



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI**

DIN TIMIȘOARA

TEZA DE ABILITARE

**Controlul funcției de reproducere la animalele
domestice**

**Conferențiar dr. Călin Mircu
Facultatea de Medicină Veterinară**

Timișoara, 2015

REZUMAT

al Tezei de abilitare intitulate

CONTROLUL FUNCȚIEI DE REPRODUCERE LA ANIMALELE DOMESTICE

elaborată de Conf.dr. Călin Mircu

Subsemnatul Conf.dr. Călin Mircu, doctor în științe medicale, domeniul Medicină Veterinară, conferențiar la disciplinele de Biotehnici de Reproducere și Prelegeri clinice pe specii – Reproducere, departamentul II, Învățământ clinic I din cadrul Facultății de medicină veterinară Timișoara, candidat la obținerea titlului științific de doctor abilitat (dr. habil.), prezintă această Teză de abilitare.

A.1. Relevanța și impactul rezultatelor științifice

1.1. Date generale

Doctor în științe medicale, domeniul medicină veterinară din anul 1997.

Absolvent al Facultății de medicină veterinară Timișoara în anul 1988.

1.2. Evoluția activității profesionale/didactice

În anul 1990 am ocupat prin concurs postul de asistent la disciplina de Reproducere și patologia reproducției din cadrul FMV Timișoara iar ulterior, tot prin concurs am ocupat posturile de șef de lucrări și conferențiar în cadrul aceleiași discipline.

1.3. Rezultate științifice

Teza de abilitare însumează o parte din activitatea de cercetare a candidatului Călin Mircu după susținerea tezei de doctorat în anul 1997. Aspectele selectate sunt considerate relevante din punct de vedere al relevanței și originalității, fiind dezvoltate pe trei direcții tematice :

Funcția luteală și luteoliza

Imunocontracția bazată pe utilizarea zona pellucida

Elemente ale fecundației in vitro

Elementele definiției pentru activitatea desfășurată sunt cuprinse în rezumatul tezei, după cum urmează :

Finalizarea tezei de doctorat nu a închis capitolul preocupărilor legate de implicarea PGF2alfa în procesele reproductive la vacă. Am avut în vedere aspectele majore ale funcției luteale reprezentate de formarea CL și compoziția celulară a

acestui, steroidogeneza și luteoliza. Faptul că PGF₂alfa nu este singurul factor implicat în regresia luteală ne-a determinat să investigăm în profunzime (atât cât a fost cu putință un asemenea demers la sfârșitul anilor 90) procesul luteolizei precum și fenomenele generate de prezența PGF₂alfa sub o formă sau alta în aparatul reproducător al vacii. Atât ocitocina neurohipofizară cât și cea din corpus luteum ocupă un loc important în procesul luteolizei. Acestea i se alătură estrogenii și progesteronul.

Este important modul în care prezența sarcinii influențează procesul luteolitic. La oaie s-a observat că prezența unui embrion în cavitatea uterină suprimă eliberarea PGF₂alfa din uter începând cu cea de-a 12-a zi postestrală. Pe de altă parte s-a observat că la oaia gestantă corpus luteum este refractar la acțiunea prostaglandinelor exogene și că sângele venos (efluent) al unui corn uterin gestant, la același animal, are efect luteotrop la corpul luteal ipsilateral. Aceste constatări permit să se concluzioneze că embrionul poate avea un dublu rol în menținerea unui corpus luteum integru: pe de o parte, prin inhibarea PGF₂alfa iar pe de altă parte, prin elaborarea unui principiu luteotrop. Semnalele embrionare care permit recunoașterea maternală a gestației la oaie sunt reprezentate de PGE₂, PGI₂ și în cel mai mare grad, de către trofoblastină (cunoscută actualmente sub denumirea de interferon tau). Unul dintre evenimentele cheie este reprezentat de supresarea exprimării receptorilor uterini pentru ocitocină, ceea ce în final va genera suprimarea eliberării PGF₂alfa .

Evidențierea interrelației ocitocină PGF₂ în procesul luteolizei a oferit surprinzătoare bază teoretică unei aplicații practice inedite și anume a utilizării unei doze subluteolitice de PGF₂alfa pentru diagnosticarea precoce a gestației, în ziua a20-a, consecutiv înșămânțării artificiale (Labussiere - 1990). Conform opiniei acestui autor, o doză subluteolică de PGF₂alfa administrată în vena subcutanată abdominală cranială, determină eliberarea ocitocinei din corpul luteal (și consecutiv, ejecția laptelui), în cazul prezenței gestației în acel moment, tradusă prin funcționalitatea corpului luteal (CL). Aplicând această metodă am ajuns la concluzia că diagnosticarea gestației prin aplicarea TPGF în ziua a 20-a după înșămânțarea artificială reprezintă o metodă sigură, permițând identificarea a 87,7- 90% din femelele gestante. Acuratețea este maximă în cazul diagnosticelor negative. Nivelurile progesteronului - în sânge și lapte - sunt o reflectare fidelă a fazei ciclului sexual. Din acest considerent, concentrația P4 reprezintă un mijloc precis pentru diagnosticarea prezenței gestației. Experimentele desfășurate ne-au permis să desprindem următoarele concluzii : nivelul scăzut al progesteronului (sub 3 ng/ml) la momentul IA este esențial pentru instalarea gestației; variația nivelului progesteronului între zilele 8-10 post IA cu mai mult de 1,5 ng/ml lapte poate indica declanșarea luteolizei și consecutiv, absența gestației ; nivelurile progesteronului în zilele 16, 21 și 24 după înșămânțarea artificială diferă semnificativ între vacile gestante și cele negestante; există o corelație pozitivă între concentrația progesteronului în faza luteală și rata gestației.

Ideile desprinse din studiile efectuate precum și echipamentele performante de care dispunem în prezent ne permit să ne orientăm către investigarea acestor fenomene din punctul de vedere al geneticii moleculare. Dezvoltarea embrionară timpurie este guvernată de transcripturile maternelor și proteinele înmagazinate în ovocit pe parcursul ovogenezei. Pe măsura dezvoltării, transcripturile și proteinele de origine maternă vor fi degradate în timp ce se inițiază activarea genomului embrionar (EGA). Considerăm utilă identificarea genelor pentru OT, PGF2alfa și E2 active în diferite faze ale CL precum și nivelul exprimării anumitor gene în corelație cu prezența gestației și mortalitatea embrionară / neactivarea genomului propriu etc.

Derularea în cadrul disciplinei de Reproducere Obstetrică și Ginecologie a unui proiect care viza efectele secundare generate de contraceptivele steroidale administrate animalelor de companie ne-a determinat să analizăm și alte metode care ar genera rezultate similare fără a produce efecte adverse. Obstacolele majore legate de utilizarea agenților imunologici pentru prevenirea fecundației sunt legate de efectele secundare toxice, lipsa unor sisteme adecvate pentru difuzarea în organism precum și de incompleta reversibilitate. Zona pellucida (ZP) joacă un rol esențial în fecundație precum și în etapa preimplanțională a embriogenezei. Experimentul și investigațiile au fost efectuate pentru a stabili titrul de anticorpi antiZP rezultați la cățea în urma imunizării cu ZP porcine, cât și cu ovocită și ZPp (OV+ZPp), precum și de evidențierea modului în care prezența anticorpilor antiZP influențează activitatea sexuală a femelelor imunizate. La finalizarea cercetărilor am fost în măsură să prezentăm următoarele concluzii : imunizarea cățelelor cu zona pelucida porcine a generat un titru de anticorpi inhibant pentru fecundație, care a persistat timp de 7 luni, neafectând ciclicitatea sexuală; utilizarea pentru imunizare a ovocitelor împreună cu zona pelucida aferentă a generat titruri superioare de anticorpi, de asemenea inhibante pentru fecundație, care au persistat o perioadă mai îndelungată (10 luni) însă au fost însoțite de tulburări ale funcției de reproducere; aceste metode asigură o contracepție sigură (100%).

Considerăm că este necesară clarificarea mecanismelor de sinteză a proteinelor ZP precum și evidențierea unor posibile diferențe structurale între proteinele ZP sintetizate de către celulele foliculare și cele produse în ovocite, diferențe reflectate fie în secvența proteică fie în modul de glicozilare. Pătrunderea spermatozoizilor prin ZP în procesul fecundației poate fi împiedicată prin inhibitori ai proteozomului și anticorpi antiproteozomali. Proteozomul generat de acrozom poate reprezenta un obiectiv interesant pentru contracepție. Vizarea proteozomului 26S sau a conținutului proteozomului 20S poate favoriza investigarea etapelor interacțiunii spermatozoid-zona pellucida în IVF sau pentru managementul polispermiei.

Posibilitățile oferite de infrastructura de cercetare nou creată prin proiectul POSCCE ne-au determinat să ne orientăm interesul și eforturile către tehnicile in vitro, în speță către cele care sunt corelate cu fecundația in vitro. Fecundația in vitro (IVF) reprezintă procedura care constă în recoltarea ovocitelor din ovar, maturarea și

fecundația producându-se în condiții artificiale pentru ca apoi embrionul rezultat să fie inoculat unei femele receptoare. La ora actuală există numeroase protocoale IVF, aspect datorat faptului că gameții fiecărei specii au nevoie de condiții diferite. Pe de altă parte, există o continuă tendință de perfecționare a tehnicii, pentru a obține un număr cât mai mare de embrioni transferabili. Întrucât abordarea unor noi direcții de investigare presupune o foarte bună și detaliată cunoaștere a aspectelor fiziologice, am considerat necesară tratarea în amănunt a aspectelor legate de foliculogeneză și fecundație, cu o ușoară corelare cu ciclul celular. Primul studiu a avut în vedere evaluarea maturării in vitro a ovocitelor de bovine iar consecutiv derulării tuturor fazelor experimentale am ajuns la următoarele concluzii : prezumtiva capacitate reproductivă scăzută a vacilor abatorizate se repercutează asupra materialului biologic recoltat, calitatea ovocitelor obținute în acest mod are influență asupra capacității lor de maturare; adăugarea FSH-ului în mediu nu influențează maturarea COC de bovine. Gradul de maturare este stabilit doar prin evaluarea stadiilor nucleare ale gamentului femel din timpul diviziunii în urma utilizării unui colorant cu afinitate pentru acizi nucleici; colorarea ovocitelor de bovine cu aceto-orceină 1% pentru evaluarea gradului de maturare nucleară este o metodă ușor de utilizat, însă prin aplicarea acesteia ovocitele fixate și colorate nu vor mai putea fi utilizate în continuare pentru IVF; pentru a evalua complet maturarea ovocitelor de bovine, nu este suficientă doar analizarea maturării nucleare, ci trebuie luată în considerare și maturarea citoplasmatică.

Următorul pas a fost reprezentat de alegerea tehnicii IVF compatibilă modului nostru de lucru precum și dotărilor existente în laboratorul nostru iar în urma derulării etapelor de lucru și analizării rezultatelor obținute, putem afirma că : ovarele care provin de la abator conțin o populație heterogenă de ovocite. Acestea vor fi recoltate indiferent de dinamica foliculară iar caracteristicile individuale ale vacilor influențează capacitatea de dezvoltare a ovocitelor (varstă, status fiziologic, rasă) ; șansele de reușită a protocoalelor IVF presupun re-crearea aproape perfectă a condițiilor de maturare, fecundație și dezvoltare a embrionilor in vivo ; un rol important în reușita IVF îl are și experiența personalului de laborator, care trebuie să dobândească capacitatea de a manipula rapid celule, în volume foarte mici de mediu și de a reduce pe cât posibil timpul petrecut de acestea în mediul de recoltare/ manipulare sau în afara incubatorului. Implementarea unui protocol FIV este un proces de durată și depinde de mulți factori relaționați atât cu materialul biologic folosit cât și cu dotarea tehnică a laboratorului precum și cu experiența personalului.

În cel de-al treilea experiment al ultimului capitol, demersul nostru a vizat creșterea viabilității ovocitelor de scroafă prin adăugarea cisteinei în mediul de cultură. În acest scop, împreună cu observarea morfologică a ovocitelor după maturare a fost evaluată și expresia genei Bcl2 în celulele cumulus de scroafă înainte și după maturarea in vitro. Am observat următoarele :

Adăugarea cisteinei în mediul de maturare nu crește numărul ovocitelor care ajung la maturitate și nu se produc modificări morfo-structurale ale ovocitelor în timpul maturării.

Cu toate acestea, prin cuantificarea expresiei genei apoptotice Bcl2, s-a observat o creștere semnificativă a acesteia, pentru COC cultivate pe mediu în care a fost adăugată cisteină în comparație cu cele maturate în absența cisteinei.

Un nivel ridicat al expresiei genei Bcl2 în celulele cumulus duce la inhibarea apoptozei lor pe o cale mitocondrială, ceea ce inevitabil conduce la o sporire a viabilității ovocitelor și a ratei fecundării. Pentru fecundările in vitro este esențială o rată crescută a fecundării, mai ales din motive economice (consum ovocite, material seminal, reducerea costului de manoperă și echipamente). De asemenea, printr-o creștere a ratei de fecundare se reduce și timpul dedicat manoperei.

În ceea ce privește nivelul de expresie a genei Ptx3, rezultatele au fost neconcludente, acestea neputând fi organizate după un model de interpretare. În acest caz este necesară o altă serie de analize, ținând cont că și această genă a fost aleasă pentru a fi studiată pe baza referințelor bibliografice.

Având în vedere aceste rezultate, se recomandă efectuarea de studii suplimentare pe această temă. Adăugarea cisteinei în mai multe medii de cultură, poate fi studiată în alte cazuri în care se dorește creșterea viabilității celulelor. Este foarte probabil ca prin ridicarea nivelului de expresie a unor gene, în principal Bcl2, acest obiectiv poate fi îndeplinit. Totodată, această genă poate fi folosită ca și marker molecular în evaluarea viabilității și implicit a ratei de fecundare a ovocitelor.

Datele obținute în urma experimentelor desfășurate ne-au permis să identificăm unele direcții către care căutările noastre ar trebui să se îndrepte. Atât Complexul Golgi cât și reticulul endoplasmatic reprezintă un important subiect de studiu din punct de vedere al contribuțiilor aduse la dezvoltarea embrionului iar modalitatea în care inozitoltrifosfatul (IP3) influențează eliberarea calciului poate însemna mecanismul prin care se poate dirija activarea ovocitei pe parcursul fecundației.

Deoarece în cazul ovocitelor bovine dinamica filamentelor citoscheletului este în relație cu dobândirea competenței de dezvoltare nucleară, stabilirea intensității și amplitudinii modificărilor suferite de citoschelet ar putea indica potențialitatea dobândirii competențelor de dezvoltare nucleară.

Pornind de la studiile care conturează funcția fertilinei (glicoproteina dimerică ce se leagă la membrana plasmatică a ovocitei) devine posibilă investigarea modalităților prin care aceasta induce procesul de fuziune.

Se poate clarifica rolul celulelor cumulus pentru maturizarea meiotică, mai ales prin identificarea elementelor care participă la mecanismul de inhibare a meiozei.

Un subiect de interes este și consumul de oxigen al embrionilor, cuantificabil prin diverse metode, având în vedere însă și posibilul rol al celulelor cumulus-ului în variațiile tensiunii oxigenului în zona adiacentă embrionului.

Morfologia și calitatea ovocitelor sunt stabilite în timpul ovo- și foliculogenezei și sunt finalizate în timpul maturării finale. Dezvoltarea embrionară incipientă este asociată cu morfologia complexului ovocita-cumulus (COC). Ar fi interesantă corelarea morfologiei ovocitelor și conținutului proteic (un studiu de proteomică) în vederea reflectării capacității fecundante.

Aprecierea calității morfologice a complexelor ovocita-cumulus este utilă pentru selectarea ovocitelor competente pentru fecundarea in vitro și producția de embrioni. Acest aspect ar merita investigat din punct de vedere al produșilor de transcripție (transcriptomică) precum și din cel al abundenței proteice (proteomică).

Întrucât colorarea cu aceto-orceină 1% compromite ovocitele pentru utilizarea în cadrul IVF, se impune utilizarea unui colorant care nu influențează viabilitatea ovocitelor (spre exemplu Hoechst 33342) precum și aplicarea unor metode de colorare care evidențiază maturarea citoplasmatică prin colorarea organitelor celulare sau punerea în evidență a activității acestora.

2. Capacitatea candidatului de a îndruma studenți sau tineri cercetători

Activitatea desfășurată în cadrul disciplinei mi-a prilejuit ocazia de a coordona mai mult de 50 de studenți în cadrul activităților specifice lucrărilor de diplomă, precum și colaborarea cu doctoranzii care și-au desfășurat activitatea în ultimii 15 ani sub îndrumarea distinsului Prof.dr. h.c. Horia Cernescu. Rezultatele incluse în lucrările de diplomă au reprezentat baza lucrărilor științifice publicate în diferite reviste de profil cu vizibilitate națională și internațională.

3. Competențele didactice ale candidatului

Activitatea practică a inclus conducerea lucrărilor practice axate în principal pe teme ale fiziologiei reproducerii precum și a stagiilor de clinică, desfășurate pe marginea elementelor de patologie a reproducerii. Ca o consecință firească, sistematizarea noțiunilor fundamentale din cadrul tematicii largi a reproducerii la animalele domestice s-a regăsit în publicațiile apărute în perioada de activitate precum și în suportul electronic de curs pus la dispoziția studenților. În mod firesc, activitatea din clinică precum și cea desfășurată extra muros a generat în timp acumularea unui material didactic amplu, tradus în principal prin prezentări pe suport electronic. Implicarea în activitatea de predare în limba engleză a disciplinei de Genetică medicală a permis aprofundarea cunoștințelor specifice, cu repercusiuni extrem de favorabile asupra elaborării temelor destinate activității de cercetare din cadrul laboratorului de Genetică moleculară și Reproducere asistată aparținând Complexului de Laboratoare de Cercetare Horia Cernescu.

4. Capacitatea candidatului de a transfera cunoștințele și rezultatele sale către mediul academic sau social, or de a populariza propriile rezultate științifice

Activitatea desfășurată în cadrul disciplinei de Reproducție Obstetrică și Ginecologie se reflectă în cele peste 100 de lucrări științifice (6 ISI, peste 90 BDI) la care am fost colaborator sau prim autor. Lucrările au fost publicate atât în reviste de specialitate din străinătate cât și în reviste românești iar marea lor majoritate a fost prezentată la simpozioane și congrese.

În cadrul proiectului **Specializarea medicilor veterinari și instruire antreprenorială** precum și în cadrul proiectului **Cooperarea transfrontalieră în domeniul agrobusiness Romania – Serbia** am contribuit la diseminarea informațiilor de specialitate necesare unui bun parcurs profesional către medicii veterinari.

5. Capacitatea candidatului de a lucra în echipă și eficiența colaborărilor științifice ale acestuia

Contractele de cercetare precum și cele de prestări de servicii coordonate de către candidat sau cele în care a fost membru al echipei ilustrează capacitatea de a lucra în echipă.

6. Capacitatea candidatului de a conduce proiecte de cercetare – dezvoltare

Elaborarea și implementarea proiectului ” Dezvoltarea infrastructurii de cercetare, educație și servicii în domeniile medicinei veterinare și tehnologiilor inovative pentru regiunea Vest ” – POSCCE 2669 în perioada 2009-2014 a reprezentat un prilej de exersare a tuturor capacităților necesare în activitatea cotidiană.

7. Experiența profesională a candidatului în alte instituții

Apartenența la colectivul disciplinei de Reproducție Obstetrică și Ginecologie mi-a prilejuit participarea la mai multe stagii de pregătire, stagii care au exercitat în mod indubitabil o fastă influență asupra parcursului profesional :

1993 (trei luni) – Royal Veterinary College London, UK; departamentul LAMS, Prof. D.E. Noakes

1998 – Al treilea curs internațional pentru tineri endocrinologi, Universitatea de Medicină Veterinară din Budapesta, Ungaria, 2 săptămâni (Prof. G. Husenicza)

2001 – Al cincilea Workshop la Clinica de endocrinologie din Budapesta, Facultatea de Medicină Veterinară din Budapesta, Ungaria, 2 săptămâni (Prof. G. Husenicza)

2001 – Tehnica reacției imunoenzimatice, Institutul de Reproducție Animală și Cercetări Alimentare, Academia Poloneză de Științe, Olsztyn, Polonia, 3 săptămâni (Prof.Dr. Jan Kotwica).

B. Planul de evoluție și dezvoltare a carierei

Îndeplinirea standardelor prevăzute de organisme abilitate permit accesarea în viitorul apropiat la poziția de profesor universitar, ceea ce va determina o implicare și mai amplă în activitatea didactică și științifică.

Dinamica învățământului medical veterinar asigură și impune în același timp noi standarde de predare a cunoștințelor teoretice și practice iar experiența acumulată asigură fundamentul unei evoluții corepsunzătoare în această direcția, asigurându-se în acest mod accesul studenților la toate elementele necesare pentru a învăța subiectele specifice disciplinei de Reproducție Obstetrică și Ginecologie.

Infrastructura nou creată prin intermediul proiectului POSCCE oferă posibilități practic nelimitate de abordare a domeniilor științifice de interes, așa cum au fost ele inserate în temele specifice laboratorului de Genetică Moleculară și Reproducere asistată al cărui coordonator sunt.

Implicarea tinerilor doctoranzi în activitatea de cercetare sprijină dezvoltarea resursei umane și în egală măsură asigură o rezervă apreciabilă de potențial creativ – științific. Se întrunesc nemijlocit premisele necesare afirmării și consacării unui colectiv de cercetare multidisciplinară.

Activitatea de cercetare

Abordarea temelor de interes pentru reproducerea asistată, cu sprijin pe markeri genetici
Constituirea unui colectiv de cercetare interdisciplinară genetică – reproducere. Valorificarea rezultatelor cercetării prin articole științifice, studii și participări la manifestări științifice

Activitatea didactică

Compatibilizarea planurilor de învățământ cu cele ale programelor similare de studii din țară și străinătate

Crearea unor parteneriate și sisteme de mobilități cu școli doctorale interne și internaționale

Ameliorarea performanțelor absolvenților în vederea creșterii gradului de acces pe piața muncii din țară și străinătate