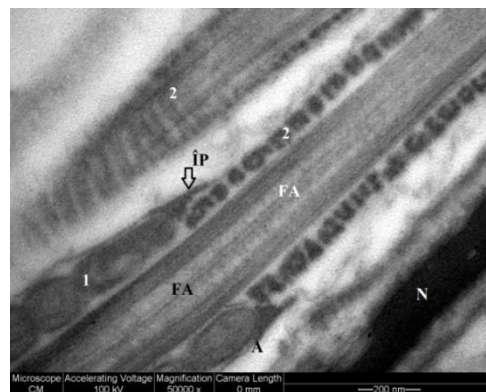


Figura 42 (originală). Secțiune prin flagel la nivelul Inelului lui Jensen (x50000). Piesa intermediară (1) și piesa principală (2). Înveliș proteic (Î.P.), filament axial (FA)

CONCLUZII

Congelarea-decongelarea conduce la alterări ale membranei plasmatice ce includ ruperea acesteia, în special la nivelul capului, și detașări sau vacuolizări ale membranei la nivelul capului și flagelului. Analiza microfotografiilor arată că acrozomii au fost doar parțial afectați de congelare-decongelare. Deși multe celule prezintă un acrozom balonat, membrana acrozomală internă este intactă. Membrana plasmatică prezintă mai multe modificări degenerative la nivelul capului comparativ cu flagelul.

Rezultatele privind gradul de afectare a membranei plasmatice în urma congelării-decongelării în diferite condiții arată că cele mai bune rate de decongelare sunt decongelarea la 39° C timp de 120 de secunde și decongelarea la 50° C timp de 30 de secunde.

Experiment 3. Efectul variației temperaturii și timpului de decongelare asupra calității materialului seminal congelat-decongelat de țap

Acest studiu are ca obiectiv de a determina procedura optimă de decongelare, în scopul de a cunoaște viteza de decongelare adecvată care poate da cel mai mare procent de

spermatozoizi viabili după decongelare și de a evalua relația dintre această tehnică de decongelare și supraviețuirea spermei după decongelare în timpul incubării la 37 °C.

Animale: s-au recoltat probe de spermă de la 5 țapi adulți de rasă Saanen cu fertilitate cunoscută. S-a prelucrat un număr total de 78 ejaculate. Materialul seminal a fost crioconservat în paiete fine de 0.25 ml.

Ca variante de decongelare au fost testate:

- decongelarea la 39°C, timp de 120 secunde
- decongelarea la 50°C, timp de 30 secunde
- decongelarea la 75°C, timp de 10 secunde
- decongelarea la 75°C, timp de 5 secunde
- decongelarea la 90°C, timp de 2 secunde

Rezultate

Obiectivul cercetărilor a fost acela de a determina experimental influența unor factori (timp și temperatură) în procesul de decongelare privind unii parametri citologici ai celulei spermatice după decongelare, în scopul stabilirii unei variante optime care să afecteze cât mai puțin celula pe parcursul acestui proces.

Tabel 5. Variația parametrilor calitativi ai materialului seminal decongelat prin diferite metode

Temperatura și timpul de decongelare	N (nr. de probe)	Caracteristicile materialului seminal			
		Motilitate (%)	Viabilitate (%)	Activitate mitocondrială (%)	HOST (%)
Decongelare la 39°C timp de 120"	12	37 ± 1.12 ^a	43.29 ± 1.23 ^a	35.16 ± 1.66 ^a	36.25 ± 1.47 ^a
Decongelare la 50°C timp de 30"	12	41 ± 2.18 ^a	50.69 ± 2.38 ^a	40.02 ± 2.17 ^a	42.61 ± 3.17 ^a
Decongelare la 75°C timp de 10"	12	19 ± 1.33 ^b	23.33 ± 1.32 ^b	21.29 ± 2.31 ^b	21.36 ± 2.22 ^b
Decongelare la 75°C timp de 5"	12	28 ± 1.46 ^c	31.55 ± 1.53 ^c	26.34 ± 1.57 ^b	30.23 ± 1.79 ^c
Decongelare la 90°C timp de 2"	12	12 ± 1.67 ^d	14.75 ± 1.26 ^d	8.22 ± 1.29 ^c	11.21 ± 1.28 ^d

^{a-d} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

În acest sens materialul seminal crioconservat a fost decongelat prin 5 variante și s-au analizat motilitatea, viabilitatea celulară (prin citometrie în flux), activitatea

mitocondrială (prin citometrie în flux) și integritatea funcțională a membranei plasmatice (testul HOST). De asemenea, viabilitatea a fost studiată pe parcursul a trei ore după decongelare.

Motilitatea: în tabelul 5 sunt prezentate valorile motilității spermatică. Se observă că cele mai bune valori s-au obținut prin decongelarea paietelor la 50° C timp de 30 de secunde. Decongelarea la 39° C timp de 120 de secunde a condus, de asemenea, la o valoare crescută a motilității, între cele 2 variante neexistând diferențe semnificative statistic. Creșterea temperaturii de decongelare conduce la scăderea motilității. Atât la 75° C, în cele 2 variante de timp, cât și la 90° C s-au înregistrat valori semnificativ mai mici comparativ cu primele 2 variante de decongelare ($p < 0.05$).

Viabilitatea: Procentul de spermatozoizi viabili (tabelul 5) indică faptul că decongelarea la 50° C timp de 30 de secunde și la 39° C timp de 120 de secunde conduce la obținerea unor viabilități superior semnificative ($p < 0.05$) față de cazul decongelării la 75° C și 90° C.

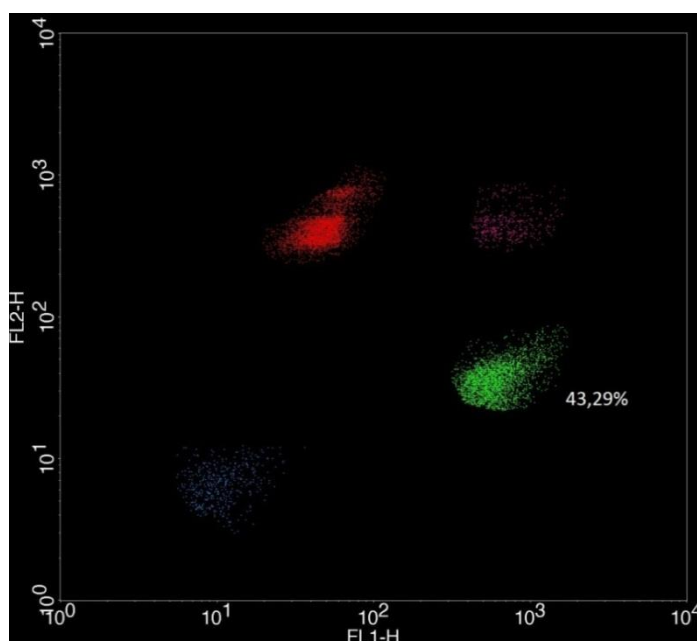


Figura 43 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot de identificare simultană a celulelor viabile (colorate verde), moarte (colorate roșu) și *muribunde* (dublu pozitive, colorate mov) și a populației nonspermatice (colorată albastru) la spermatozoizii decongealați la 39°C timp de 120 de secunde

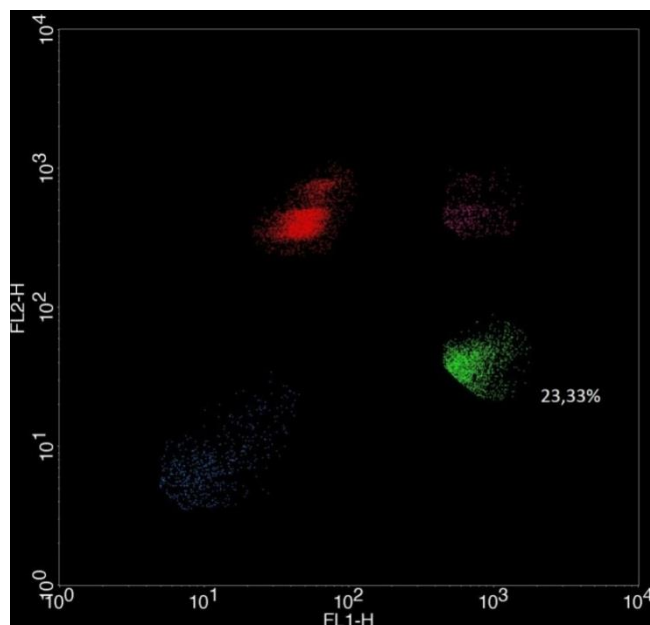


Figura 45 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot la spermatozoizii congelați-decongelați la 75⁰C timp de 10 secunde

Rezultate similare s-au obținut și pentru integritatea funcțională a membranelor (tabelul 5) și pentru testul de apreciere a activității mitocondriale (tabelul 5). Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru temperaturile de 50° C, respectiv 39° C, valorile fiind semnificativ mai mari ($p < 0.05$) față de celelalte variante.

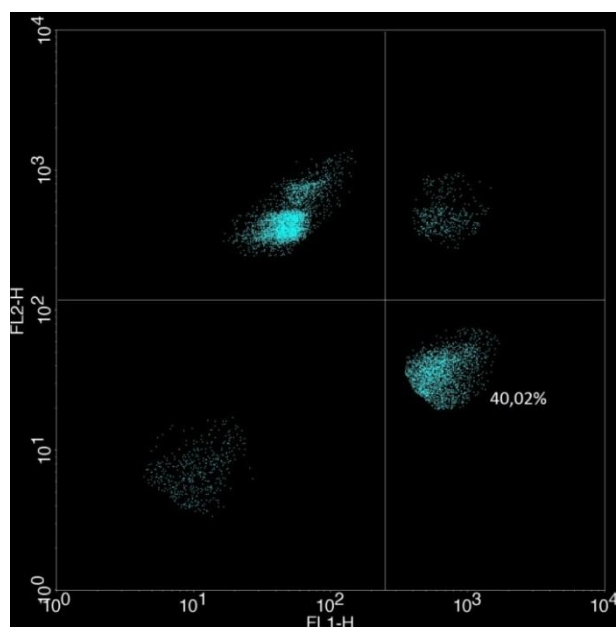


Figura 49 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor de identificare simultană a celulelor cu activitate mitocondrială normală (cadranul din dreapta jos), moarte (cadranul din stanga sus) și *muribunde* (dublu pozitive, cadranul din dreapta sus) și a populației nonspermatice (cadranul din stânga jos) la spermatozoizii congelați-decongelați la 50⁰ C timp de 30 de secunde

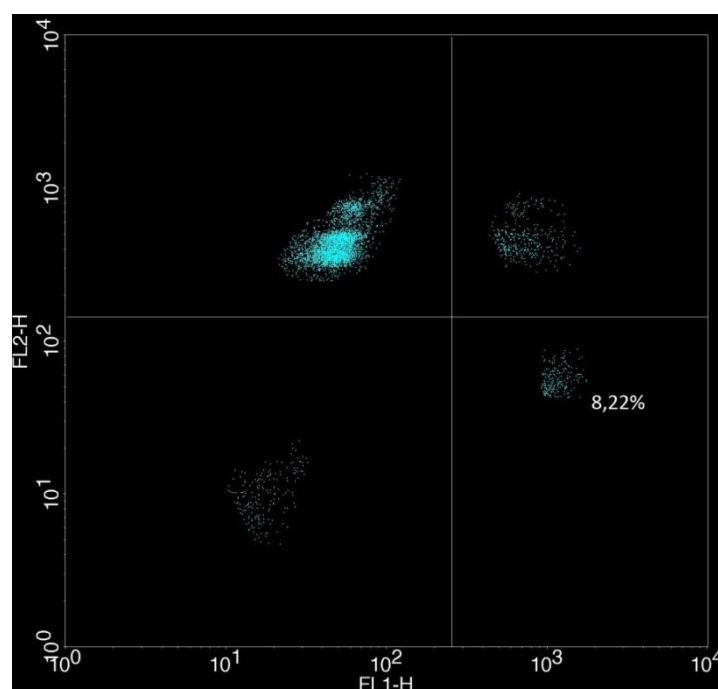


Figura 52 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor la spermatozoizii decongelați la 90° C timp de 2 secunde

Viabilitatea materialului seminal incubat pe baie de apă la 37° C (%) înregistrează o scădere constantă de aproximativ 7-9 procente pe parcursul celor trei ore de incubare pentru temperaturile de 39° C, respectiv 50° C. Pentru celelalte variante scăderea este mai pronunțată, până la 20-30 procente pe oră (tabel 6).

Tabel 6. Variația în timp a viabilității materialului seminal incubat pe baie de apă la 37° C

Temperatura și timpul de decongelare	Viabilitatea materialului seminal incubat pe baie de apă la 37° C (%)		
	1 oră	2 ore	3 ore
Decongelare la 39° C timp de 120"	40.69 ± 1.79 ^a	37.84 ± 2.31 ^a	34.81 ± 1.72 ^a
Decongelare la 50° C timp de 30"	47.64 ± 2.37 ^a	43.82 ± 2.95 ^a	39.44 ± 2.19 ^a
Decongelare la 75° C timp de 10"	21 ± 1.73 ^b	16.8 ± 1.67 ^b	10.08 ± 1.59 ^b
Decongelare la 75° C timp de 5"	25.24 ± 1.28 ^c	15.15 ± 1.43 ^c	7.58 ± 1.41 ^c
Decongelare la 90° C timp de 2"	10.32 ± 1.48 ^d	3.61 ± 0.54 ^d	0,36 ± 0,17 ^d

^{a-d} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

Discuții

Rezultatele prezentului studiu au arătat că integritatea funcțională și structurală a membranei plasmatice este semnificativ crescută atunci când paielele au fost decongelate la 39° C, respectiv 50° C în comparație cu alte temperaturi de decongelare. Cel mai bun procent de supraviețuire o oferă decongelarea la 39° C timp de 120 secunde și cea la 50° C timp de 30 secunde pentru o perioadă de 3 ore de incubare pe baie de apă la 37° C.

Concluzii

Folosirea tehnicilor de citometrie în flux conduce la rezultate mult mai exacte datorită numărului mare de celule analizate.

Decongelarea paietelor fine cu material seminal de țap la temperaturi de 50° C, respectiv 39° C conduce la obținerea unor valori semnificativ mai mari ale activității mitocondriale, viabilității, motilității și funcționalității membranelor plasmatice comparativ cu celelalte variante de decongelare.

Experiment 4. Variația temperaturii și timpului de decongelare asupra ultrastructurii celulei spermatice crioconservate de țap

Obiectivul cercetărilor a fost stabilirea modificărilor ultrastructurale după congelarea-decongelarea spermatozoizilor de țap folosind diferite modalități de decongelare (temperatură, timp) și corelațiile dintre acestea și parametrii citologici.

Paielele fine cu spermă de țap au fost decongelate folosind cele 5 variante descrise, sperma s-a amestecat iar proba rezultată s-a prelucrat pentru examen electrono-microscopic după metoda folosită și pentru sperma de berbec. Electrono-microfotografiile au fost obținute la un microscop electronic Philips 320 M.

Rezultate și discuții

Integritatea morfostructurală a celulelor decongelate de țap au prezentat un profil ultrastructural mult mai bun decât la berbec, însă principalele modificări structurale sunt prezente la nivelul acrozomului și sistemul membranal care îl înconjoară, apoi la nivelul întregului cap, flagelul fiind afectat cel mai puțin.

Cele mai puține modificări structurale au fost constatate la sperma decongelată la 50° C timp de 30 de secunde, unde, la nivelul întregului cap, acrozom și flagel, procentul de structuri normale sunt de 52.13, 49.41 și respectiv de 58.29%. Decongelarea convențională la 39° C timp de 120 de secunde a etalat celule cu profil ultrastructural care au avut aceeași tendință dar valorile procentuale ale structurilor normale sunt mai mici cu aproximativ 7, 6 și respectiv 8 procente. Valorile procentuale normale ale structurilor

celulei spermatice decongelate cu variantele 3,4 și 5 sunt foarte mici, fiind de 15-27% la nivelul întregului cap, de 11-20% la nivelul acrozomului și de 24-31% la nivelul flagelului.

Tabel 7. Integritatea morfostructurală normală a celulei spermatice de țap (% , medie±Es, n=10), după decongelare

Varianta	n	Membrana plasmatică		Acrozom
		Cap	Flagel	
Decongelare la 39° C timp de 120"	10	45.27 ± 2.83 ^a	50.37 ± 3.23 ^a	43.52 ± 2.23 ^a
Decongelare la 50° C timp de 30"	10	52.13 ± 1.76 ^a	58.29 ± 2.63 ^a	49.41 ± 4.52 ^a
Decongelare la 75° C timp de 10"	10	27.72 ± 1.35 ^b	31.23 ± 1.97 ^b	20.15 ± 1.17 ^b
Decongelare la 75° C timp de 5"	10	23.05 ± 1.95 ^c	35.12 ± 1.74 ^c	18.13 ± 2.93 ^c
Decongelare la 90° C timp de 2"	10	15.27 ± 0.59 ^d	24.19 ± 1.47 ^d	11.27 ± 0.67 ^d

^{a-d} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

În microfotografiile 53-64, prezentate în planșele 6-7 sunt observate defecte ultrastructurale ale celulei spermatice de țap, care constau în balonări mai mult sau mai puțin exagerate ale membranei plasmactice externe cu fenestrări de diferite dimensiuni (figurile 53, 54, 59, 60, 63, 64), distrugerii ale membranei plasmactice externe a acrozomului, cu pierderi de conținut acrozomal (figura 63), prezența veziculelor de diferite dimensiuni în jurul capului (figura 61), structuri membranare “pufoase” datorate dislocării fosfolipidelor sau a destructurării proteinelor transmembranare (figurile 55, 56, 57).

Planșa 6

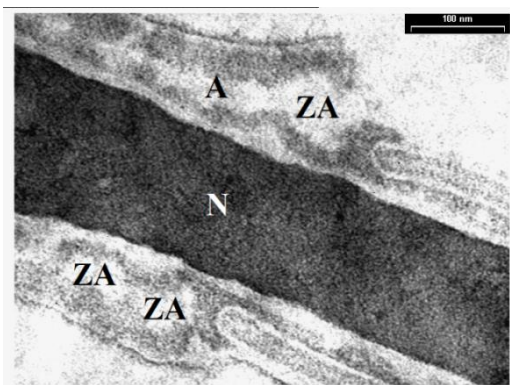


Figura 55 (originală). Secțiune longitudinală prin cap în zona ecuatorială (x50000). Partea distală a acrozomului distrusă, zone albe (ZA).

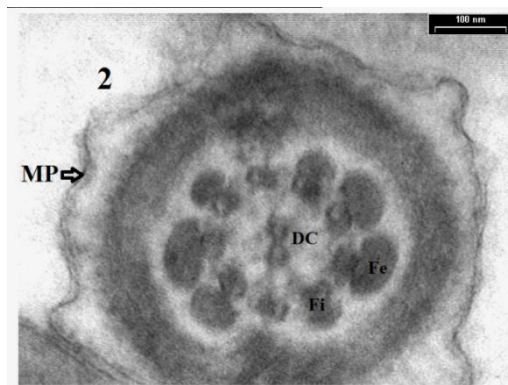


Figura 58 (originală). Secțiune transversală prin piesa principală (x230000). MP și înveliș proteic “pufoș”, piesa principală (2), dublete centrale (DC), filamente externe (Fe), filament interne (Fi).

Planșa 7

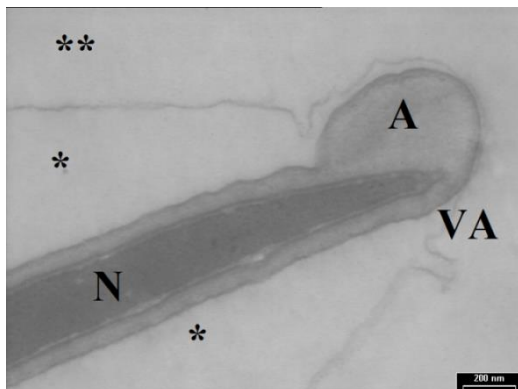


Figura 59 (originală). Secțiune longitudinală prin cap (x50000). MP balonizată excesiv desprinsă de acrozom, fenestrări puține. Spațiu extracelular (**), spațiu intracelular (*), vârf apical (VA).

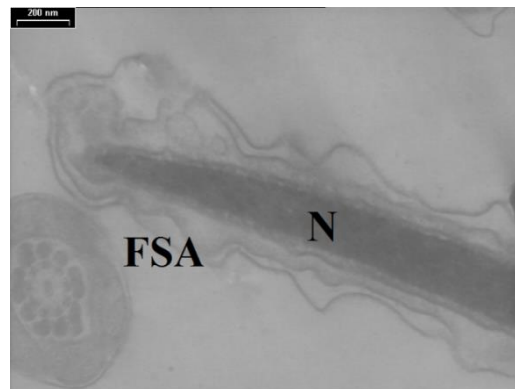


Figura 61 (originală). Secțiune longitudinală prin acrozomul distrus (x50000). MP balonizată fără fenestrări.

Modificările ultrastructurale ale fiecărei variante de decongelare sunt prezentate în planșele 8-12. În acestea, modificările generale prezentate în planșele 6-7 sunt prezente în toate tipurile de celule spermatice de țap decongelate prin cele cinci variante, însă frecvența leziunilor grave care produc moartea celulară, sunt mai des întâlnite la variantele de decongelare 3, 4 și 5.

Planșa 8

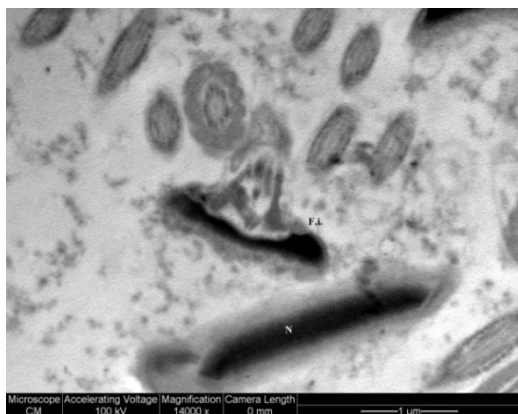


Figura 66 (originală). Secțiune oblic-longitudinală prin capul spermatozoidului la nivelul fosei de implantare a flagelului (Fi) (x14000).



Figura 69 (originală). Secțiune longitudinală prin piesa intermediară (x 29000). MP strâns aderentă la mitocondrie (M).

Planșa 9

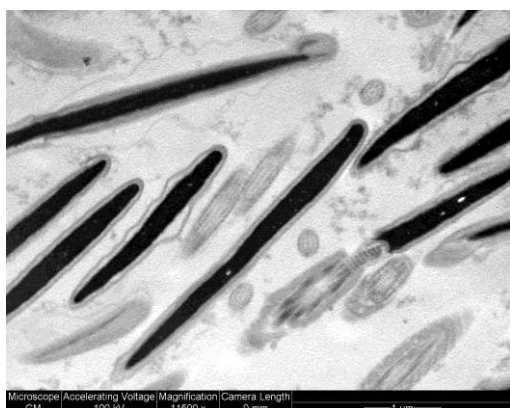


Figura 70 (originală). Spermă decongelată la 50° C timp de 30 de secunde (x 11500). Celule spermatice secționate în diverse planuri prin cap și flagel. Majoritatea celulelor au aspect normal



Figura 73 (originală). Spermatozoizi secționați în diverse planuri cu modificări reduse (x23500).

Planșa 10

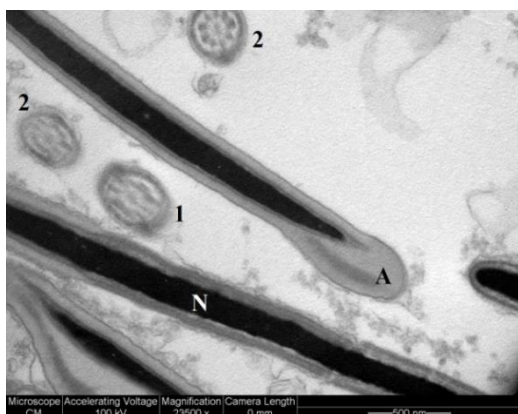


Figura 75 (originală). Spermă decongelată la 75° C timp de 10 de secunde (x 23500). Imaginile la mărimi mari din această secțiune etalează MP dezorganizate mai mult sau mai puțin detașate de N. Piesa intermediară (1) și piesa principală (2).

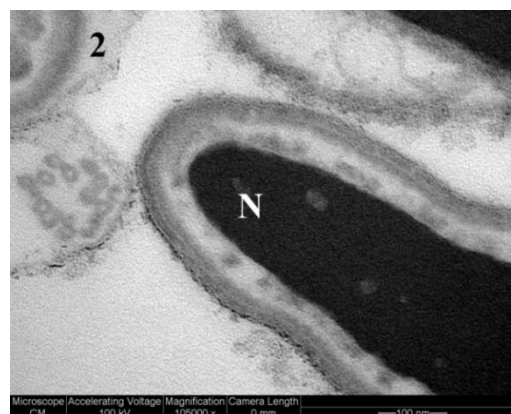


Figura 77 (originală). Zone punctate cu aspect electronodens care ies din nucleu prin porii membranei nucleare (x105000). Imaginile nu se regăsesc la alte metode de decongelare. Piesa principală (2).

Planșa 11



Figura 80 (originală). Spermă decongelată la 75° C timp de 5 secunde (x 14000). Celule fără MP și pierderi de matrice celulară.

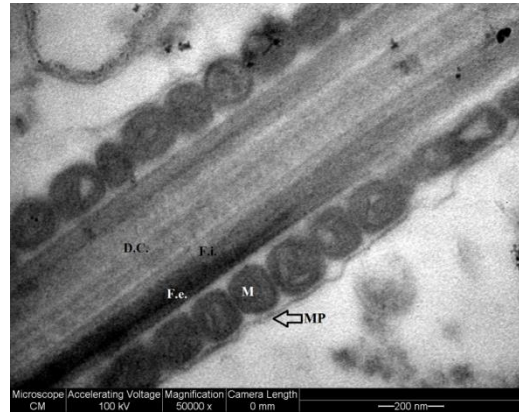


Figura 81 (originală). Spermă decongelată la 75 ° C timp de 5 secunde (x 50000). Mitocondrii distruse pe o parte iar în partea opusă MP este fenestrată și cu matrice mitocondrială distrusă. Dublete central (DC), filamente interne (F.i.), filament externe (F.e.)

Planșa 12

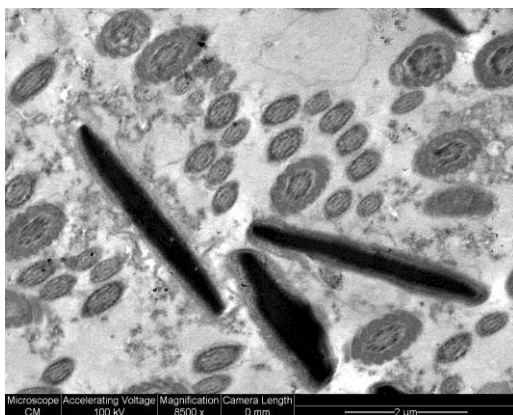


Figura 82 (originală). Spermă decongelată la 90° C timp de 2 secunde (x8500). Celule spermatice fără membrană plasmatică și aspect ultrastructural dezorganizat.

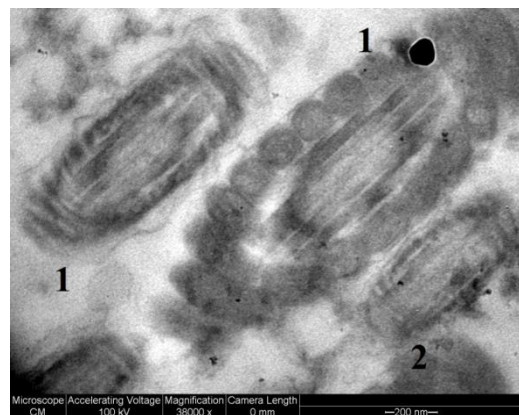


Figura 83 (originală). Spermă decongelată la 90° C timp de 2 secunde (x 38000). Secțiuni oblice prin piesa principală și terminală a flagelului complet distrus. Piesa intermediară (1) și piesa principală.

Concluzii

Decongelarea spermei de țap la 39° C timp de 120 de secunde (V₁- metoda convențională lentă), la 50° C timp de 30 de secunde (V₂- metoda rapidă), la 75° C timp de 10 și 5 secunde și la 90° C timp de 2 secunde (V₃, V₄, V₅ –metode ultrarapide) a fost cercetată prin examinare electrono-microscopică în vederea stabilirii profilului

ultrastructural al celor 5 variante experimentale. Principalele concluzii care s-au desprins în urma cercetărilor sunt următoarele: diferențele nu au fost semnificative statistic între speci­menele în V_1 și acelea decongelate rapid în V_2 ; profilul ultrastructural al speci­menelor decongelate ultrarapid în V_3 , V_4 și V_5 prezintă membrane normale în proporție de 11.27% - 31.23% pentru toate compartimentele celulare, existând diferențe semnificativ statistic cu variantele V_1 și V_2 ; principalele modificări de structură au avut frecvențe diferite la cele 5 variante, cele mai întâlnite defecte au fost balonări mai mult sau mai puțin exagerate ale membranei plasmaticice externe cu fenestrări de diferite dimensiuni, distrugerii ale membranei plasmaticice externe a acrozomului, cu pierderi de conținut acrozomal; frecvența leziunilor grave, care produc moartea celulară, sunt mai des întâlnite la variantele de decongelare ultrarapidă V_3 , V_4 și V_5 .

Experiment 5. Studiu asupra efectelor expunerii la diferite doze de energie generate de un laser cu He-Ne asupra calității materialului seminal congelat-decongelat de berbec și țap

Scopul acestui studiu este acela de a investiga dacă iradierea cu laser, în diferite doze de energie de iradiere (3.96 și 6.12 J/cm^2) poate îmbunătăți caracteristicile calitative ale spermei de berbec și țap după procesul de congelare-decongelare.

Probele de material seminal crioconservat au fost decongelate pe baie de apă la 39°C și au fost supuse iradierii cu două doze diferite de energie.

Rezultate

Obiectivul cercetărilor a fost acela de a determina dacă și cum cele două doze de energie de iradiere cu laser (3.96 și 6.12 J/cm^2) pot îmbunătăți caracteristicile calitative ale spermei de berbec și țap după procesul de congelare-decongelare.

În acest sens s-au decongelat paielele cu material seminal pe baie de apă la 39°C timp de 120 de secunde. După decongelare, materialul seminal a fost împărțit în trei probe: una reprezentând controlul, iar celelalte două au fost expuse iradierii cu laser He-Ne la două doze diferite de energie (3.96 și 6.12 J/cm^2) și s-au analizat activitatea mitocondrială (prin citometrie în flux), viabilitatea celulară (prin citometrie în flux), motilitatea și integritatea funcțională a membranei plasmaticice (testul HOST). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 8 și 9.

Tabel 8. Variația parametrilor calitativi ai materialului seminal de berbec decongelat și iradiat cu laserul cu He-Ne

Probe	Caracteristicile materialului seminal			
	Motilitate (%)	Viabilitate (%)	Activitate mitocondrială (%)	HOST (%)
Control	39.2 ± 1.96 ^a	45.09 ± 2.46 ^a	36.47 ± 1.32 ^a	38.67 ± 1.46 ^a
Proba 2 (3.96 J/cm ²)	38.5 ± 1.59 ^a	43.86 ± 1.68 ^b	39.96 ± 2.08 ^a	39.02 ± 1.91 ^a
Proba 3 (6.12 J/cm ²)	44.23 ± 2.38 ^a	50.73 ± 2.77 ^a	43.76 ± 1.94 ^b	45.12 ± 2 ^a

^{a-b} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență semnificativă statistic ($p < 0.05$)

Tabel 9. Variația parametrilor calitativi ai materialului seminal de țap decongelat și iradiat cu laserul cu He-Ne

Probe	Caracteristicile materialului seminal			
	Motilitate (%)	Viabilitate (%)	Activitate mitocondrială (%)	HOST (%)
Control	37.95 ± 1.79 ^a	44.01 ± 2.29 ^a	35.59 ± 1.02 ^a	37.74 ± 1.4 ^a
Proba 2 (3.96 J/cm ²)	33.05 ± 1.21 ^a	37.84 ± 1.51 ^b	34.76 ± 1.7 ^a	33.66 ± 1.63 ^a
Proba 3 (6.12 J/cm ²)	40.86 ± 2.03 ^a	46.85 ± 2.39 ^a	40.42 ± 2.21 ^b	41.68 ± 1.86 ^a

^{a-b} Literele diferite pe aceeași coloană indică o diferență statistică semnificativă ($p < 0.05$)

Motilitatea: Se observă că cele mai bune valori s-au obținut prin iradierea cu laserul He-Ne la doza de 6.12 J/cm². Expunerea la doze mai mici de energie a condus la o motilitate scăzută față de celelalte probe iradiate și de control. Între valorile motilităților (tabelele 8 și 9) există diferențe nesemnificative statistic ($p < 0.05$).

Viabilitatea: Procentul de spermatozoizi viabili (tabelele 8 și 9) este statistic semnificativ mai mare ($p < 0.05$) pentru proba control și cea iradiată cu o doză de energie de 6.12 J/cm² față de proba iradiată cu laserul He-Ne cu doza de 3.96 J/cm².

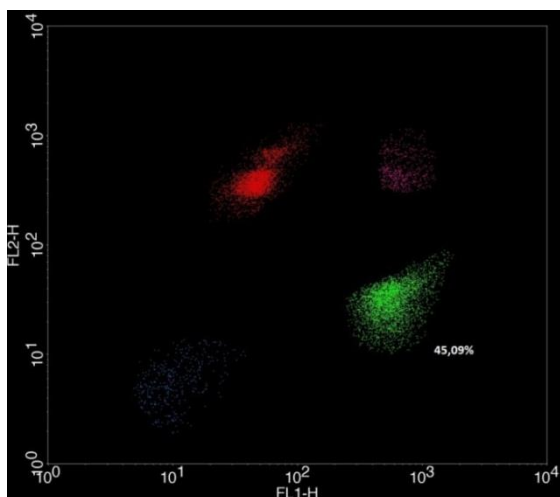


Figura 84 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot de identificare simultană a celulelor viabile (colorate verde), moarte (colorate roșu) și *muribunde* (dublu pozitive, colorate mov) și a populației nonspermatice (colorată albastru) la spermatozoizii de berbec din proba de control

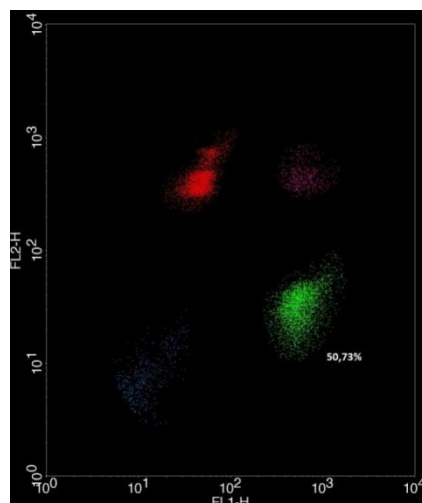


Figura 86 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot la spermatozoizii de berbec din proba 3 (iradiată cu 6.12 J/cm²)

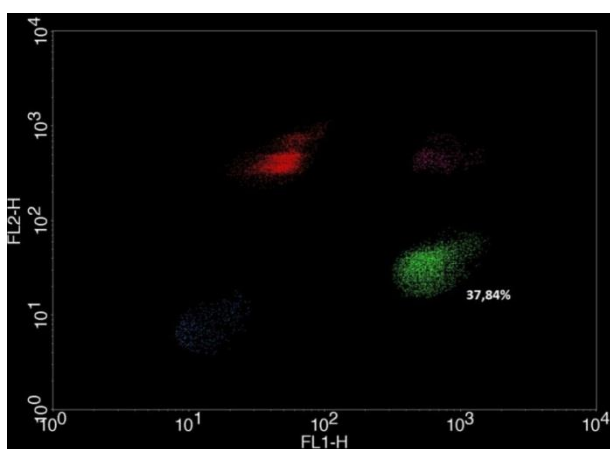


Figura 88 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot de identificare simultană a celulelor viabile (colorate verde), moarte (colorate roșu) și *muribunde* (dublu pozitive, colorate mov) și a populației nonspermatice (colorată albastru) la spermatozoizii de țap din proba 2 (iradiată cu 3.96 J/cm²)

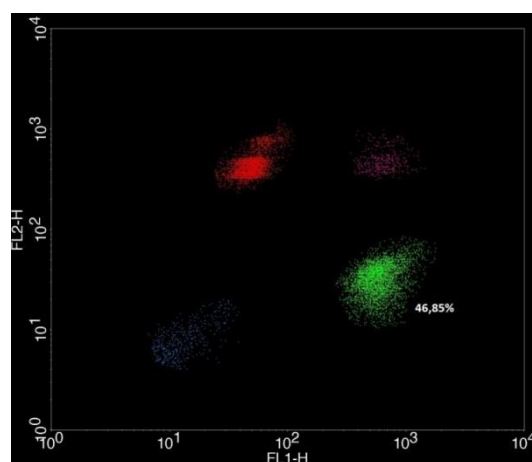


Figura 89 (originală). Analiza comparativă prin tehnica graficului dot-plot la spermatozoizii de țap din proba 3 (iradiată cu 6.12 J/cm²)

Rezultate similare s-au obținut și pentru integritatea funcțională a membranelor (tabelele 8 și 9) și pentru testul de apreciere a activității mitocondriale (tabelele 8 și 9). Cele mai bune rezultate s-au obținut pentru proba 3 (6.12 J/cm^2), valorile fiind semnificativ mai mari ($p < 0.05$) față de celelalte variante în cazul activității mitocondriale.

Pentru studierea activității mitocondriale au fost analizate comparativ evaluările citometrice ale spermatozoizilor de berbec și țap din probele experimentale.

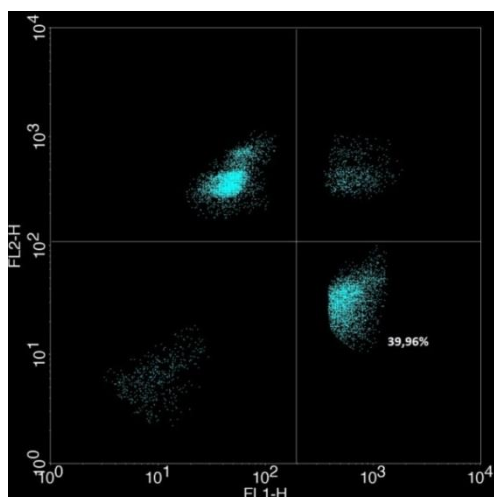


Figura 91 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor de identificare simultană a celulelor cu activitate mitocondrială normală (cadrantul din dreapta jos), moarte (cadrantul din stanga sus) și *muribunde* (dublu pozitive, cadrantul din dreapta sus) și a populației nonspermatice (cadrantul din stânga jos) la spermatozoizii de berbec din proba 2 (iradiată cu 3.96 J/cm^2)

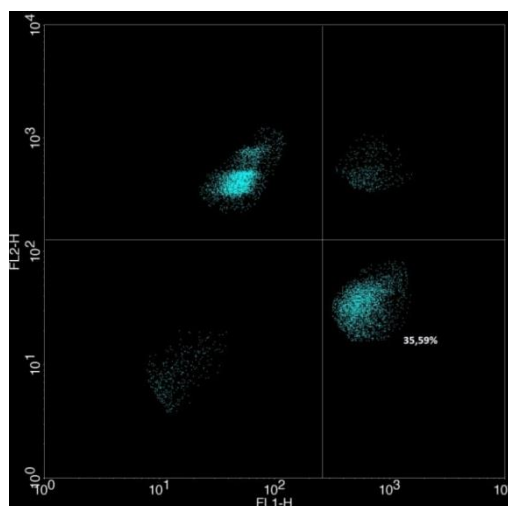


Figura 93 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor de identificare simultană a celulelor cu activitate mitocondrială normală (cadrantul din dreapta jos), moarte (cadrantul din stanga sus) și *muribunde* (dublu pozitive, cadrantul din dreapta sus) și a populației nonspermatice (cadrantul din stânga jos) la spermatozoizii de țap din proba de control

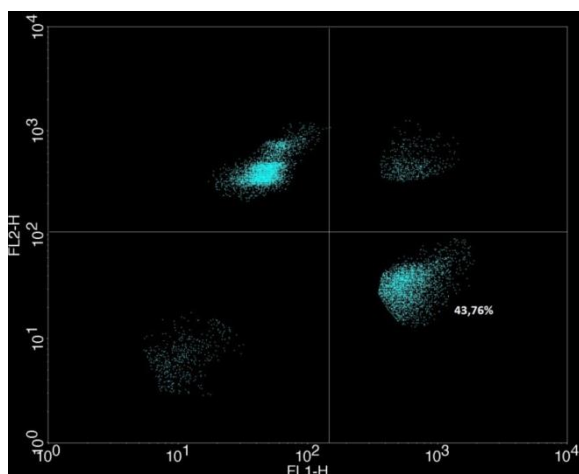


Figura 92 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor la spermatozoizii de berbec din proba 3 (iradiată cu 6.12 J/cm^2)

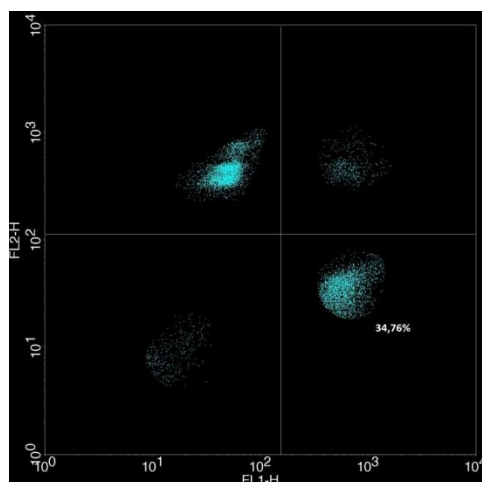


Figura 94 (originală). Analiza comparativă prin tehnica cadranelor la spermatozoizii de țap din proba 2 (iradiată cu 3.96 J/cm^2)

Discuții

Rezultatele studiului de față au arătat că iradierea cu un laser cu He-Ne a spermei decongelate de berbec și țap conduce la o creștere a motilității, viabilității și integrității funcționale a membranei spermatice în cazul dozei de 6.12 J/cm^2 . La doze mai mici de energie rezultatul s-a dovedit a fi inefficient în comparație cu celelalte probe iradiate și control.

Concluzii

Folosirea tehnicilor de citometrie în flux conduce la rezultate mult mai exacte datorită numărului mare de celule analizate.

Acțiunea laserului cu He-Ne asupra materialului seminal de berbec sau țap decongelat conduce la o îmbunătățire a motilității, viabilității, funcției mitocondriale și integrității funcționale a membranei pentru doza de 6.12 J/cm^2 , spre deosebire de doza de 3.96 J/cm^2 ce a înregistrat scăderi ale parametrilor calitativi ai materialului seminal raportate la proba de control.

Experiment 6. Testarea *in vivo* a spermei congelate supuse experimentelor de decongelare la temperaturi diferite și iradiate

Testarea *in vivo* s-a efectuat în sezon normal de reproducere, prin înseminarea artificială a 58 de oi din linia Merinos de Palas, linia de carne. Sperma congelată s-a colectat de la berbecii de rasa Merinos, linia de carne, crescuți în biobaza I.C.D.C.O.C. Palas Constanța. Decongelarea s-a făcut în două variante:

- folosind metoda de decongelare lentă în apă caldă la 39°C timp de 120 de secunde și cea rapidă la 50°C timp de 30 de secunde;
- folosind metoda energizării cu laser He-Ne cu două nivele energetice de 3.96 J/cm^2 și 6.12 J/cm^2 .

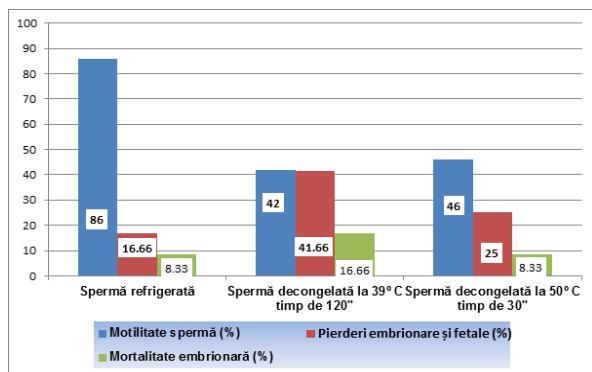
Evaluarea rezultatelor s-a realizat prin calcularea indicilor de reproducție și anume: procentul neîntoarcerilor în estru (NR%), fertilitatea (F%), prolificitatea (P%), mortalitate embrionară (ME%) și avorturi (A%) .

a) Indicii de reproducție obținuți după testarea *in vivo* cu spermă congelată-decongelată la temperaturi diferite.

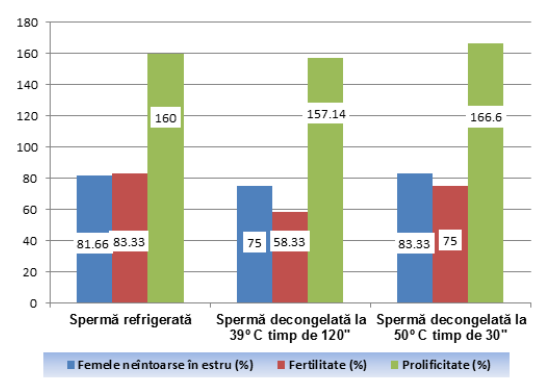
Comparând principalii indici de reproducție, obținuți de sperma decongelată prin cele două metode de decongelare, decongelarea rapidă la 50°C timp de 30 de secunde a realizat o rată de fertilitate cu 11% mai mare și o prolificitate mai mare cu 6%. O fertilitate mai

bună s-a obținut în cazul unei supraviețuiri a celulelor spermatice mai mare în tractul genital al oilor, care presupune și modificări morfostructurale mai reduse.

Grafic 1. Motilitatea spermei refrigerate și a spermei congelată-decongelată prin metoda lentă și cea rapidă



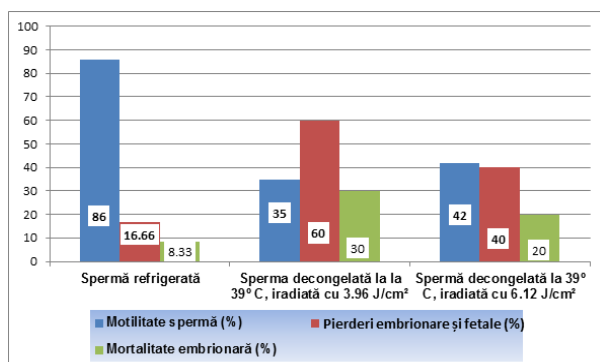
Grafic 2. Rata concepției la oi inseminate cu spermă refrigerate și spermă congelată-decongelată prin metoda lentă și cea rapidă



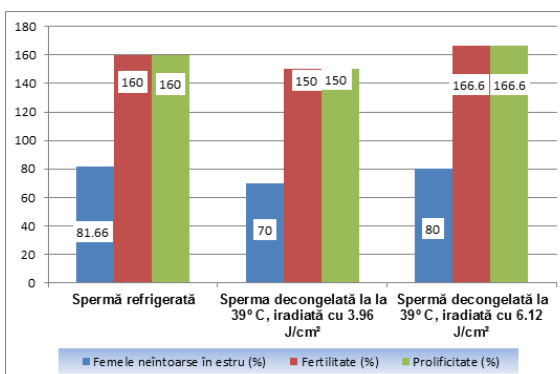
b) Indicii de reproducție obținuți după testarea *in vivo* cu spermă congelată - decongelată cu laser (tabel 11, grafice 3 și 4).

Metoda energizării cu laser este o metodă dificil de realizat în practică, însă rezultatele obținute *in vivo* au fost mai mari în cazul utilizării unei energii mai mari. Nu există date în literatura de specialitate privind testarea *in vivo* a spermei decongelate prin această metodă, astfel că rezultatele obținute pot fi considerate ca date de referință și pentru alți autori.

Grafic 3. Motilitatea spermei refrigerate și a spermei congelată-decongelată energizată



Grafic 4. Rata concepției la oi inseminate cu spermă congelată-decongelată energizată



Concluzii

Principalele rezultate obținute după inseminarea artificială cu spermă decongelată prin cele două metode sunt următoarele:

- Comparând rezultatele obținute *in vivo* pentru spermă decongelată variind temperatura și timpul, se poate concluziona că decongelarea rapidă a spermei la 50° C timp de 30 de secunde a realizat un procent de fertilitate cu 11% mai mare și o prolificitate cu 6% mai mare decât decongelarea convențională lentă;
- Testarea *in vivo* a spermei decongelate cu laser folosind două nivele energetice (3.96 J/cm² și 6.12 J/cm²) s-a realizat pe două loturi experimentale și unul martor (spermă refrigerată). S-au realizat indici de reproducție foarte buni la spermă decongelată folosind o energie mai mare, respectiv de 60% (6/8) fertilitate și de 166.66% (n=10) prolificitate;
- Comparând ratele de concepție ale spermei decongelate prin metoda rapidă și metoda energizării cu laser folosind o doză de 6.12 J/cm², rezultate foarte bune au fost obținute în cazul decongelării rapide. Metoda este ușor de realizat în condiții de fermă, este rapidă asigurând o progresie și o supraviețuire a celulelor spermatice mai mare decât restul variantelor folosite în acest experiment;
- Lotul martor de oi inseminate cu spermă refrigerată a înregistrat indici de reproducție mai mari decât cele inseminate cu spermă decongelată convențional sau rapid, însă avantajele spermei congelate-decongelate, indiferent de tehnologiile folosite la congelare sau decongelare, rezultă din disponibilitatea acestora pe toată durata anului, din faptul că nu este limitată de condițiile date, de sezon, de timp și/sau spațiu.

Capitolul 3. CONCLUZII GENERALE

Folosirea tehnicilor de citometrie în flux conduce la rezultate mult mai exacte datorită numărului mare de celule analizate.

Analiza celulelor spermatice ambalate în paiele fine cu material seminal de berbec și țap, decongelate la temperaturi de 50° C, respectiv 39° C conduce la obținerea unor valori semnificativ mai mari ale activității mitocondriale, viabilității, motilității și funcționalității membranelor plasmatic comparativ cu celelalte variante de decongelare.

Metoda este recomandată pentru determinarea calității spermei congelate în centrele care dețin bănci de spermă, deoarece activitatea mitocondrială nu se poate determina prin alte metode. De activitatea mitocondrială depinde timpul de supraviețuire a celulei după decongelare.

Congelarea–decongelarea conduce la alterări ale membranei plasmatice ce includ ruperea acesteia, în special la nivelul capului, și detașări sau vacuolizări ale membranei la nivelul capului și flagelului. Analiza microfotografiilor arată că acrozomii au fost doar parțial afectați de congelare-decongelare. Deși multe celule prezintă un acrozom balonat, membrana acrozomală internă este intactă. Membrana plasmatică prezintă mai multe modificări la nivelul capului comparativ cu flagelul.

Rezultatele privind gradul de afectare a membranei plasmatice în urma congelării-decongelării în diferite modalități, arată că procentul cel mai mare de celule normale s-a obținut prin decongelarea la 39° C timp de 120 de secunde și decongelarea la 50° C timp de 30 de secunde.

Decongelarea spermei de țap la 39° C timp de 120 de secunde, la 50° C timp de 30 de secunde, la 75° C timp de 10 secunde și 5 secunde și 90° C timp de 2 secunde a fost cercetată prin examinare electrono-microscopică în vederea stabilirii profilului ultrastructural al celulelor spermatice de țap, folosind cele 5 variante experimentale. Concluziile care s-au desprins în urma cercetărilor sunt următoarele:

- Motilitatea și viabilitatea probelor decongelate de țap au fost cu 8-10% mai mari decât sperma congelată de berbec, ceea ce confirmă faptul că preabilitatea la congelare a spermei de țap este mai mare.
- După decongelare la 50° C timp de 30 de secunde, profilul ultrastructural al probelor de spermă de țap a etalat ultrastructură normală, cu membrană plasmatică integrală: la nivelul capului în proporție de $52.13 \pm 1.76\%$, la nivelul celulelor cu un acrozom normal de $58.29 \pm 2.63\%$ și la nivelul flagelului de $49.41 \pm 4.52\%$.
- Diferențele nu au fost semnificative statistic între speciemenele decongelate la 39° C timp de 120 de secunde și acelea decongelate rapid la 50° C timp de 30 de secunde, iar membranele plasmatice integrale la nivelul capului, acrozomului și flagelului au fost normale la 45.27%, 50.37% și respectiv 43.52% dintre celule.
- Profilul ultrastructural al speciemenelor decongelate ultrarapid la 75° C și 90° C prezintă membrane normale în proporție de 11.27% - 31.23% pentru toate compartimentele celulare, existând diferențe semnificativ statistic față de variantele decongelate la 39° C timp de 120 de secunde și acelea decongelate rapid la 50° C timp de 30 de secunde.
- Principalele modificări de structură ale compartimentelor celulare au avut frecvențe diferite la cele 5 variante de decongelare, cele mai întâlnite defecte au fost balonările

mai mult sau mai puțin exagerate ale membranei plasmatice externe, cu fenestrări de diferite dimensiuni, distrugerii ale membranei plasmatice externe a acrozomului, cu pierderi de conținut acrozomal.

- Celulele decongelate rapid și ultrarapid prezintă o frecvență mai mare de vezicule de diferite dimensiuni în jurul capului și structuri membranare “pufoase” datorate dislocării fosfolipidelor sau a destrucției proteinelor transmembranare, precum și membrane plasmatice balonate excesiv. Acestea sunt observații originale, ce nu se regăsesc în literatura de specialitate.
- La celulele spermatice decongelate ultrarapid s-au observat, într-o frecvență mai mare, zone submembranare fără densitate electrono-optică, ceea ce presupune un transfer de apă și electroliți din zona extracelulară, prin transport membranar, deoarece membranele nu sunt fenestrate.
- Prezența cristalelor de gheață este demonstrată de prezența zonelor “albe”, fără structură, apa fiind eliminată în cursul procesării specimenelor pentru examenul electrono-microscopic, cu frecvență moderată atât în mediul extracelular dar și submembranar la nivelul capului spermatozoidului.
- La nivelul flagelului, secționat în diverse planuri, modificările membranei plasmatice se rezumă la umflări ușoare cu sau fără fenestrări, uneori cu desprinderi parțiale sau totale.
- Frecvența leziunilor grave, care produc moartea celulară, sunt mai des întâlnite la variantele de decongelare ultrarapidă.

Acțiunea laserului cu He-Ne asupra materialului seminal de berbec sau țap decongelat conduce la o îmbunătățire a motilității, viabilității, funcției mitocondriale și integrității funcționale a membranei pentru doza de 6.12 J/cm^2 , spre deosebire de doza de 3.96 J/cm^2 ce a înregistrat scăderi ale parametrilor calitativi ai materialului seminal raportate la proba de control.

Metoda decongelării paietelor cu spermă de berbec și țap folosind energizarea probelor cu laserul cu He-Ne constituie o premieră națională, această metodă a fost experimentată pentru prima dată în Italia.

Evaluarea *in vivo* a rezultatelor spermei decongelate de berbec prin metoda convențională (39°C timp de 120 de secunde) și la temperaturi ridicate (50°C timp de 30 de secunde) s-a realizat prin calcularea principalilor indici de reproducție și anume: procentul neîntoarcerilor în estru (NR%), fertilității (F%), prolificității (P%), mortalității

embrionare (ME%) și avorturilor (A%). Rezultatele obținute după inseminarea artificială cu spermă decongelată prin cele două metode sunt următoarele:

- După două cicluri estrale de la inseminarea spermei decongelate la 39° C timp de 120 de secunde, procentul de concepție (NR%) a fost de 75% iar cel al fertilității (F%) calculată după fătarea la termen a femelelor a fost de 58.33%. Pierderile de gestație (fetale și avorturi) au fost de 41.66%.
- După două cicluri estrale de la inseminarea spermei decongelate la 50° C timp de 30 de secunde, procentul de concepție (NR%) a fost de 83.33%, cel al fertilității a fost de 75% iar pierderile de gestație (ME și A) au fost de numai 25%.
- Între cele două loturi experimentale prolificitatea (P%) a fost de 157.7% și, respectiv, de 166.66%.
- Din totalul pierderilor de gestație, mortalitatea embrionară a fost de 25% și respectiv 16.66%, ceea ce confirmă faptul că acestea s-au produs din cauza spermei congelate-decongelate cu activitate mitocondrială și viabilitate redusă. Avorturile s-au plasat în limite normale, nu au avut o etiologie infecțioasă și au fost cauzate de factorii de mediu sau factori tehnologici.
- Comparând rezultatele obținute *in vivo* pentru sperma decongelată prin cele două metode se concluzionează că decongelarea rapidă a spermei la 50° C timp de 30 de secunde a realizat un procent de fertilitate cu 11% mai mare și o prolificitate cu 6% mai mare decât decongelarea convențională lentă.
- Testarea *in vivo* a spermei decongelate cu laser folosind două nivele energetice (3.96 J/cm² și 6.12 J/cm²) s-a realizat pe două loturi experimentale și unul martor (spermă refrigerată). S-au obținut indici de reproducție foarte buni la sperma decongelată folosind doza de energie mai mare, respectiv de 60% fertilitate și de 166.66% prolificitate.
- Lotul martor de oi inseminate cu spermă refrigerată a înregistrat indici de reproducție mai mari decât cele inseminate cu spermă decongelată convențional sau rapid, însă avantajele spermei congelate-decongelate, indiferent de tehnologiile folosite la congelare sau decongelare, rezultă din disponibilitatea acesteia pe toată durata anului, nefiind limitată de condițiile date, de sezon, de timp și/sau spațiu.
- În general, indicii de reproducție obținuți au fost comparabili cu cei obținuți de alți cercetători, ținând cont că în literatura de specialitate obiectivul experimental este foarte puțin studiat și nu este verificat *in vivo*, așa încât, datele originale obținute

constituie informații științifice de referință pentru acest obiectiv care a fost studiat *in vitro* dar nu și *in vivo*.

- Folosirea tehnicii flowcitometrice pentru studierea viabilității și a activității mitochondriale este o noutate la nivel național.

PRINCIPALELE CONTRIBUȚII PERSONALE

- Metoda decongelării paietelor cu spermă de berbec și țap folosind energizarea probelor cu laserul cu He-Ne constituie o premieră națională, această metodă a fost experimentată pentru prima dată în Italia.
- Metoda evaluării morfologice a spermei de berbec a fost brevetată:
Brevet invenție numărul 127850/29.04.2016 titlu : ”Metodă de evaluare morfologică a unui material seminal de berbec” – autori: Zamfirescu Stela, Dobrin Nicolae
- Folosirea tehnicii flowcitometrice pentru studierea viabilității și a activității mitochondriale este o noutate la nivel național.
- Toate pozele de microscopie electronică și de flowcitometrie sunt originale.
- Celulele decongelate rapid și ultrarapid prezintă o frecvență mai mare de vezicule de diferite dimensiuni în jurul capului și structuri membranare “pufoase” datorate dislocării fosfolipidelor sau a destructurării proteinelor transmembranare, precum și membrane plasmactice balonate excesiv. **Acestea sunt observații originale, ce nu se regăsesc în literatura de specialitate.**
- În general, indicii de reproducție obținuți au fost comparabili cu cei obținuți de alți cercetători, ținând cont că în literatura de specialitate obiectivul experimental este foarte puțin studiat și **nu este verificat *in vivo***, așa încât, **datele originale obținute constituie informații științifice de referință pentru acest obiectiv care a fost studiat *in vitro* dar nu și *in vivo*.**

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- 1) Ahmed M.U., (2011), Effect of freezing rate and thawing method on quality of frozen Swamp buffalo semen, Thesis Submitted to Assam Agricultural University, Khanapara, Guwahati, India.
- 2) Aitken R.J., (2010), Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology, *Asian Journal of Andrology*; 12: 99-103.
- 3) Al-Badry I.K., (2012), Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of Friesian bulls in Iraq, *Inter. J. Anim. Vet. Adv.*, 4(6): 384-388.
- 4) Bearden H.J., Fuquay F., Willard S.T., (2004), *Applied Animal Reproduction*, 6th Edn., Pearson Prentice Hallm, New Jersey.
- 5) Bezerra F. S. B., (2009), Cryopreservation of goat semen: effect of different straws, thawing rates and cryoprotectors [M.S. thesis], Federal University of Semi-Árido, Mossoró, Brazil.
- 6) Bibikova A., Belkin V., Oron U., (1994), Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low energy laser irradiation, *Anat. Embryol.* 190, 597–602.
- 7) Bratosin D., Ruginǎ A., Gheorghe A.M., Iordăchel C., Montreuil J., (2009), Determination of acrosin activity in sperm by two new flow cytometric methods, *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii* 19(2):223-227.
- 8) Breitbart H., Levinshal T., Cohen N., Friedmann H., Lubart R., (1996), Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633nm (HeNe laser), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 34, 117–121.
- 9) Buckman C., George T., Friend S., Sutovsky M., Miranda-Vizueté A., et al., (2009), High throughput, parallel imaging and biomarker quantification of human spermatozoa by ImageStream flow cytometry, *Syst Biol Reprod Med*; 55: 244-51.
- 10) Cohen N., Lubart R., Rubinstein S., Breitbart H., (1998), Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals, *Photochem. Photobiol.* 68, 407–413.
- 11) Collodel G., Federico M.G., Pascarelli N.A., Geminiani M., Renieri T., Moretti E., (2011), A case of severe asthenozoospermia: a novel sperm tail defect of possible genetic origin identified by electron microscopy and immunocytochemistry. *Fertil Steril.*; 95:289.e11-6.
- 12) Contri A., Valorz C., Faustini M., Wegher L. and Carluccio A., (2010), Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 74: 424-453
- 13) Corral-Baqués M.I., Rigau T., Rivera M.M., Rodríguez J.E., Rigau J., (2005), Effect of 655nm diode laser on dog sperm motility, *Lasers Med. Sci.* 20, 28–34.
- 14) Corral-Baqués M.I., Rivera M.M., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., Rigau J., (2009). The effect of low-level laser irradiation on dog spermatozoa motility is dependent on laser output power, *Lasers Med. Sci.* 24, 703–713.
- 15) Crespilho A.M., Landim-Alvarenga F.C., Papa F.O., (2006), Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão, *Ciência Rural* 36:1507-1510.
- 16) Dhami A.J., Sahni K.L., (1993), Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa, *Theriogenology*, 40: 1269-1280.
- 17) Gillan L., Skovgold K., Watson P.F., Evans G., Maxwell W.M., (1999), Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination, *Reprod Fertil Dev.*;11(6):309-15.
- 18) Godoy L.C., Streit Jr. D.P., Zampolla T., Bos-Mikich A., Zhang T., (2013), A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles, *Cryobiology*, 67, pp. 347–354
- 19) Hayashi Y., Isobe N., (2005), Characteristics of cryo- preserved spermatozoa from a Holstein-Friesian bull thawed at different temperature, *J. Inter. Dev. Coop.*, 12(1): 107-110.
- 20) Iaffaldano N., Meluzzi A., Manchisi A., Passarella S., (2005), Improvement of stored turkey semen quality as a result of He–Ne laser irradiation, *Anim. Reprod. Sci.* 854, 317–325.
- 21) Iaffaldano N., Rosato M.P., Paventi G., Pizzuto R., Gambacorta M., Manchisi A., Passarella S., (2010), The irradiation of rabbit sperm cells with He-Ne laser prevents their in vitro liquid storage dependent damage, *Animal Reproduction Science* 119 (1-2) , pp. 123-129.
- 22) Johnston S.D., Satake N., Zee Y., López-Fernández C., Holt W.V., Gosálvez J., (2012), Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function, *Reproduction*, 143, pp. 787–797
- 23) Jondet R., (1972), Survival rate and fertilizing ability of frozen bull spermatozoa following 8 and 1 minute of exposure to glycerol. *Proceeding of 7th International Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, Munich, 2: 1371.

- 24) Jurandy M. P.F., Fabrício A. O., Carolina R. J., Erly C., Júlio C. O. D., et. all., **(2014)**, Association of Vitamin E with Rapid Thawing on Goat Semen, The Scientific World Journal Volume , Article ID 964172, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/964172> Research Article
- 25) Kim S., Yu D., Kim Y., **(2010)**, Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim Reprod Sci*; 119: 106-14.
- 26) Koppers A., De Iulis G., Finnie J., McLaughlin E., Aitken R., **(2008)**, Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa, *J Clin Endocrinol Metab*; 93: 3199-207.
- 27) Liu Y., Xu T., Robinson N., Qin J., Li X., **(2014)**, Cryopreservation of sperm in farmed Australian greenlip abalone (*Haliotis laevigata*), *Cryobiology*, 68, pp. 185–193
- 28) Lozano G., Bejarano I., Espino J., González D., Ortiz A., et all., **(2009)**, Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone, *J Reprod Dev*; 55: 615-21.
- 29) Lubart R., Wollman Y., Friedmann H., Rochkind S., Laulicht I., **(1992a)**, Effects of visible and near infra-red lasers on cell cultures, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 12, 305–310.
- 30) Lubart R., Friedmann H., Levinshal T., Lavie R., Breitbart H., **(1992b)**, Effect of light on calcium-transport in bull sperm cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 15, 337–341.
- 31) Lubart R., Breitbart H., **(2000)**, Biostimulative effects of low-energy lasers and their implications for medicine, *Drug Dev. Res.* 50, 471–475.
- 32) Lyashenko A., **(2015)**, Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa, [http://dx.doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60051-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60051-8), *Asian Pac. J. Reprod.*, 4(1): 17-21.
- 33) Martinez-Pastor F., Aisen E., Fernández-Santos M.R., Estes M.C., Maroto-Morales A., García-Álvarez O., Garde J.J., **(2009)**, Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa, *Reproduction* 137, 225–235.
- 34) Martinez-Pastor F., Mata-Campuzano M., Alvarez-Rodriguez M., Alvarez M., Anel L. et all., **(2010)**, Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry, *Reprod Domest Anim*; 45 suppl: 67-78.
- 35) Mehmood A., Anwar M., Saqlan Naqvi S.M., **(2009)**, Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen, *Anim Reprod Sci*; 111:141–148.
- 36) Morrell J.M., Rodriguez-Martinez H., **(2009)**, Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *Open Androl J.* ;1:1–9.
- 37) Nagy S.; Házas G.; Bali-Papp A.; Ivancsics J.; Sas J.R.F.; Kovács A.; Foote R.H., **(1999)**, Evaluation of sperm tail membrana by light microscopy, *Theriogenology*, v.52, p.1153-1159.
- 38) Ocana-Quero J.M., Gomez-Villamandos R., Moreno-Millan M., Santisteban-Valenzuela J.M., **(1997)**, Biological effects of helium–neon (He–Ne) laser irradiation on acrosome reaction in bull sperm cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 40, 294–298.
- 39) Oliveira L.Z., Arruda R.P., Celeghini E.C.C., de Andrade A.F.C., Perini A.P., Resende M.V., Miguel M.C.V., Lucio A.C., Hossepián de Lima V.F.M., **(2011)**, Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association, *Andrologia*, doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01096.x. [Epub ahead of print].
- 40) Ortega-Ferrusola C., García B., Gallardo-Bolaños J., González-Fernández L., Rodríguez- Martínez H. et all., **(2009)**, Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa, *Anim Reprod Sci*; 114: 393-403.
- 41) Pace M.M., Sullivan J.J., Elliot F.I., Graham E.F., Coulter G.H., **(1981)**, Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 mL French straws, *J. Anim. Sci.*, 35: 253.
- 42) Partyka A., Nizański W. and Ochota M., **(2012)**, Methods of Assessment of Cryopreserved Semen, *Current Frontiers in Cryobiology*, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8.
- 43) Passarella S., Casamassima E., Molinari S., Pastore D., Quagliariello E., Catalano I.M., Cingolani A., **(1984)**, Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium–neon laser., *FEBS Lett.* 175, 95–99.
- 44) Pena F., Rodríguez Martínez H., Tapia J., Ortega Ferrusola C., González Fernández L. et all., **(2009)**, Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review, *Reprod Domest Anim*; 44: 345-9.
- 45) Penitente-Filho J.M., Oliveira F.A., Jimenez C.R., Carrascal E., Dias Oliveira J.C., Dias Oliveira G., Silveira R.G., Silveira C.O., Torres C.A.A., **(2014)**, Association of Vitamin E with Rapid Thawing

on Goat Semen, The Scientific World Journal Volume 2014 , Article ID 964172, 5 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/964172>

- 46) Pesch S. and Bergmann M., (2006), Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation, *Micron* 37: 597–612.
- 47) Prickett R.C., Marquez-Curtis L.A., Elliott J.A.W., McGann L.E., **(2015)**, Effect of supercooling and cell volume on intracellular ice formation, *Cryobiology*, 70, pp. 156–163.
- 48) Rastegarnia A.R., Shahverdi A.H., RezaeiTopraggaleh T., Ebrahimi B., Shafipour V., **(2013)**, Effect of different thawing rates on post-thaw viability, kinematic parameters and chromatin structure of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J.*, 14(4): 306-313. 10.
- 49) Reardon A.J.F., **(2013)**, Membrane and mitochondrial responses to cryobiological conditions (M.Sc. thesis), University of Alberta.
- 50) Reardon A.J.F., Elliott J.A.W., McGann L.E., **(2014)**, Fluorescence as an alternative to light-scatter gating strategies to identify frozen-thawed cells with flow cytometry, *Cryobiology*, 69, pp. 91–99
- 51) Reardon A.J.F., Elliott J. A.W., McGanna L. E., **(2015)**, Investigating membrane and mitochondrial cryobiological responses of HUVEC using interrupted cooling protocols, *Cryobiology*, Volume 71, Issue 2, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.004>, Pages 306–317.
- 52) Robles V., Martínez-Pastor F., Petroni G., Riesco M.F., Bozzano A., Villanueva R., **(2013)**, Cryobiology of cephalopod (*Illex coindetii*) spermatophores, *Cryobiology*, 66, pp. 288–294.
- 53) Rodriguez O.L., Pace M.M., Zavos P.M., (1975), Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws, *J. Anim. Sci.*, 41: 129-136.
- 54) Ross-Rodriguez L., **(2009)**, Cellular osmotic properties and cellular responses to cooling (Ph.D. thesis), University of Alberta, 239.
- 55) Ross-Rodriguez L.U., Elliott J.A.W., McGann L.E., **(2010)**, Characterization of cryobiological responses in TF-1 cells using interrupted freezing procedures, *Cryobiology*, 60, pp. 106–116
- 56) Ross-Rodriguez L.U., Elliott J.A.W., McGann L.E., **(2010)**, Investigating cryoinjury using simulations and experiments. 1: TF-1 cells during two-step freezing (rapid cooling interrupted with a hold time), *Cryobiology*, 61, pp. 38–45
- 57) Ross-Rodriguez L.U., Elliott J.A.W., McGann L.E., **(2010)**, Investigating cryoinjury using simulations and experiments: 2. TF-1 cells during graded freezing (interrupted slow cooling without hold time), *Cryobiology*, 61, pp. 46–51.
- 58) Ruiz-Pesini E., Lapena A.C., Díez C., Alvarez E., Enríquez J.A., López-Pérez M.J., (2000), Seminal quality correlates with mitochondrial functionality, *Clin. Chim. Acta* 300, 97–105.
- 59) Salamon S., Maxwell W.M.C., (1995), Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination, *Animal Reproduction Science* 37 (3-4) , pp. 185-249
- 60) Thibier M., Wagner H.G., (2002), World statistics for artificial insemination in cattle, *Livestock Prod. Sci.*, 74: 203-215.
- 61) Vazquez J., Parrilla I., Roca J., Gil M., Cuello C., et all, **(2009)**, Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*; 71:80-8.
- 62) Vishwanath R., Shannon P., (2000), Storage of bovine semen in liquid and frozen state, *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 23-53.
- 63) Zamfirescu S., Anghel A., **(2010)**, Researches regarding the ultrastructural modifications of sperm cells before and after freezing in different media, *Lucrări științifice, Seria Zootehnie*, 53 (15):67-74.
- 64) Zamfirescu S., Caloianu M., (2000), Changes in structure of plasmalema in ram sperm cells upon cryotreatment, *Primul Congres de Biol.Cel. Și Molec.*, Iași, pag. 35.
- 65) Zamfirescu S., Nadolu D., Anghel A., **(2011)**, Monitorizarea și controlul calității spermei de berbec și țap, Constanța, editura Ex Ponto, ISBN 978-606598-016-7.
- 66) Zamfirescu S., Sonea A., (2004), *Biotehnologii de reproducție la rumegătoarele mici*, Ed. Ex Ponto, Constanța.
- 67) Zhurova M., Woods E.J., Acker J.P., **(2010)**, Intracellular ice formation in confluent monolayers of human dental stem cells and membrane damage, *Cryobiology*, 61, pp. 133–141.